

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO DE  
*Spilanthes acmella* EN *Porphyromonas gingivalis* Y *Streptococcus mutans***

**JESSICA FRAGOSO DORIA**

**ISABELLA MANZUR VILLALOBOS**

**ANTONIO JOSE DÍAZ CABALLERO**

**ALEJANDRA HERRERA HERRERA**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA – UNIVERSIDAD DE CARTAGENA**

**GRUPO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIONES Y TRATAMIENTOS  
ODONTOLÓGICOS UNIVERSIDAD DE CARTAGENA GITOU**

**CARTAGENA DE INDIAS 2016**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO DE  
*Spilanthes acmella* EN *Porphyromonas gingivalis* Y *Streptococcus mutans***

**JESSICA FRAGOSO DORIA**

**ISABELLA MANZUR VILLALOBOS**

**DR. ANTONIO JOSE DÍAZ CABALLERO\***

**DRA. ALEJANDRA HERRERA HERRERA**

**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 GITOUIC.**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA – UNIVERSIDAD DE CARTAGENA**

**GRUPO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIONES Y TRATAMIENTOS  
ODONTOLÓGICOS UNIVERSIDAD DE CARTAGENA GITOUIC**

**CARTAGENA DE INDIAS 2016**

## DEDICATORIA

*A Dios, la Virgen María, y el Espíritu Santo, por iluminarnos siempre.*

*A nuestros padres, hermanos y familiares, por ser nuestro motivo y motor de vida.*

*A nuestras amigas las peligrosas por permanecer en nuestras vidas en esta  
maravillosa carrera.*

*A toda la comunidad académica y científica para que esto sea un granito de arena  
que se adicione al gran mundo de la odontología.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A Dios, la Virgen María y el Espíritu Santo no sólo por habernos inspirado y acompañado durante toda la realización de este proyecto sino también en el recorrido de nuestra carrera profesional.*

*A nuestros padres y hermanos por haber sido de gran apoyo durante todo este proceso y por impulsarnos siempre a ser mejores y esforzarnos al máximo para dar el 110% de uno.*

*A Alejandra Herrera y Luis Carlos Fang por habernos brindado las bases y conocimientos para este estudio y habernos guiado durante todo el camino.*

*A nuestras compañeras fieles de proyecto, María Alejandra, Melissa, María José, Daniela, por haber asumido juntas desde el inicio hasta el final sin permitir que nada se interpusiera en nuestra amistad.*

*A nuestras amigas María B y Angélica por las largas quedadas en la universidad dándonos apoyo incondicional para acabar con el proyecto.*

*A nuestro apreciado grupo de investigación GITOUC y su director Dr. Antonio Díaz, por brindarnos todas las herramientas, conocimientos y aptitudes necesarias para realizar y culminar este proyecto.*

*A Jenny Castro, por guiarnos y prestarnos los equipos necesarios para la realización de los extractos y pruebas del estudio.*

## CONTENIDO

INTRODUCCION .....	12
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
2. JUSTIFICACIÓN.....	17
3. OBJETIVOS.....	20
3.1. OBJETIVO GENERAL .....	20
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
4. MARCO TEÓRICO .....	21
5. METODOLOGÍA .....	30
5.1. RECOLECCION DE MUESTRA, OBTENCIÓN DEL EXTRACTO Y PRUEBA DE SOLUBILIDAD .....	30
5.2. CULTIVO DE MICROORGANISMOS.....	31
5.3. CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO .....	31
5.4. PREPARACION DE LOS EXTRACTOS PARA SU EVALUACIÓN....	32
5.5. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LOS SOLVENTES .....	32
5.6. EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE <i>Porphyromonas gingivalis</i> Y <i>Streptococcus mutans</i> DE EXTRACTOS DE SPILANTHES ACMELLA.	33
5.7. CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC).....	35
5.8. CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB).....	37
5.9. SCREENING FITOQUÍMICO PRELIMINAR DEL EXTRACTO DE SPILANTHES ACMELLA.....	37
5.10. ANALISIS ESTADISTICO.....	38
5.11. CONSIDERACIONES ÉTICAS .....	38
6. RESULTADOS .....	39
6.1. RECOLECCION DE MUESTRA, OBTENCIÓN DEL EXTRACTO Y PRUEBA DE SOLUBILIDAD .....	39

6.2.	CULTIVO DE MICROORGANISMOS Y CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO .....	43
6.3.	PRUEBA DE TOXICIDAD DE SOLVENTES.....	46
6.4.	SENSIBILIDAD BACTERIANA .....	48
6.5.	CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC).....	49
6.6.	CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (MCB).....	56
6.7.	SCREENING FITOQUÍMICO PRELIMINAR DE LOS EXTRACTOS DE SPILANTHES ACMELLA.....	58
7.	DISCUSIÓN .....	59
8.	CONCLUSIONES .....	64
9.	RECOMENDACIONES .....	65
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	66

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resultados pruebas solubilidad del extracto de <i>Spilanthes Acmella</i> . .....	41
Tabla 2. Tiempos de incubación de los ensayos según la curva de crecimiento bacteriano.....	46

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Diseño de la placa de poliestireno para la prueba de toxicidad de solventes de Streptococcus Mutans y Porphyromonas Gingivalis en extracto de Spilanthes Acmella.</i> .....	33
<b>Figura 2.</b> <i>Diseño de placa para la evaluación de la sensibilidad de Porphyromona Gingivalis en el extracto de Spilanthes Acmella.</i> .....	34
<b>Figura 3.</b> <i>Diseño de placa para la evaluación de la sensibilidad de Streptococcus Mutans en el extracto de Spilanthes Acmella.</i> .....	35
<b>Figura 4.</b> <i>Diseño de placa modelo para la evaluación de la concentración mínima inhibitoria de cada extracto de Spilanthes Acmella en Porphyromonas Gingivalis y Streptococcus Mutans.</i> .....	36
<b>Figura 6.</b> <i>Especie de Spilanthes Acmella encontrada en las zonas rurales de Cartagena, Colombia.</i> .....	39
<b>Figura 7.</b> <i>Extracto separado de Spilanthes Acmella en tallos, flores y hojas respectivamente, maceradas y colocadas en un recipiente de vidrio con etanol al 75%.</i> .....	40
<b>Figura 8.</b> <i>Rotaevaporación de los extractos de Spilanthes Acmella.</i> .....	40
<b>Figura 9.</b> <i>Extractos finales obtenidos de Spilanthes Acmella, separados en tallos, hojas y flores respectivamente.</i> .....	41
<b>Figura 10.</b> <i>Prueba de solubilidad en Spilanthes Acmella con Etanol, DMSO, Metanol y DMSO + Etanol, para tallos, hojas y flores.</i> .....	42
<b>Figura 11.</b> <i>Filtrado del extracto de Spilanthes Acmella con Etanol.</i> .....	43
<b>Figura 12.</b> <i>Cultivo de Porphyromonas Gingivalis.</i> .....	44
<b>Figura 13.</b> <i>Cultivo de Streptococcus Mutans.</i> .....	44
<b>Figura 15.</b> <i>Curva de crecimiento graficada de Porphyromonas Gingivalis.</i> .....	45
<b>Figura 16.</b> <i>Prueba de toxicidad de solventes sobre Porphyromonas Gingivalis. El valor de p se consideró como <math>p &lt; 0,05</math>.</i> .....	47
<b>Figura 17.</b> <i>Prueba de toxicidad de solventes sobre Streptococcus Mutans. El valor de p se consideró como <math>p &lt; 0,05</math>.</i> .....	47

<b>Figura 18.</b> Prueba de sensibilidad de <i>Porphyromona Gingivalis</i> a <i>Spilanthes Acmella</i> . Se observa el inoculo cuyo crecimiento es 2,0; las disoluciones a 500 ppm y a 1000 ppm, con valor de $p < 0,05$ y el caldo, inoculo con gentamicina y agua como control de esterilidad. ....	48
<b>Figura 19.</b> Prueba de sensibilidad de <i>Streptococcus Mutans</i> a <i>Spilanthes Acmella</i> . Se observa el inoculo cuyo crecimiento es 0,9; las disoluciones a 500 ppm y a 1000 ppm, con valor de $p < 0,05$ , y el caldo, inoculo con gentamicina y agua como control de esterilidad. ....	49
<b>Figura 20.</b> Se observa que, de las 14 concentraciones del extracto de tallos, 500ppm es la concentración mínima inhibitoria en <i>Porphyromonas Gingivalis</i> . ....	50
<b>Figura 21.</b> Se observa que, de las 14 concentraciones del extracto de hojas, 500ppm es la concentración mínima inhibitoria en <i>Porphyromonas Gingivalis</i> . ....	51
<b>Figura 22.</b> Se observa que, de las 14 concentraciones del extracto de flores, 500ppm es la concentración mínima inhibitoria en <i>Porphyromonas Gingivalis</i> . ....	52
<b>Figura 23.</b> Se observa que, de las 14 concentraciones del extracto de tallos, 500ppm es la concentración mínima inhibitoria en <i>Streptococcus Mutans</i> . ....	53
<b>Figura 24.</b> Se observa que, de las 14 concentraciones del extracto de hojas, 500ppm es la concentración mínima inhibitoria en <i>Streptococcus Mutans</i> . ....	54
<b>Figura 25.</b> Se observa que, de las 14 concentraciones del extracto de flores, 500ppm es la concentración mínima inhibitoria en <i>Streptococcus Mutans</i> . ....	55
<b>Figura 26.</b> Se observa la MCB de tallos en <i>Streptococcus Mutans</i> frente a 500ppm, donde se observa que éste es bactericida. ....	56
<b>Figura 27.</b> Se observa la MCB de hojas en <i>Streptococcus Mutans</i> frente a 500ppm, donde se observa que éste es bactericida. ....	57
<b>Figura 28.</b> Se observa la MCB de flores en <i>Streptococcus Mutans</i> frente a 500ppm, donde se observa que éste es bactericida. ....	57

**Figura 29.** Resultados del screening fitoquímico preliminar de los extractos de tallos, hojas y flores de *Spilanthes Acmella*. Donde se observan los metabolitos secundarios en presencia abundante [+++], presencia moderada [++], presencia leve [+], ausencia [-]. .....58

## RESUMEN

**Objetivos:** en el presente estudio se evaluó el efecto antibacteriano de la planta *Spilanthes Acmella* a partir de las diferentes partes que esta posee, es decir, el tallo, las flores y sus hojas, en las bacterias *Streptococcus Mutans* y *Porphyromonas Gingivalis*. **Metodología:** para este trabajo se implementó un estudio experimental *in vitro* de los extractos etanólicos de tallos, hojas y flores de *S. Acmella*. Las cepas de *Streptococcus* ATCC 51715 *Mutans* y *Porphyromonas Gingivalis* ATCC 33277 se expusieron a este extracto para determinar concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CBM), además del efecto antibacteriano. **Resultados:** las hojas, flores y tallos presentaron actividad antimicrobiana en *Streptococcus Mutans* y *Porphyromonas Gingivalis*, al no mostrar valor significativo con respecto al caldo; pero los tallos podrían presentar mejor acción antibacteriana con respecto a *Porphyromonas Gingivalis* y *Streptococcus Mutans* debido a los metabolitos secundarios que ésta posee. Se encontró que los tres extractos presentan efecto bactericida con respecto a *Streptococcus Mutans* a 500ppm. Los tres extractos poseen metabolitos secundarios cardiotónicos, cumarinas y taninos en abundancia. **Conclusiones:** el extracto natural de *Spilanthes Acmella*, segmentada en tallos, hojas y flores, presentó efecto antibacteriano con respecto a las bacterias *Streptococcus Mutans* y *Porphyromonas Gingivalis*, específicamente efecto bactericida en *Streptococcus Mutans*, lo cual puede prevenir el progreso de la caries dental y la enfermedad periodontal.

**PALABRAS CLAVE:** extracto de plantas, antimicrobiano, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans*.

## INTRODUCCION

En la cavidad oral habitan más de 500 especies de bacterias, convirtiéndose así en una de las floras microbianas más variadas y complejas. <sup>1</sup> La caries dental y enfermedades periodontales son dos de las principales patologías dentales que afectan a la humanidad que surge de la colonización y la acumulación de microorganismos orales especialmente *Streptococcus Mutans* y *Porphyromonas Gingivalis*, seguido por el *Lactobacillus* y el *Actinomyces*. De ahí que el control de los microorganismos relacionados con la placa dental, así como del proceso carioso, es de vital importancia para el control de la enfermedad, y uno de los mecanismos es el uso de antimicrobianos. <sup>2</sup>

Actualmente, se han venido implementando tratamientos alternos a partir de extractos naturales con el fin de obtenerlos directamente del medio ambiente y aprovechar la demanda que existe en la fauna, además de poseer diversas ventajas entre las cuales destacan ser de fácil acceso y manejo, bajo costo y sobre todo tener pocos efectos colaterales indeseables. Hasta el momento, las plantas medicinales son consideradas una medicina alternativa que todavía está en uso y es una opción popular para la atención primaria de salud. Sin embargo, si las plantas son usadas incorrectamente también pueden tener efectos tóxicos. La Organización Mundial de la Salud ha estimado que alrededor del 80% de la población en los países en desarrollo no pueden pagar los medicamentos y se basan en las medicinas tradicionales, especialmente los que son a base de plantas, tales como la India, Bangladesh, China y Japón, incluyendo Tailandia. <sup>3</sup> Las especies que se utilizan con mayor frecuencia son de muchas familias:

---

<sup>1</sup> MERCADO, Juan Guerra Microbiología Bucal. En: BIOFARBO, 1993 Vol 2, no.2, p.69-72

<sup>2</sup> MOROMI H, CADILLO EM, PERFECTO DR. Antibacterianos naturales orales: Estudios en la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Odontología Sanmarquina. 2009;12(1):25-8.

<sup>3</sup> MOROMI H, CADILLO EM, PERFECTO DR. Antibacterianos naturales orales: Estudios en la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Odontología Sanmarquina. 2009;12(1):25-8.

Myrthaceae (17,8%), Punica (15,1%), Compositae (11,3%), Asteraceae (9,7%), Piperaceae (8,6%), Anacardiaceae (7,3%), Fagaceae (6,9%), Labiateae (5,4%), Leguminosae (5,1%), Butalaceae (0,5%) y otros (6,4%).<sup>4</sup>

Las hierbas medicinales se han utilizado para muchos fines, en particular en atención médica como antiasmáticos (86,79%), antirreumáticos (62%), diuréticos (60,22%), antiinflamatoria (29,62%), contra el cáncer (9,75%), antidiabéticos (8,33%), antimicrobianos, antifúngicos, antioxidantes, antialérgico, analgésico, anti-obesidad y antihipertensión.<sup>5</sup> En el cuidado dental se han empleado como anticaries, analgésicos, anestésicos locales, cicatrización de heridas, agentes antiinflamatorios y tratamiento de la estomatitis aftosa recurrente. También se ha utilizado para el cuidado de la belleza y como alimento de salud, por ejemplo, cúrcuma (*Curcuma longa* Linn.), jengibre (*Zingiber officinale*), hierba de limón (*Cymbopogon Citratos* Stapf), la cebolla verde (*Allium cepa* var. *aggregatum*), ajo (*Allium sativum* L.), la albahaca morada (*Ocimum sanctum* Linn.), la albahaca dulce (*Ocimum basilicum* L.), la albahaca peluda (*Ocimum basilicum* Lf var. *citratum* Volver.) y menta cocina (*Mentha cordifolia* Opiz.)<sup>6</sup>

Específicamente el caso de la planta *Spilantes Acmella*, es conocida por su efecto terapéutico contra el dolor de muelas, que además posee altos usos medicinales, con diversas propiedades bioactivas en el cuidado de la salud, la cosmetología y alimentos saludables; por lo que tiene una demanda cada vez mayor en todo el mundo, por su importante valor terapéutico y su alto potencial de desarrollo.<sup>7</sup>

---

<sup>4</sup> PRACHAYASITTIKUL V, PRACHAYASITTIKUL S, RUCHIRAWAT S, PRACHAYASITTIKUL V. High therapeutic potential of *Spilantes acmella*: A review. EXCLI journal. 2013;12:291-312.

<sup>5</sup> YADAV K, SINGH N. Micropropagation of *Spilantes acmella* Murr.–An important medicinal plant. Nature and Science. 2010;8(9):5-11.

<sup>6</sup> DUBEY S, MAITY S, SINGH M, SARAF SA, SAHA S. Phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Spilantes acmella*: a review. Advances in pharmacological sciences. 2013;2013.

<sup>7</sup> PRACHAYASITTIKUL V, PRACHAYASITTIKUL S, RUCHIRAWAT S, PRACHAYASITTIKUL V. High therapeutic potential of *Spilantes acmella*: A review. EXCLI journal. 2013;12:291-312.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La caries dental y las enfermedades periodontales son unas de las patologías más frecuentes en la cavidad oral y afectan a la mayor parte de la población<sup>8</sup>; por lo que se hace necesario realizar un enfoque más profundo y detallado de su mecanismo para entender el porqué de su patogenia y extensión.

Así pues, la caries dental se define como un proceso dinámico multifactorial en la cual intervienen múltiples factores como la colonización bacteriana<sup>9</sup>, el tiempo de exposición de éstas en la estructura dental, el nivel de pH presente en la cavidad oral, la higiene oral del paciente, el tipo de alimentos que ingiere la persona, entre otros. Sin embargo, cabe destacar que, así como es multifactorial, el inicio de ésta se da cuando existe un cúmulo de placa dental o biofilm provocada por los restos alimenticios adheridos a los dientes y que no fueron eliminados mediante el cepillado dental, la autoclisis o cualquier otro mecanismo para retirar estos. Luego, si este biofilm está presente, esa película adherida al diente provoca la colonización de microorganismos para que se adhieran a ésta y empiecen su proceso de colonización y destrucción de la estructura dental.<sup>10</sup> Entre los microorganismos más patogénicos de la caries dental encontramos al *Streptococcus Mutans*.<sup>11</sup>

Por otro lado, con respecto a la enfermedad periodontal, esta no es más que el resultado de la respuesta del organismo frente a la constante agresión de las

---

<sup>8</sup> HERRERA HERRERA, Alejandra, FRANCO OSPINA, Luis, FANG, Luis AND DÍAZ CABALLERO, Antonio Susceptibility of Porphyromonas gingivalis and Streptococcus mutans to Antibacterial Effect from Mammea americana. En: Advances in pharmacological sciences, 2014, Vol 2014, p. 1-6

<sup>9</sup> DUQUE DE ESTRADA RIVERÓN, Johany, PÉREZ QUIÑONEZ, José Alberto AND HIDALGO-GATO FUENTES, Iliana Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar. En: Revista cubana de estomatología, 2006, Vol 43, no.1, p 0-0.

<sup>10</sup> FEJERSKOV, Ole AND KIDD, Edwina *Dental caries: the disease and its clinical management*. Edtion ed.: John Wiley & Sons, 2009. ISBN 1444309285.

<sup>11</sup> NÚÑEZ, Daniel Pedro AND GARCÍA BACALLAO, Lourdes Bioquímica de la caries dental. En: Revista Habanera de Ciencias Médicas, 2010, Vol 9, no.2, p 156-166.

bacterias en la cavidad oral. El primer signo de aparición o surgimiento de la enfermedad periodontal es la gingivitis, la cual se define como la inflamación de la encía cuyo primer signo característico es el sangrado al cepillado o sondaje, acompañado de coloración roja, aspecto liso y brillante y edema.<sup>12</sup>

Si en este estadio inicial no se interviene ni se realiza ningún tratamiento, ya sea buena higiene oral, raspado y alisado radicular ni motivación o enseñanza en higiene oral, esto causará la evolución y exacerbación de esta inflamación localizada en encías, por lo cual ahora no solo se encontrará en la gingiva sino que además, se propagará a los tejidos periodontales como el ligamento periodontal. Ya en este punto pasa de ser una gingivitis a llamarse periodontitis, es decir, inflamación del periodonto. Cabe mencionar que, en esta patología, el principal organismo microbiano que actúa es la *Porphyromonas Gingivalis*.<sup>13 14</sup>

Es así como se puede observar que ambas patologías orales no son únicamente el resultado de la colonización y propagación bacteriana, sino que también son el producto de una deficiente higiene oral del paciente. Es por esta razón que se han utilizado otras medidas como antibióticos o antisépticos de tal manera que puedan actuar a nivel de la bacteriana y evitar su virulencia; pero, al mismo tiempo diversas bacterias han sabido defenderse con respecto a estos medicamentos y es lo que se conoce como la resistencia bacteriana. Por ende, la mayoría de las investigaciones actuales están encaminadas a solucionar o encontrar un tratamiento altamente efectivo para éstas, diferente a

---

<sup>12</sup> GONZÁLEZ DÍAZ, María Elena, TOLEDO PIMENTEL, Bárbara AND NAZCO RÍOS, Caridad Enfermedad periodontal y factores locales y sistémicos asociados. En: Revista cubana de estomatología, 2002, Vol 39, no.3, p 374-395.

<sup>13</sup> WU, Li-chen, FAN, Nien-chu, LIN, Ming-hui, CHU, Inn-ray, et al. Anti-inflammatory effect of spilanthol from *Spilanthes acmella* on murine macrophage by down-regulating LPS-induced inflammatory mediators. En: Journal of agricultural and food chemistry, 2008, Vol 56, no.7, p 2341-2349.

<sup>14</sup> BOSTANCI, Nagihan AND BELIBASAKIS, Georgios N *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. En: FEMS microbiology letters, 2012, Vol 333, no.1, p 1-9.

un tratamiento farmacológico y que sea natural, de tal manera que se evite en su mayoría la utilización de abundantes químicos y proveer a la población de un nuevo producto al alcance de todos que contenga resultados promisorios para así evitar que siga afectando en gran cantidad a la población y preservar en el mayor tiempo posible, todas las estructuras presentes en la cavidad oral.

Por consiguiente, el presente estudio pretende evaluar el efecto antimicrobiano de la *Spilanthes Acmella* específicamente en *Porphyromonas Gingivalis* y *Streptococcus Mutans* para poder intervenir en el tratamiento de la enfermedad periodontal y la caries dental. Pero, cabe preguntarse, **¿Tendrán el tallo, las flores y las hojas, el mismo efecto antimicrobiano en *Porphyromonas Gingivalis* y *Streptococcus Mutans*?**

## 2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente se encuentran diversos materiales e implementos al alcance de todas las personas referentes a mejorar la higiene oral, tales como los enjuagues bucales, las diferentes pastas dentales con diversos componentes, seda dental, entre otros.<sup>15</sup>

Sin embargo, muchos de los materiales mencionados anteriormente son fabricados en su mayoría por múltiples sustancias químicas las cuales pueden llegar a ser potencialmente peligrosas para el ser humano o irritantes a éste. Es por esto que hoy en día, se están llevando a cabo experimentos a partir de extractos de plantas naturales con el fin de encontrar un medicamento que sea efectivo y pueda encontrarse en el medio ambiente que nos rodeamos, sea tolerable a los tejidos y al organismo y, además, que sea de fácil acceso a la población mundial y mucho más accesible para la sociedad.<sup>16 17</sup>

Por consiguiente, existe una planta llamada *Spilanthes Acmella*, la cual es nativa de Brasil, y es comúnmente conocida como la planta “duerme lengua”. Ahora bien, entre los efectos naturales que ésta posee están: efecto anestésico (de aquí parte por qué se conoce de esa manera), analgésico e insecticida; por ende, tradicionalmente ha sido utilizada para el alivio del dolor dental, dolores

---

<sup>15</sup> VAN DER WEIJDEN, Fridus AND SLOT, Dagmar Else Oral hygiene in the prevention of periodontal diseases: the evidence. En: Periodontology 2000, 2011, Vol 55, no.1, p 104-123.

<sup>16</sup> TEQUIDA-MENESES, Martín, CORTEZ-ROCHA, Mario, ROSAS-BURGOS, Ema Carina, LÓPEZ-SANDOVAL, Susana, et al. Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. En: Revista iberoamericana de micología, 2002, Vol 19, p 84-88.

<sup>17</sup> BOONEN, Jente, BAERT, Bram, BURVENICH, Christian, BLONDEEL, Phillip, et al. LC-MS profiling of N-alkylamides in *Spilanthes acmella* extract and the transmucosal behaviour of its main bio-active spilanthol. En: Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2010, Vol 53, no.3, p 243-249.

de cabeza, tratamiento del asma, reumatismo, fiebre, dolor de garganta y hemorroides.<sup>18 19 20</sup>

Adicionalmente, *Spilanthes Acmella* tiene un componente activo el cual ayuda para el tratamiento de infecciones microbianas a corto o largo plazo.<sup>21 22</sup> Sin embargo, existen muy pocos o nulos estudios acerca del efecto antimicrobiano que posee la planta con respecto a los microorganismos patogénicos de la cavidad oral, los cuales están presentes en la caries dental, periodontitis, gingivitis, sangrado gingival y/o reducción de la placa dental; por lo tanto, como se mencionó anteriormente, debido a que la enfermedad periodontal y la caries dental están provocadas por diferentes factores entre los cuales están la presencia de microorganismos presentes en el biofilm, entre los que encontramos a las *Porphyromonas Gingivalis* y *Streptococcus Mutans*, se pretende intervenir en el proceso de estas bacterias mediante la utilización del extracto de *Spilanthes Acmella* para evitar la propagación y/o evolución de las patologías.<sup>23</sup>

---

<sup>18</sup> CHAKRABORTY, A, DEVI, RK, RITA, S, SHARATCHANDRA, KH, et al. Preliminary studies on antiinflammatory and analgesic activities of *Spilanthes acmella* in experimental animal models. En: Indian journal of pharmacology, 2004, Vol 36, no.3, p 148.

<sup>19</sup> DIAS, AMA, SANTOS, P, SEABRA, IJ, JÚNIOR, RNC, et al. Spilanthol from *Spilanthes acmella* flowers, leaves and stems obtained by selective supercritical carbon dioxide extraction. En: The Journal of Supercritical Fluids, 2012, Vol 61, p 62-70.

<sup>20</sup> SAVADI, RV, YADAV, R AND YADAV, N Study on immunomodulatory activity of ethanolic extract of *Spilanthes acmella* Murr. leaves. En: Ind. J. Nat. Prod. Res, 2010, Vol 1, p 204-207.

<sup>21</sup> LENG, Tan Chee, PING, Ning Shu, LIM, Boey Peng AND KENG, Chan Lai Detection of bioactive compounds from *Spilanthes acmella* (L.) plants and its various in vitro culture products. En: Journal of Medicinal Plants Research, 2011, Vol 5, no.3, p 371-378.

<sup>22</sup> ARORA, Shefali, VIJAY, Saurabh AND KUMAR, Deepak Phytochemical and antimicrobial studies on the leaves of *Spilanthes acmella*. En: J. Chem. Pharm. Res, 2011, Vol 3, no.5, p 145-150.

<sup>23</sup> WONGSAWATKUL, Orapin, PRACHAYASITTIKUL, Supaluk, ISARANKURA-NA-AYUDHYA, Chartchalerm, SATAYAVIVAD, Jutamaad, et al. Vasorelaxant and antioxidant activities of *Spilanthes acmella* Murr. En: International journal of molecular sciences, 2008, Vol 9, no.12, p 2724-2744.

Diversos investigadores han encontrado que las diferentes partes que componen esta planta presentan distintos efectos en el organismo<sup>24 25</sup>, por lo cual sería necesario evaluar por separado el tallo, las flores y las hojas para poder determinar cuál de las tres partes posee el efecto antibacteriano que se busca o si las tres poseen esta propiedad, y cuál de ellas es la más efectiva como agente bacteriostático o bactericida en las bacterias de la cavidad oral.<sup>26</sup>

27 28

---

<sup>24</sup> TANWER, Babeet S, CHOUDHARY, Ramkishan AND VIJAYVERGIA, Rekha In vitro and in vivo comparative study of primary metabolites and antioxidant activity in *Spilanthes acmella* Murr. En: *Int. J. Biotechnol. Biochem*, 2010, Vol 6, no.5, p 819-825.

<sup>25</sup> RANI, S AND MURTY, S Antifungal potential of flower head extract of *Spilanthes acmella* Linn. En: *African Journal of Biomedical Research*, 2006, Vol 9, no.1, p.

<sup>26</sup> PAVUNRAJ, Manickam, BASKAR, Kathirvelu, JANARTHANAN, Sundaram AND ARUMUGAM, Munusamy Antibacterial and antifeedant activities of *Spilanthes acmella* leaf extract against Gram-negative and Gram-positive bacteria and brinjal fruit borer, *Leucinodes orbonalis* larvae. En: *Journal of Coastal Life Medicine*, 2014, Vol 2, no.12, p 980-985.

<sup>27</sup> NAKATANI, Nobuji AND NAGASHIMA, Mayumi Pungent alkaloids from *Spilanthes acmella* L. var. *oleracea* Clarke. En: *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 1992, Vol 56, no.5, p 759-762.

<sup>28</sup> HAW, Ang Boon AND KENG, Chan Lai Micropropagation of *Spilanthes acmella* L., a bio-insecticide plant, through proliferation of multiple shoots. En: *J. Appl. Hort*, 2003, Vol 5, no.2, p 65-68.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antibacteriana del extracto de la planta *Spilanthes Acmella* en *Porphyromonas Gingivalis* y *Streptococcus Mutans*.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar *in vitro* la actividad antibacteriana del extracto etanólico de flores, hojas y tallos de *Spilanthes Acmella* en *Porphyromonas Gingivalis* y *Streptococcus Mutans*.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) del extracto etanólico de flores, hojas y tallos de *Spilanthes Acmella* en *Porphyromonas Gingivalis* y *Streptococcus Mutans* por medio de grados de turbidez en placas de 96 pozos evaluados con espectrofotometría.
- Determinar la concentración mínima bactericida (MBC) del extracto etanólico de flores, hojas y tallos de *Spilanthes Acmella* en *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus mutans*.
- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto de tallos, hojas y flores de *Spilanthes Acmella* mediante un análisis preliminar fitoquímico.
- Comparar la actividad antibacteriana de las diferentes partes (flores, hojas y tallos) del extracto etanólico de *Spilanthes Acmella*.

#### 4. MARCO TEÓRICO

La cavidad oral es un sitio con presencia de múltiples nichos de microorganismos que se encuentran en un equilibrio, esperando cualquier oportunidad para activarse y hacer virulencia. Adicionalmente, cuando se acumula la placa bacteriana en las paredes de los dientes, éstas se adhieren al órgano dentario y se empieza a crear el biofilm.<sup>29</sup> El biofilm es una placa bacteriana adherida que le permite a otros nuevos microorganismos adherirse y así empezar un proceso infeccioso que puede destruir las estructuras del diente.<sup>30 31</sup> Estas bacterias en el biofilm se encuentran activas y provocan una fluctuación en el pH de la cavidad oral, haciendo un ambiente más propicio para perder minerales del diente y así disolver las estructuras duras del órgano dentario y crear una lesión conocida como la caries dental.<sup>32 33</sup>

Ahora bien, en la cavidad oral existen más de 700 especies diferentes de microorganismos que aprovechan cuando existe un desbalance en el equilibrio entre microorganismos, cavidad oral y ecosistema. Cuando este equilibrio se rompe, los microorganismos empiezan a colonizar e iniciar un proceso infeccioso que provoca la progresión de la caries dental y la enfermedad periodontal.<sup>34</sup> Entre todas estas especies, los microorganismos más comunes y prevalentes en

---

<sup>29</sup> MARSH, Philip D, MOTER, Annette AND DEVINE, Deirdre A Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. En: *Periodontology* 2000, 2011, Vol 55, no.1, p 16-35.

<sup>30</sup> METWALLI, Khalid H, KHAN, Shariq A, KROM, Bastiaan P AND JABRA-RIZK, Mary Ann Streptococcus mutans, Candida albicans, and the human mouth: a sticky situation. En: *PLoS Pathog*, 2013, Vol 9, no.10, p e1003616.

<sup>31</sup> GROSS, Erin L, BEALL, Clifford J, KUTSCH, Stacey R, FIRESTONE, Noah D, et al. Beyond Streptococcus mutans: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. En: *PloS one*, 2012, Vol 7, no.10, p e47722.

<sup>32</sup> FEJERSKOV, Ole Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. En: *Caries research*, 2004, Vol 38, no.3, p 182-191.

<sup>33</sup> NICOLAS, Guillaume G AND LAVOIE, Marc C [Streptococcus mutans and oral streptococci in dental plaque]. En: *Canadian journal of microbiology*, 2011, Vol 57, no.1, p 1-20.

<sup>34</sup> OJEDA-GARCÉS, Juan Carlos, OVIEDO-GARCÍA, Eliana AND SALAS, Luis Andrés Streptococcus mutans and dental caries. En: *CES Odontología*, 2013, Vol 26, no.1, p 44-56.

la presencia y progresión de caries dental y enfermedad periodontal encontramos el *Streptococcus Mutans* y la *Porphyromonas Gingivalis* respectivamente.<sup>35 36</sup>

El *Streptococcus Mutans* es una bacteria Gram-positiva que vive en la cavidad oral de los humanos; es altamente cariogénica debido a su capacidad de producir grandes cantidades de glucanos y ácidos, lo cual excede a la capacidad buffer que tiene la saliva de compensar el cambio en el pH, por lo cual le da una ventaja ante el resto de microorganismos no cariogénicos que se encuentran en ambientes de pH bajo.<sup>37</sup> Por tal razón, debido a la capacidad de sobrevivir en medios ácidos y de producir ácido, esta bacteria se alimenta de los metabolitos provenientes de los azúcares, por lo que un paciente con alta ingesta de azúcares tiene un alto riesgo de padecer de caries dental y provocar la colonización y activación del *Streptococcus Mutans*.<sup>38</sup>

Esta bacteria produce ácido láctico, ácido propiónico, ácido acético y ácido fórmico al metabolizar la sacarosa, glucosa y fructosa presentes en diversos carbohidratos<sup>39</sup>; así pues el ácido se disocia en el esmalte dental y libera hidrogeniones que causa la disolución de los minerales del esmalte, liberando calcio y fosfato fuera de esta estructura y así, desmineralizando la estructura

---

<sup>35</sup> CABALLERO, AD, REYES, RV, LLERENA, LP, MONTERROSA, MA, et al. Periodontitis, *Porphyromonas gingivalis* and its relation to quorum sensing expression. En: Revista cubana de estomatología, 2010, Vol 47, no.4, p 404-416.

<sup>36</sup> KRZYŚCIAK, W, JURCZAK, A, KOŚCIELNIAK, D, BYSTROWSKA, B, et al. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. En: European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2014, Vol 33, no.4, p 499-515.

<sup>37</sup> NICOLAS, Guillaume G AND LAVOIE, Marc C [*Streptococcus mutans* and oral streptococci in dental plaque]. En: Canadian journal of microbiology, 2011, Vol 57, no.1, p 1-20.

<sup>38</sup> KRZYŚCIAK, W, JURCZAK, A, KOŚCIELNIAK, D, BYSTROWSKA, B, et al. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. En: European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2014, Vol 33, no.4, p 499-515.

<sup>39</sup> BOWEN, WH AND 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.

dentaria y provocando una destrucción gradual del órgano dentario y es lo que conocemos como la caries dental.<sup>40</sup>

Adicionalmente, el *Streptococcus Mutans* no solo es el primer colonizador en adherirse a la placa bacteriana, sino que también realiza el quorum sensing, donde llama a las demás bacterias para que también lleguen y colonicen el sitio, lo cual lo hace más virulento y agresivo, progresando así la caries dental.<sup>41</sup>

Por tal razón, la caries dental es una de las enfermedades que más se deben tener en cuenta puesto que ésta es capaz de destruir gradualmente las estructuras del diente, provocando en última instancia la pérdida del órgano dentario. Así pues, la caries dental se considera como una enfermedad infecciosa multifactorial que ocurre cuando se pierde el equilibrio fisiológico entre el mineral dentario y el biofilm.<sup>42 43</sup>

Así, la caries dental se considera la enfermedad crónica más común y prevalente en la infancia; ésta puede causar dolor y afectar la calidad de vida de las personas, puesto que en casos severos puede provocar molestia durante la masticación, y en última instancia, causar la pérdida del órgano dentario.<sup>44</sup> El principal colonizador y causante de la caries dental es el *Streptococcus Mutans*,

---

<sup>40</sup> OJEDA-GARCÉS, Juan Carlos, OVIEDO-GARCÍA, Eliana AND SALAS, Luis Andrés Streptococcus mutans and dental caries. En: CES Odontología, 2013, Vol 26, no.1, p 44-56.

<sup>41</sup> CHAIYA, A, SARAYA, S, CHUAKUL, W AND TEMSIRIRIRKKUL, R Screening for dental caries: Preventive activities of medicinal plants against Streptococcus mutans. En: Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013, Vol 40, no.1, p 9-17.

<sup>42</sup> FEJERSKOV, Ole Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. En: Caries research, 2004, Vol 38, no.3, p 182-191.

<sup>43</sup> CHAIYA, A, SARAYA, S, CHUAKUL, W AND TEMSIRIRIRKKUL, R Screening for dental caries: Preventive activities of medicinal plants against Streptococcus mutans. En: Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013, Vol 40, no.1, p 9-17.

<sup>44</sup> GROSS, Erin L, BEALL, Clifford J, KUTSCH, Stacey R, FIRESTONE, Noah D, et al. Beyond Streptococcus mutans: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. En: PloS one, 2012, Vol 7, no.10, p e47722.

como se mencionó anteriormente, por lo cual los estudios actuales se centran en atacar la bacteria para evitar el inicio o progresión de la caries dental.

Por consiguiente, día a día investigadores se encuentran en una búsqueda constante del mejor tratamiento para la caries dental, ya sea actuando directamente en el *Streptococcus Mutans* o actuando a nivel de la cavidad oral para evitar su colonización o la pérdida del equilibrio entre los minerales dentales y el biofilm. Por ende, el tratamiento preventivo más indicado y principal para los pacientes es tener una buena higiene oral mediante una correcta enseñanza en técnicas de cepillado y motivación para que mantengan una correcta higiene, puesto que así se evita el acúmulo de placa bacteriana y la posterior colonización del *Streptococcus Mutans* y la creación de un ambiente ácido.<sup>45</sup>

Por otro lado, la enfermedad periodontal también es una de las enfermedades más comunes de la cavidad oral junto con la caries dental, por lo cual se hace necesario también estudiar sus causas y consecuencias para lograr el tratamiento ideal para ello. Por tanto, la enfermedad periodontal es una enfermedad inflamatoria de los tejidos periodontales causada por bacterias, entre las cuales encontramos *Porphyromonas Gingivalis*, *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*, *Tannerella Forsythia*, *Prevotella Intermedia*, *Treponema Denticola*, entre otros. Las bacterias mencionadas anteriormente son las consideradas más agresivas para la lesión, por tanto, son las que más se deben tener en cuenta.<sup>46 47</sup>

---

<sup>45</sup> CHAIYA, A, SARAYA, S, CHUAKUL, W AND TEMSIRIRIRKKUL, R Screening for dental caries: Preventive activities of medicinal plants against *Streptococcus mutans*. En: Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013, Vol 40, no.1, p 9-17.

<sup>46</sup> CABALLERO, AD, REYES, RV, LLERENA, LP, MONTERROSA, MA, et al. Periodontitis, *Porphyromonas gingivalis* and its relation to quorum sensing expression. En: Revista cubana de estomatología, 2010, Vol 47, no.4, p 404-416.

<sup>47</sup> PEÑA SISTO, Maritza, PEÑA SISTO, Lilibiana, DÍAZ FELIZOLA, Ángela, TORRES KEIRUZ, Deysi, et al. La enfermedad periodontal como riesgo de enfermedades sistémicas. En: Revista cubana de estomatología, 2008, Vol 45, no.1, p 0-0.

Ahora bien, estas bacterias son capaces de colonizar en los tejidos periodontales puesto que se encuentran adheridas al biofilm mencionado anteriormente, el cual se localiza también subgingivalmente y es justo aquí donde ellas logran situarse debido a que se encuentran en ambientes con poca oxigenación, como lo es el surco gingival.<sup>48</sup>

Más aun, la *Porphyromonas Gingivalis* es la bacteria más frecuentemente asociada a la forma crónica de la enfermedad, e incluso se ha encontrado en un 85% de los sitios con la enfermedad periodontal<sup>49</sup>; Esta es una bacteria gram-negativa anaerobia, por lo cual necesita un medio libre de oxígeno para poder crecer y colonizar, como lo puede encontrar en el surco gingival.<sup>50</sup> Adicional a esto, también requiere de hemina y vitamina K para su crecimiento; por ende, se observa como una bacteria de pigmentación negra.<sup>51</sup>

Entre los factores de virulencia de la *Porphyromonas Gingivalis* encontramos que posee de una cápsula, que la ayuda a evadir el sistema inmunológico; de una endotoxina, compuesta por un lípido que interrumpe la homeostasis inmunológica del huésped lo cual crea inflamación gingival asociada con destrucción del tejido; vesículas de membrana externa, que contiene enzimas que provocan daños a las células periodontales y los neutrófilos; hemaglutininas, que promueven la colonización mediante la unión bacteriana a receptores de células humanas; fimbrias, que le dan capacidad de unirse a otros sustratos; proteinasas

---

<sup>48</sup> GUILARTE, Carolina AND PERRONE, Marianella Bacterias Periodontopatógenas: Bacilos Anaerobios gran negativos como agentes Etiológicos de la Enfermedad Periodontal. En: Acta Odontológica Venezolana, 2005, Vol 43, no.2, p 198-204.

<sup>49</sup> PERFECTO, Donald Ramos, NAKATA, Hilda Moromi AND CADILLO, Elba Martínez Porphyromonas gingivalis: patógeno predominante en la periodontitis crónica. En: Odontología Sanmarquina, 2011, Vol 14, no.1, p 34-38.

<sup>50</sup> MEULMAN, T, PERUZZO, DC, STIPP, RN, GONCALVES, PF, et al. Impact of Porphyromonas gingivalis inoculation on ligature-induced alveolar bone loss. A pilot study in rats. En: Journal of periodontal research, 2011, Vol 46, no.5, p 629-636.

<sup>51</sup> GUILARTE, Carolina AND PERRONE, Marianella Bacterias Periodontopatógenas: Bacilos Anaerobios gran negativos como agentes Etiológicos de la Enfermedad Periodontal. En: Acta Odontológica Venezolana, 2005, Vol 43, no.2, p 198-204.

cisteínproteasas, que proporcionan nutrientes para el crecimiento bacteriano y causar daño colateral al huésped.<sup>52</sup>

Según estudios realizados, señalan que la *Porphyromonas Gingivalis* es la bacteria más patógena del grupo de bacilos anaerobios gram-negativos, y que su poder patógeno radica en su colonización, capacidad de destrucción de tejidos periodontales y evasión de las defensas del huésped; lo cual le da gran capacidad de permanecer en el sitio de la lesión, en este caso, el surco gingival y crear una progresión gradual y severa de la enfermedad periodontal.<sup>53 54</sup>

Por consiguiente, la mayoría de los estudios actuales se centran en actuar a nivel de esta bacteria para evitar la progresión de la enfermedad periodontal, la interrupción de ésta o prevenir la aparición de ella. Por esta razón, la caries dental y la enfermedad periodontal son dos enfermedades estudiadas diariamente con el fin de ayudar a la salud periodontal de las personas, para tener una consecuente calidad de vida; por ende, una de las mejores maneras de evitar el inicio o progresión de ellas es actuando con la etiología, las cuales serían las principales bacterias: *Streptococcus Mutans* y *Porphyromonas Gingivalis*.

Actualmente, entre los tratamientos que se han llevado a cabo con respecto a estas patologías y bacterias encontramos el uso de extractos medicinales a partir de plantas o vegetales. El uso de estos extractos ha surgido como una medida viable y económica, debido a que se puede aprovechar lo que nos brinda la misma naturaleza para obtener tratamientos eficaces y de bajo costo con respecto a

---

<sup>52</sup> PERFECTO, Donald Ramos, NAKATA, Hilda Moromi AND CADILLO, Elba Martínez *Porphyromonas gingivalis*: patógeno predominante en la periodontitis crónica. En: *Odontología Sanmarquina*, 2011, Vol 14, no.1, p 34-38.

<sup>53</sup> BOSTANCI, Nagihan AND BELIBASAKIS, Georgios N *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. En: *FEMS microbiology letters*, 2012, Vol 333, no.1, p 1-9.

<sup>54</sup> SHADDOX, LM, ALFANT, B, TOBLER, J AND WALKER, C Perpetuation of subgingival biofilms in an in vitro model. En: *Molecular oral microbiology*, 2010, Vol 25, no.1, p 81-87.

patologías en el ser humano, que en este caso, será con respecto a la caries dental y la enfermedad periodontal.<sup>55 56</sup>

Hace muchas décadas, cuando las instalaciones de los dentistas no estaban disponibles, nuestros antepasados llevaron remedios herbales para el alivio de diversos tipos de dolencias. El uso de plantas para el tratamiento de las enfermedades se remonta a por lo menos 60.000 años. Hay alrededor de 250.000 especies de plantas, de las cuales el 15% han sido evaluadas fitoquímicamente.

Se han identificados 122 compuestos obtenidos a partir de 94 especies de plantas, 80% de estos compuestos tenían un uso similar para el uso actual del ingrediente activo de la planta; los compuestos bioactivos obtenidos a partir de plantas muestran menor cantidades de toxicidad y tienen un nuevo mecanismo de acción. Entre los remedios caseros más comunes para el dolor de muelas son agua salada, el clavo, el alcohol, peróxido de hidrógeno, extractos de vainilla, extractos de almendras, extracto de menta, árbol del té aceite, cal, etc. El resultado de múltiples estudios a cerca de diversas plantas tradicionales siendo utilizado para estos fines, siendo uno de ellos *Spilanthes Acmella*.<sup>57</sup>

*Spilanthes* (Compositae o Asteraceae) es un género que consta de más de 60 especies que están ampliamente distribuidos en zonas tropicales y regiones subtropicales del mundo, tales como África, América, Borneo, India, Sri Lanka y Asia *Spilanthes Acmella* es originaria de Brasil y es cultivada durante todo el año

---

<sup>55</sup> HOLETZ, Fabíola Barbiéri, PESSINI, Greisiele Lorena, SANCHES, Neviton Rogério, CORTEZ, Diógenes Aparício Garcia, et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. En: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2002, Vol 97, no.7, p 1027-1031.

<sup>56</sup> PERAZZO, Fábio Ferreira, SILVA, Ricardo Souza, CARVALHO, José Carlos Tavares AND GROppo, FC Utilización sustancias naturales en Odontología. En: Jornal Brasileiro de Fitomedicina, 2004, Vol 2, no.1, p 9-15.

<sup>57</sup> DUBEY, Suchita, MAITY, Siddhartha, SINGH, Mahendra, SARAF, Shubhini A, et al. Phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Spilanthes acmella*: a review. En: Advances in pharmacological sciences, 2013, Vol 2013, p.

como ornamentales o planta medicinal. Es una planta o hierba anual de corta duración que es de 40-60 centímetros alto. Se cultiva en la zona húmeda y tiene baja tasa de germinación o pobre propagación vegetal. Sus flores y las hojas tienen sabor picante y cuando es tocado va acompañado de sensación de hormigueo y entumecimiento.<sup>58</sup>

Estas especies de plantas se han utilizado comúnmente como un remedio popular, p.ej. para el dolor de muelas, fiebre reumática, así como especias para aperitivo japonés. Los usos tradicionales de toda la planta (por ejemplo, flores, hojas, raíces, tallos y partes aéreas) de *Spilanthes* han sido utilizados en el cuidado de la piel y alimentos. Particularmente, *S. acmella* o *S. oleracea* (Paracress o globo ocular de la planta), es una planta “anti dolor de muelas” conocida y se ha utilizado en la medicina tradicional para muchos propósitos.

En odontología esta planta se caracteriza por poseer diversas propiedades tales como: anestésico local, en estudios realizados por Chakraborty et al, mostraron la anestesia local característica de *Spilanthes Acmella* en ratas en comparación con Xilocaina<sup>59</sup>; dentífrico, ya que el spilantol se ha incorporado en las pastas de dientes y enjuagues bucales con el objetivo de proporcionar una nueva duración sabor a menta; también aumenta la salivación, lo que mejora apetito<sup>60</sup>; tiene propiedades de igual manera contra el dolor de muelas, tradicionalmente, *Spilanthes Acmella* se conoce como “planta anti dolor de muelas” debido a que las cabezas de las flores de las plantas picantes al ser masticados por la gente, amortiguan o adormecen el dolor de dientes, problemas de garganta o parálisis de

---

<sup>58</sup> PRACHAYASITTIKUL, Veda, PRACHAYASITTIKUL, Supaluk, RUCHIRAWAT, Somsak AND PRACHAYASITTIKUL, Virapong High therapeutic potential of *Spilanthes acmella*: A review. En: EXCLI journal, 2013, Vol 12, p 291-312.

<sup>59</sup> CHAKRABORTY, A, DEVI, BRK, SANJEBAM, R, KHUMBONG, S, et al. Preliminary studies on local anesthetic and antipyretic activities of *Spilanthes acmella* Murr. in experimental animal models. En: Indian journal of pharmacology, 2010, Vol 42, no.5, p 277.

<sup>60</sup> HATASA, Shigeyoshi AND IIOKA, I. Spilanthol-containing compositions for oral use. In.: Google Patents, 1973.

la lengua.<sup>61</sup> De la misma manera esta planta tiene efectos antibacteriales, antifungicos y antiinflamatorios.<sup>62 63 64</sup>

Por tal razón, para realizar el análisis antibacteriano de cada extracto con respecto a bacterias específicas se utilizan distintos tipos de procedimientos entre los cuales se encuentra la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual será interpretada como la mínima concentración del agente antimicrobiano que inhibe la multiplicación y producción de crecimiento de una cepa bacteriana dada en el sistema de prueba; y la concentración mínima bactericida (CMB), donde las muestras seleccionadas serán aquellas concentraciones que no demuestren crecimiento bacteriano durante la determinación de la CMI (no existencia de diferencia significativa entre la densidad óptica de las muestras y el caldo).

---

<sup>61</sup> PRACHAYASITTIKUL, Veda, PRACHAYASITTIKUL, Supaluk, RUCHIRAWAT, Somsak AND PRACHAYASITTIKUL, Virapong High therapeutic potential of *Spilanthes acmella*: A review. En: EXCLI journal, 2013, Vol 12, p 291-312.

<sup>62</sup> JAHAN, Noor, KHATOON, Razia, AHMAD, Siraj AND SHAHZAD, Anwar Evaluation of antibacterial potential of medicinal plant *Spilanthes acmella* Murr. and its in vitro raised callus against resistant organisms especially those harbouring bla genes. En: Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2013, Vol 3, no.10, p 119.

<sup>63</sup> PHONGPAICHIT, Souwalak, SUBHADHIRASAKUL, Sanan AND WATTANAPIROMSAKUL, Chatchai Antifungal activities of extracts from Thai medicinal plants against opportunistic fungal pathogens associated with AIDS patients. En: Mycoses, 2005, Vol 48, no.5, p 333-338.

<sup>64</sup> PRACHAYASITTIKUL, Supaluk, SUPHAPONG, Saowapa, WORACHARTCHEEWAN, Apilak, LAWUNG, Ratana, et al. Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. En: Molecules, 2009, Vol 14, no.2, p 850-867.

## 5. METODOLOGÍA

**TIPO DE ESTUDIO:** Experimental *in vitro*.

### 5.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRA, OBTENCIÓN DEL EXTRACTO Y PRUEBA DE SOLUBILIDAD

Como primera medida, se recolectó la muestra de *Spilanthes Acmella* en zonas rurales de la ciudad de Cartagena, para luego procesar cada una de sus partes, es decir, tallo, flor y hojas de la planta. Una muestra de la planta fue enviada al herbario de la Universidad de Antioquia para la identificación taxonómica. Para la obtención de los extractos se realizó a través de la maceración de las hojas de ambas plantas y conservación en un recipiente de vidrio con etanol al 75% por 1 semana. Obteniendo tres extractos oscuros de consistencia viscosa, los cuales se eliminaron mediante rotaevaporación. Se procedió luego a filtrar el extracto debido a que quedaban muchos grumos en el extracto y estos podrían representar sesgo en el experimento.

Una vez obtenidos los extractos se realizó la prueba de solubilidad utilizando diferentes solventes como Etanol, Dimetilsufóxido y Metanol. Posterior, se tuvo que volver a filtrar el extracto con etanol al 75%. Después, el extracto de *Spilanthes Acmella* se disolvió en Etanol al 75% obteniendo una concentración de 100.000ppm.

## 5.2. CULTIVO DE MICROORGANISMOS

Para el cultivo de *Streptococcus Mutans* (ATCC25175) se utilizó el caldo Trypticasa de soya suplementado con extracto de levadura, sacarosa, agar-agar y bacitracina (TYS20B). La bacteria, preservada a una temperatura de -20°C, se sacó del congelador y se esperó a que estuviera a temperatura ambiente. El stick que contenía la bacteria, fue sacado de su empaque en condiciones asépticas óptimas con un hisopo se tomó la bacteria y haciendo movimientos circulares de afuera hacia adentro se hizo el cultivo sobre las cajas de Petri con el caldo nutritivo anteriormente mencionado. Este procedimiento se realizó sobre todas las cajas de Petri utilizadas. Una vez finalizado el cultivo las cajas de Petri fueron rotuladas con el nombre de la bacteria y la fecha del cultivo y se llevaron a una jarra de anaerobiosis utilizando las bolsas Anaerogen (Oxoid® UK) para alcanzar dicha condición. El cultivo se llevó a cabo por un periodo de 48 horas a una temperatura de 37°C se obtuvo un crecimiento abundante de la bacteria.

Para el cultivo de la *Porphyromonas Gingivalis* (ATCC33277) se utilizó como medio de cultivo el agar Brucella suplementado con hemina (5ug/ml), vitamina K (1mg/ml) y 5% de sangre humana. El procedimiento fue el mismo utilizado para el *Streptococcus Mutans* en condiciones de anaerobiosis y se incubó por 5 días a 37°C, también obteniendo crecimiento de este.

## 5.3. CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO

Para el *Streptococcus mutans* se tomaron colonias de los medios de cultivo y se inocularon en tubos con caldo nutritivo Trypticasa de soya suplementado con extracto de levadura, sacarosa, y bacitracina y se verificó que quedara a una concentración de 0.08 a 0,1 según la escala de McFarland utilizando un

espectrofotómetro de microplacas Multiskan EX (Thermo®, UK). Una vez alcanzada esta concentración el inóculo se llevó a incubación a 37°C en condiciones de anaerobiosis manejando el método de jarra con vela para alcanzar dichas condiciones. Utilizando una placa de poliestireno de 96 pozos se evaluó la absorbancia del inóculo después de transcurrido 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 24 y 48 horas dando como resultado la curva de crecimiento.

De la misma forma con *Porphyromonas Gingivalis* se realizó la curva de crecimiento utilizando caldo Brucella suplementado con hemina (5ug/ml), vitamina K (1mg/ml) y 5% de sangre humana. El periodo de lectura también tuvo un tiempo de duración de 48 horas.

#### **5.4. PREPARACION DE LOS EXTRACTOS PARA SU EVALUACIÓN**

Para realizar la evaluación de los extractos estos fueron disueltos y llevados a concentraciones de 100.000ppm y así contar con una solución stock de cada uno. Dichas disoluciones fueron realizadas en tubos eppendorf estériles y bajo condiciones óptimas en una cabina de flujo laminar vertical, utilizando el solvente que mejor mostró capacidad para disolver el extracto previamente probado, el cual fue el Etanol.

#### **5.5. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LOS SOLVENTES**

Siguiendo el orden metodológico, se realizó el diseño de la placa de poliestireno de 96 pozos teniendo todos los controles de esterilidad, de color, de toxicidad de los solventes y de crecimiento tanto positivo como negativo con gentamicina a 16ppm. El diseño se observa en la **FIGURA 1**

VALOR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AGUA 100 µl						CALDO 100 µl					
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												
CONTROL DE ESTERILIDAD												
CONTROL DE COLOR												
CONTROL DE CRECIMIENTO												
PRUEBA DE SENSIBILIDAD												
TOXICIDAD DEL SOLVENTE												

**Figura 1.** Diseño de la placa de poliestireno para la prueba de toxicidad de solventes de *Streptococcus Mutans* y *Porphyromonas Gingivalis* en extracto de *Spilanthes Acmella*.

### 5.6. EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE *Porphyromonas gingivalis* Y *Streptococcus mutans* A EXTRACTOS DE *Spilanthes acmella*

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 *Spilanthes Acmella*, para esto se utilizó una concentración de 8000 ppm para cada uno de los extractos de la planta. Se tomaron de las soluciones stock, las cuales se encontraban a una concentración de 100.000 ppm, 10µ y se vertieron en tubos eppendorf de 1,5 ml previamente esterilizados donde cada uno contenía 800µ de extracto y 200µl de etanol, con lo que se alcanzó una solución de 100.000ppm la cual al momento de ser depositada en el pozo en conjunto con el inóculo de bacterias resultó con una concentración de 8.000ppm.

Es importante resaltar que lo último que se agregó a la placa de 96 pozos fue el inóculo de bacterias el cual se preparó utilizando el caldo correspondiente para

cada bacteria (TYS20B para *Streptococcus mutans* y caldo Brucella suplementado con hemina (5ug/ml), vitamina K (1mg/ml) y 5% de sangre humana para *Porphyromonas Gingivalis*), tomando la mayor cantidad de colonias de bacterias de las cajas de Petri e inoculándolas en los tubos con caldo y verificando que estas quedaran a una concentración de 0,08 a 0,1 según la escala de McFarland. Como se observa en la **FIGURA 2 Y 3**.

Posteriormente la placa preparada se llevó 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*. Tiempo transcurrido se realizó la medición de la observación en un lector de microplacas Multiskan EX (Thermo®, UK).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	agua						caldo					
B	tallos 500ppm				tallos 1000ppm				hojas 500ppm			
C	hojas 1000ppm				flores 500ppm				flores 1000ppm			
D	ino+tallos 500ppm						ino+tallos 1000ppm					
E	ino+hojas 500ppm						ino+hojas 1000ppm					
F	ino+flores 500ppm						ino+flores 1000ppm					
G	inoculo											
H	inoculo+gentamicina											

**Figura 2.** Diseño de placa para la evaluación de la sensibilidad de *Porphyromona Gingivalis* en el extracto de *Spilanthes Acmella*.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AGUA						CALDO					
agua + 1000ppm HOJAS				agua + 1000ppm TALLOS				agua + 1000ppm FLORES			
agua + 500ppm HOJAS				agua + 500ppm TALLOS				agua + 500ppm FLORES			
inóculo + 1000ppm HOJAS				inóculo + 1000ppm TALLOS				inóculo + 1000ppm FLORES			
inóculo + 500ppm HOJAS				inóculo + 500ppm TALLOS				inóculo + 500ppm FLORES			
inóculo + agua				gentamicina + inóculo							

**Figura 3.** *Diseño de placa para la evaluación de la sensibilidad de Streptococcus Mutans en el extracto de Spilanthes Acmella.*

### **5.7. CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC).**

Se evaluó haciendo uso del método de microdilución en caldo, descrita por la NCCLS en 2003. Para determinar la concentración mínima inhibitoria de cada uno de los extractos de *Spilanthes Acmella* se prepararon 14 concentraciones partiendo de 500ppm (siendo esta la concentración más baja que presento actividad antibacteriana en la prueba de sensibilidad bacteriana) hasta llegar a una concentración de 0,0610ppm. Para realizar estas concentraciones, a partir de la solución que se encontraba a 500ppm se tomaron 100µl diluyéndolos con otros 100µl de agua para disminuir su concentración a la mitad. Se obtuvieron dos tubos haciendo esto, uno para el estudio y otro para la preparación de la siguiente dilución. A partir de estos se siguió haciendo el mismo procedimiento obteniendo dos tubos hasta obtener las 14 concentraciones para hacer la identificación de la concentración mínima inhibitoria.

Para probar los extractos se realizó la prueba de microdilución en caldo utilizando una placa de poliestireno de 96 pozos con el diseño para cada extracto presentado en la **FIGURA 4.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	50 µl caldo + 50µl 500ppm		50 µl 500ppm extracto + 50µl inóculo				50 µl 1,95ppm extracto + 50µl inóculo				50 µl caldo + 50µl 1,95ppm	
B	50 µl caldo + 50µl 250ppm		50 µl 250ppm extracto + 50µl inóculo				50 µl 0,97ppm extracto + 50µl inóculo				50 µl caldo + 50µl 0,97ppm	
C	50 µl caldo + 50µl 125ppm		50 µl 125ppm extracto + 50µl inóculo				50 µl 0,48ppm extracto + 50µl inóculo				50 µl caldo + 50µl 0,48ppm	
D	50 µl caldo + 50µl 62,5ppm		50 µl 62,5ppm extracto + 50µl inóculo				50 µl 0,24ppm extracto + 50µl inóculo				50 µl caldo + 50µl 0,24ppm	
E	50 µl caldo + 50µl 31,25ppm		50 µl 31,25ppm extracto + 50µl inóculo				50 µl 0,12ppm extracto + 50µl inóculo				50 µl caldo + 50µl 0,12ppm	
F	50 µl caldo + 50µl 15,62ppm		50 µl 15,62ppm extracto + 50µl inóculo				50 µl 0,06ppm extracto + 50µl inóculo				50 µl caldo + 50µl 0,06ppm	
G	50 µl caldo + 50µl 7,81ppm		50 µl 7,81ppm extracto + 50µl inóculo				50 µl gentamicina + 50µl inóculo			100 µl caldo		
H	50 µl caldo + 50µl 3,90ppm		50 µl 3,90ppm extracto + 50µl inóculo				100 µl inóculo			100 µl agua		

**Figura 4.** Diseño de placa modelo para la evaluación de la concentración mínima inhibitoria de cada extracto de *Spilanthes Acmella* en *Porphyromonas Gingivalis* y *Streptococcus Mutans*.

Posterior a la preparación de las placas, estas se agitaron en un Vortex a 10 rpm durante cinco minutos, sellándola con papel aluminio para reducir la evaporación del contenido y en condiciones de anaerobiosis fueron incubadas a 37°C utilizando el sistema de bolsas Anaerogen (Oxoid® UK) durante 13 horas para *Streptococcus mutans* y de 22 horas para *Porphyromonas gingivalis*. Transcurrido este tiempo se realizó la medición de la observación en un lector de microplacas Multiskan EX (Thermo®, UK).

La MIC fue interpretada como la mínima concentración del agente antimicrobiano que inhibe la multiplicación y producción de crecimiento de una cepa bacteriana dada en el sistema de prueba.

## **5.8. CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB).**

La concentración mínima bactericida (CMB) 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 serán aquellas concentraciones que no demuestren crecimiento bacteriano durante la determinación de la CMI (no existencia de diferencia significativa entre la densidad óptica de las muestras y el caldo).

Se procedió entonces a tomar una asada de los pozos que las contengan, posteriormente se realizó 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. 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 observó crecimiento bacteriano en el subcultivo) o bactericida (aquellos en los que no se observó crecimiento bacteriano).

## **5.9. SCREENING FITOQUÍMICO PRELIMINAR DEL EXTRACTO DE *Spilanthes acmella*.**

Se realizó un análisis fitoquímico preliminar del extracto etanólico de hojas, tallos y flores de *Spilanthes Acmella*. La metodología seguida para este análisis fue la

previamente estandarizada por Sanabria (1983), y contempla la detección de los metabolitos secundarios generalmente relacionados con actividades biológicas.

#### **5.10. ANALISIS ESTADISTICO**

Los resultados obtenidos en la evaluación de las curvas de crecimiento bacteriano, pruebas de sensibilidad y concentración mínima inhibitoria fueron analizados y graficados utilizando el software Graphpad Prism 5.01, mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) tomándose 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 fueron graficados como la media  $\pm$  la desviación estándar de la media. Previo al análisis se realizó test de normalidad de Kolmogórov-Smirnov, utilizando el software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 20 (IBM®), observando una distribución normal de los datos.

#### **5.11. CONSIDERACIONES ÉTICAS**

Tomando en cuenta lo establecido en el artículo 67 de la resolución 008430 de 1993 del ministerio de salud de Colombia, donde se disponen los reglamentos y estatutos a seguir en investigación con microorganismos patógenos o material biológico que pueda contenerlos, se tuvo en cuenta y se incluyó el proyecto como grupo de riesgo número uno: en el cual los microorganismos representaron un escaso riesgo para el individuo y para la comunidad, por tal motivo pueden ser manipulados en laboratorios tipo básico de microbiología

## 6. RESULTADOS

### 6.1. RECOLECCION DE MUESTRA, OBTENCIÓN DEL EXTRACTO Y PRUEBA DE SOLUBILIDAD

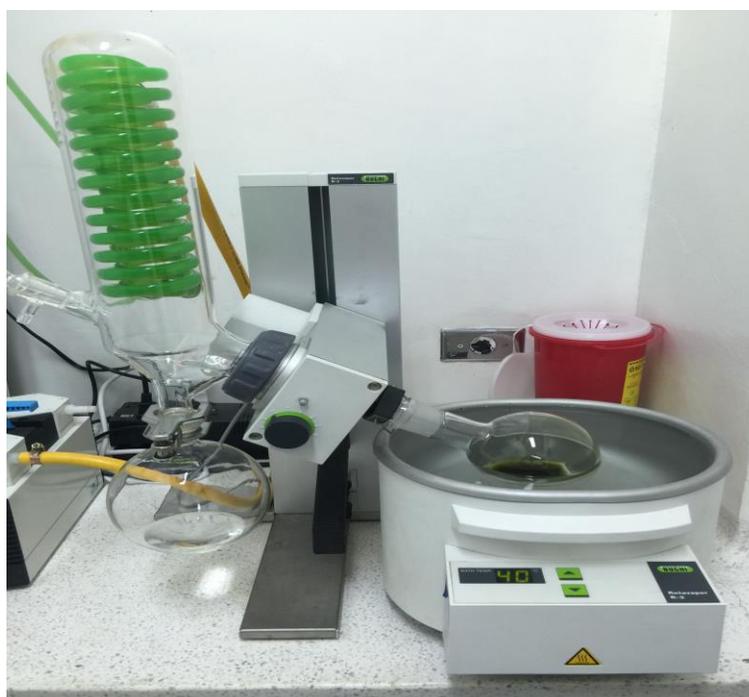
Después de haber recolectado la muestra de *Spilanthes Acmella* en zonas rurales de la ciudad de Cartagena (**FIGURA 6**), y procesar cada una de sus partes, se obtuvieron 132gr de tallo, 84 gr de flor y 95 gr hojas, las cuales fueron embebidas en un frasco con etanol al 75% por una semana. (**FIGURA 7**) Las cuales después del proceso de rotaevaporación hasta agotamiento se obtuvo 54 gr de tallos, 40 gr de hojas y 54gr de flores, las cuales correspondían al extracto puro. Obteniendo tres extractos oscuros de consistencia viscosa, este último se eliminó mediante rotaevaporación. (**FIGURA 8**). Se procedió luego a filtrar el extracto debido a que quedaban muchos grumos en el extracto y estos podrían representar sesgo en el experimento.



**Figura 6.** Especie de *Spilanthes Acmella* encontrada en las zonas rurales de Cartagena, Colombia.



**Figura 7.** Extracto separado de *Spilanthes Acmella* en tallos, flores y hojas respectivamente, maceradas y colocadas en un recipiente de vidrio con etanol al 75%.



**Figura 8.** Rotaevaporación de los extractos de *Spilanthes Acmella*



**Figura 9.** Extractos finales obtenidos de *Spilantes Acmella*, separados en tallos, hojas y flores respectivamente.

Una vez obtenidos los extractos (**FIGURA 9**) se realizó la prueba de solubilidad utilizando diferentes solventes como Etanol, Dimetilsulfóxido y Metanol. (**TABLA 1**)

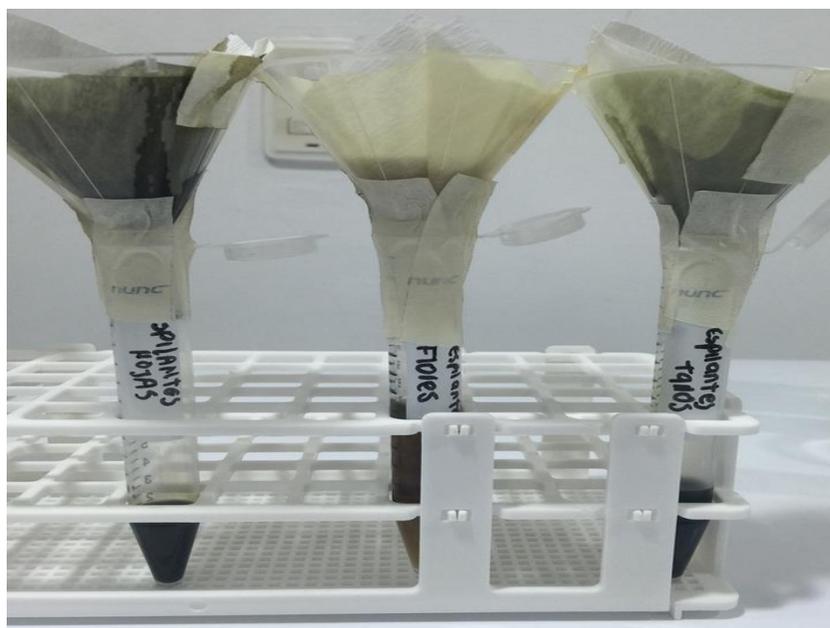
Extracto	solvente	
<b><i>Spilantes Acmella</i></b>	DMSO 100%	+
	Etanol al 1%	+
	Metanol	+
	DMSO 25% Etanol 75%	+

**Tabla 1.** Resultados pruebas solubilidad del extracto de *Spilantes Acmella*.



**Figura 10.** Prueba de solubilidad en *Spilanthes Acmella* con Etanol, DMSO, Metanol y DMSO + Etanol, para tallos, hojas y flores.

La prueba de solubilidad arrojó que el extracto de *Spilanthes Acmella* se disolvía en los cuatro componentes, pero con ninguno se disolvió completamente debido a que quedaban muchos grumos y esto podría provocar un sesgo en el proyecto, lo cual se puede observar en la **FIGURA 10**. Por tal razón, se procedió a filtrar los extractos nuevamente con etanol y papel de filtro para obtener un extracto mucho más puro, como se puede evidenciar en la **FIGURA 11**.



**Figura 11.** Filtrado del extracto de *Spilanthes Acmella* con Etanol.

## 6.2. CULTIVO DE MICROORGANISMOS Y CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO

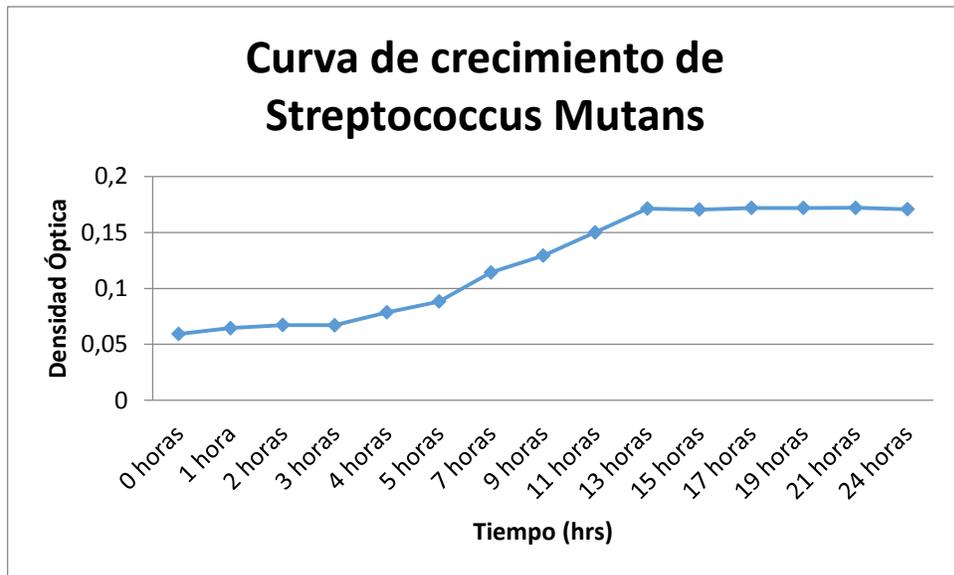
El cultivo en los medios para las bacterias, siguiendo la metodología propuesta, fue abundante (**FIGURA 12 y 13**) y las curvas de crecimiento se muestran en la **FIGURA 14 Y 15**. Se determinó que los tiempos de medición de los ensayos siguientes es de 13 horas para *Streptococcus mutans* y 22 horas para *Porphyromonas gingivalis*, ya que estos corresponden a al pico de la fase exponencial de crecimiento.



**Figura 12.** Cultivo de *Porphyromonas Gingivalis*.



**Figura 13.** Cultivo de *Streptococcus Mutans*.



**Figura 14.** Curva de crecimiento del Streptococcus Mutans.



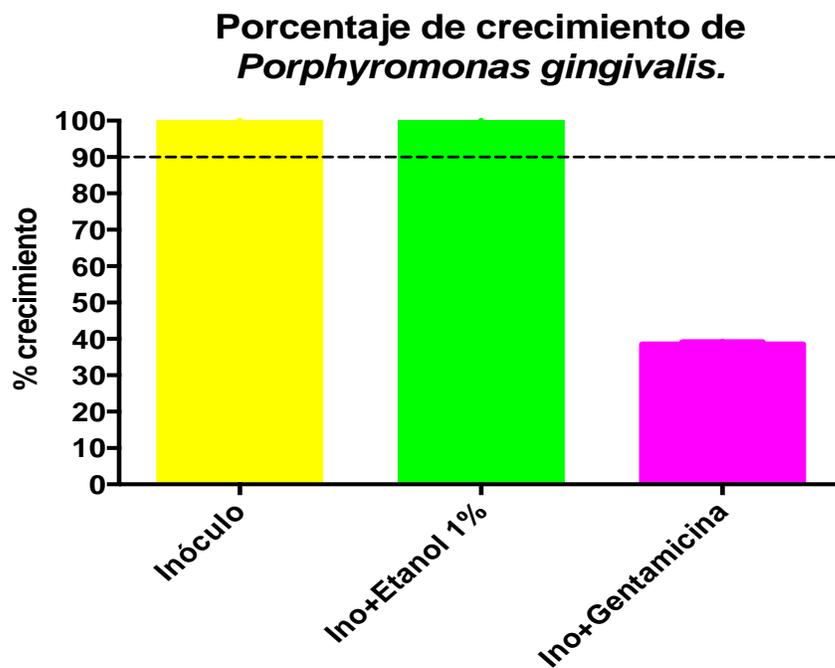
**Figura 15.** Curva de crecimiento graficada de Porphyromonas Gingivalis

Bacteria	Tiempo total curva de crecimiento	Tiempo de incubación según curva de crecimiento
<i>S. Mutans</i>	25 horas	13 horas
<i>P. Gingivalis</i>	46 horas	22 horas

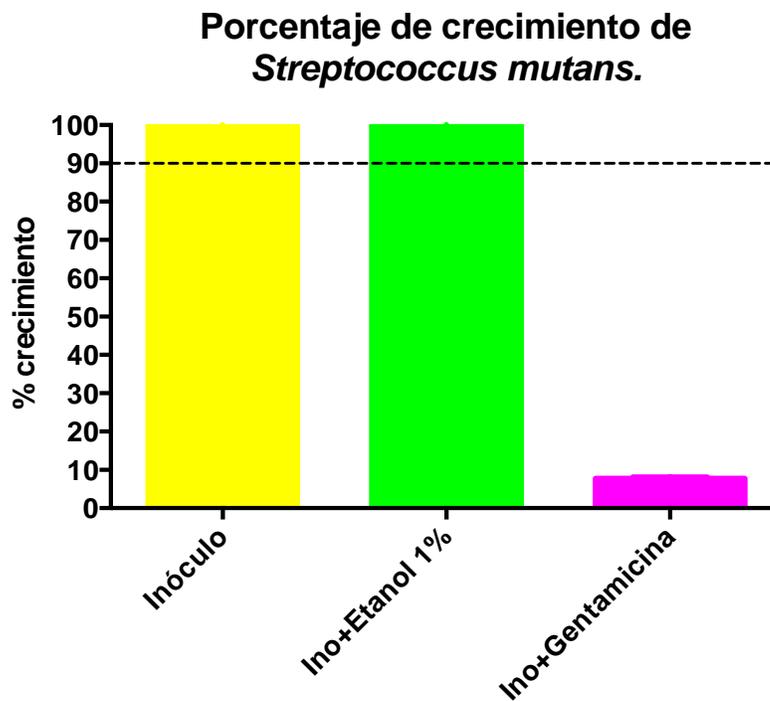
**Tabla 2.** Tiempos de incubación de los ensayos según la curva de crecimiento bacteriano.

### 6.3. PRUEBA DE TOXICIDAD DE SOLVENTES

Las pruebas de toxicidad de los solventes realizados demuestran que el etanol no interfiere en el crecimiento de las bacterias y se consideraron como inocuos pues mostraron que el crecimiento bacteriano superaba el 90 % según el porcentaje de crecimiento bacteriano. Los resultados se pueden observar en las **FIGURA 16** para *Porphyromonas Gingivalis* y **FIGURA 17** para *Streptococcus Mutans*.



**Figura 16.** Prueba de toxicidad de solventes sobre *Porphyromonas Gingivalis*.

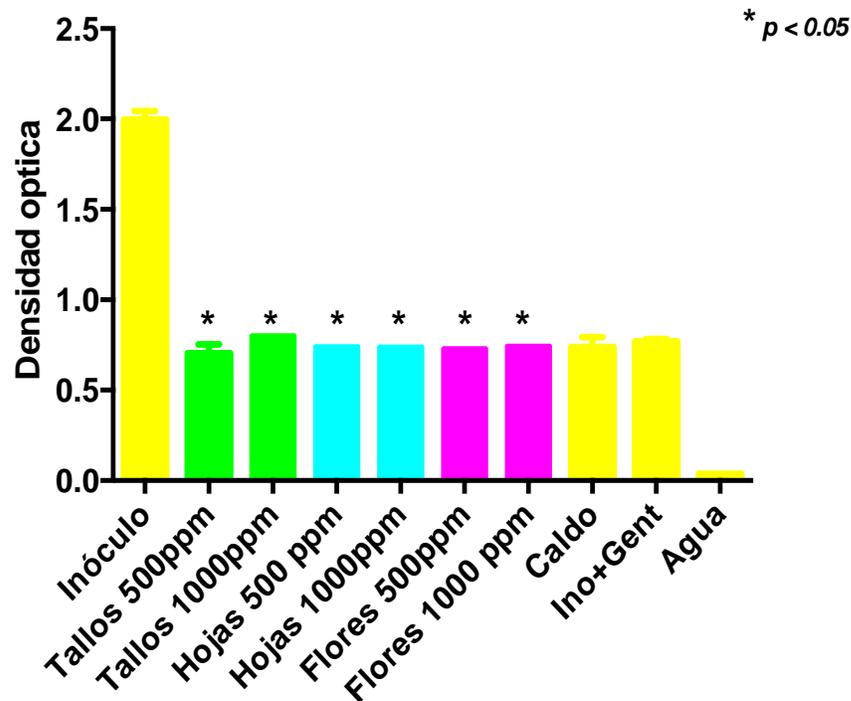


**Figura 17.** Prueba de toxicidad de solventes sobre *Streptococcus Mutans*.

#### 6.4. SENSIBILIDAD BACTERIANA

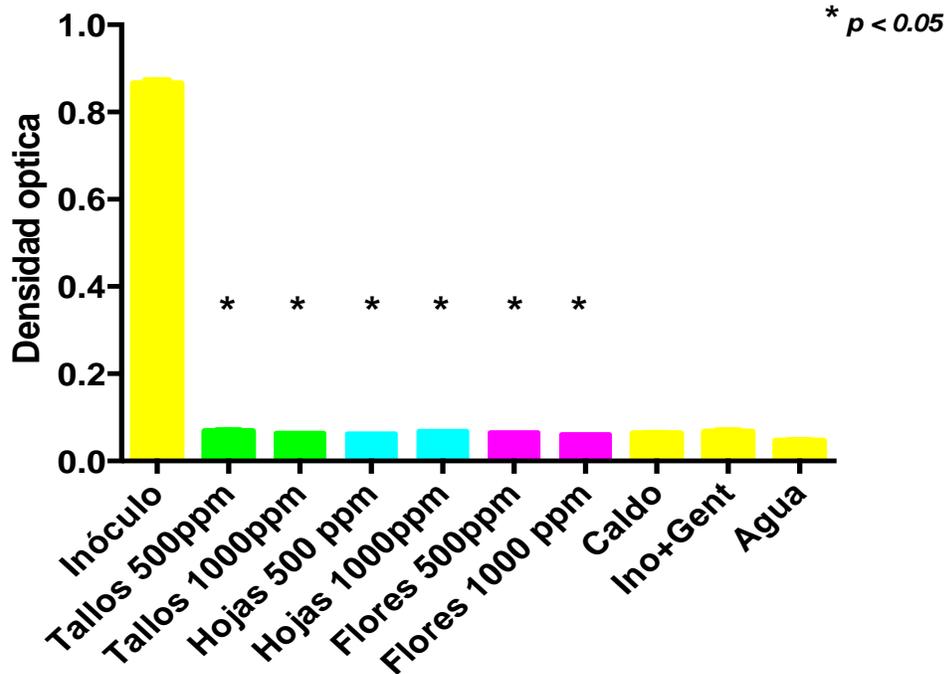
Se observó que tanto para *Streptococcus Mutans* y *Porphyromonas Gingivalis*, la prueba de sensibilidad mostró que el extracto de *Spilanthes Acmella* a 500ppm y a 1000ppm tiene una diferencia estadísticamente significativa con respecto al caldo de cultivo (inoculo) es decir que si hubo inhibición del crecimiento bacteriano, el cual se tomó a partir del crecimiento total del inóculo, y el crecimiento bacteriano expuesto.

#### Sensibilidad de *Porphyromonas gingivalis* a *Spilanthes acmella*



**Figura 18.** Prueba de sensibilidad de *Porphyromonas Gingivalis* a *Spilanthes Acmella*. Se observa el inoculo cuyo crecimiento es 2,0; las disoluciones a 500 ppm y a 1000 ppm, con valor de  $p < 0,05$  y el caldo, inoculo con gentamicina y agua como control de esterilidad.

## Sensibilidad de *Streptococcus mutans* a *Spilanthes acmella*

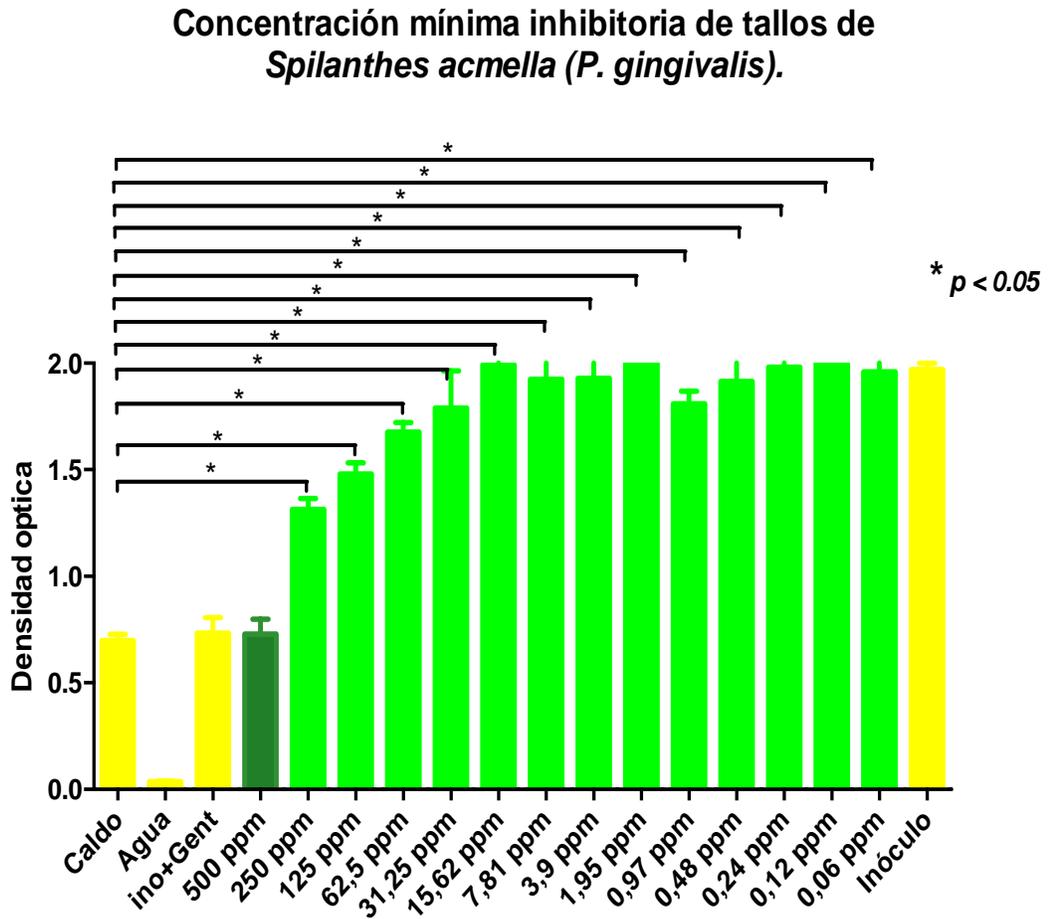


**Figura 19.** Prueba de sensibilidad de *Streptococcus Mutans* a *Spilanthes Acmella*. Se observa el inoculo cuyo crecimiento es 0,9; las disoluciones a 500 ppm y a 1000 ppm, con valor de  $p < 0,05$ , y el caldo, inoculo con gentamicina y agua como control de esterilidad.

### 6.5. CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC).

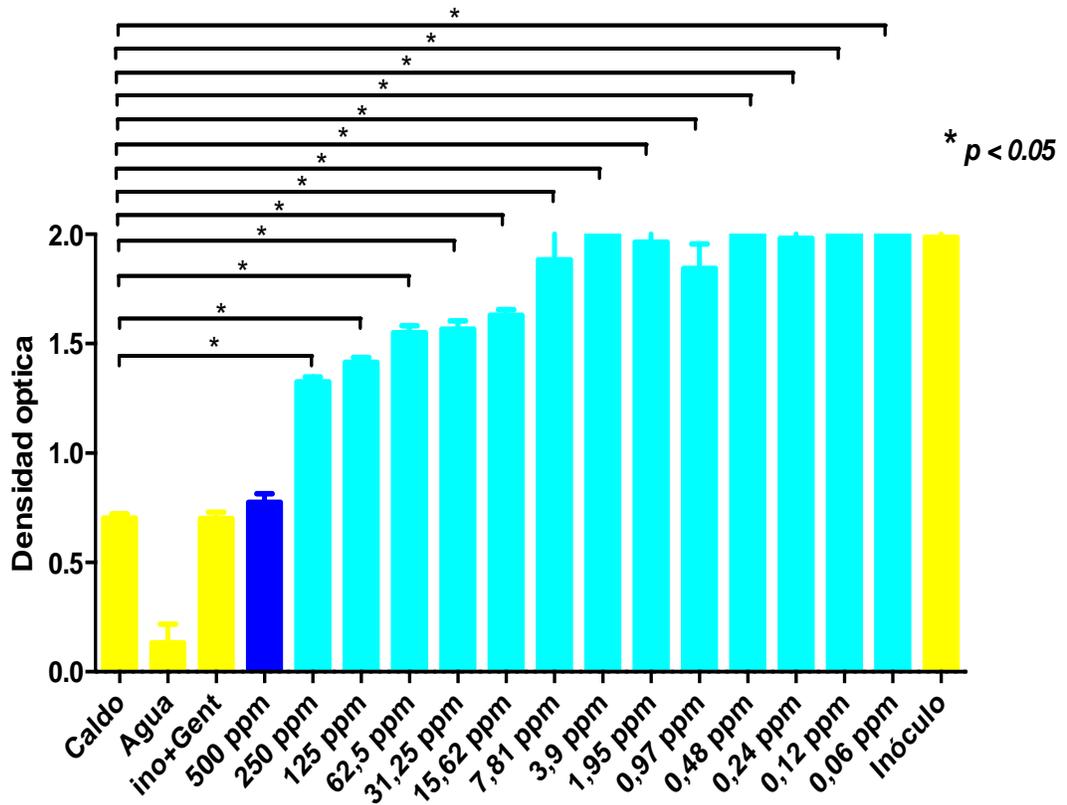
El resultado obtenido para la concentración mínima inhibitoria (MIC) de cada uno de los extractos de *Spilanthes Acmella* sobre *Porphyromonas Gingivalis* y *Streptococcus mutans* fue 500 ppm, por lo que se puede considerar de

importancia clínica para la investigación. Se puede observar en las FIGURA 20-25.



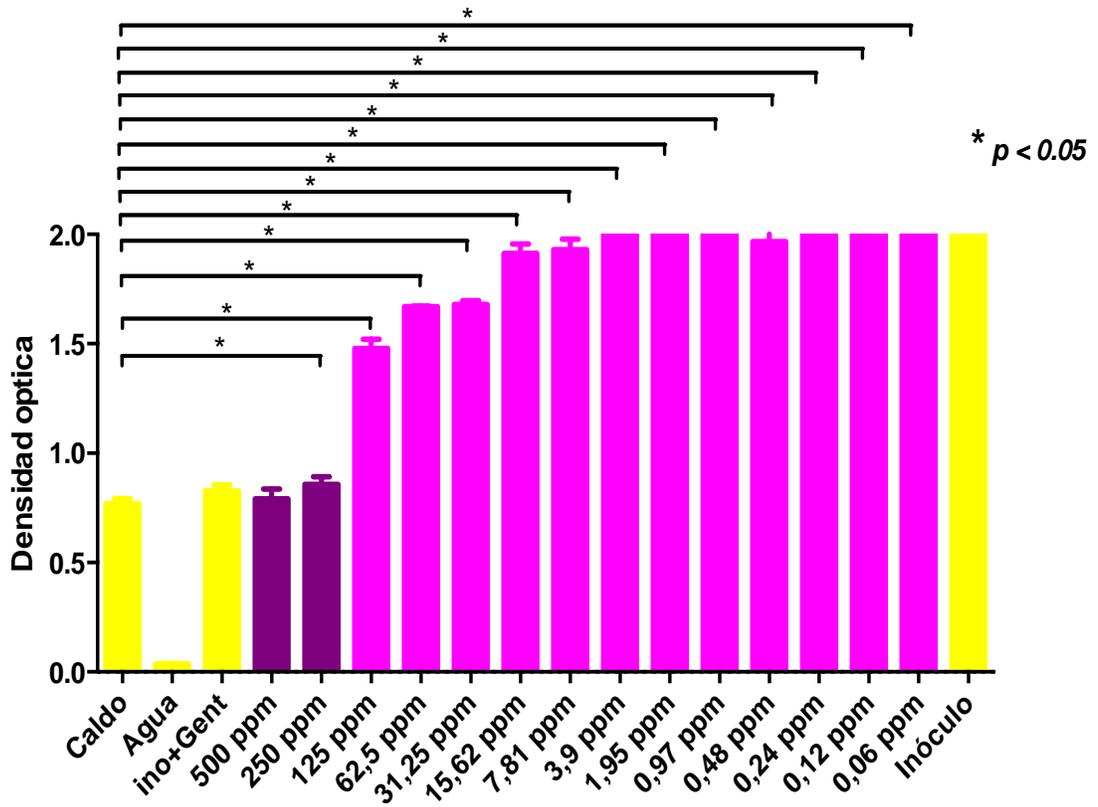
**Figura 20.** Se observa que, de las 14 concentraciones del extracto de tallos, 500ppm es la concentración mínima inhibitoria en *Porphyromonas Gingivalis*.

**Concentración mínima inhibitoria de hojas de  
*Spilanthes acmella* (*P. gingivalis*).**



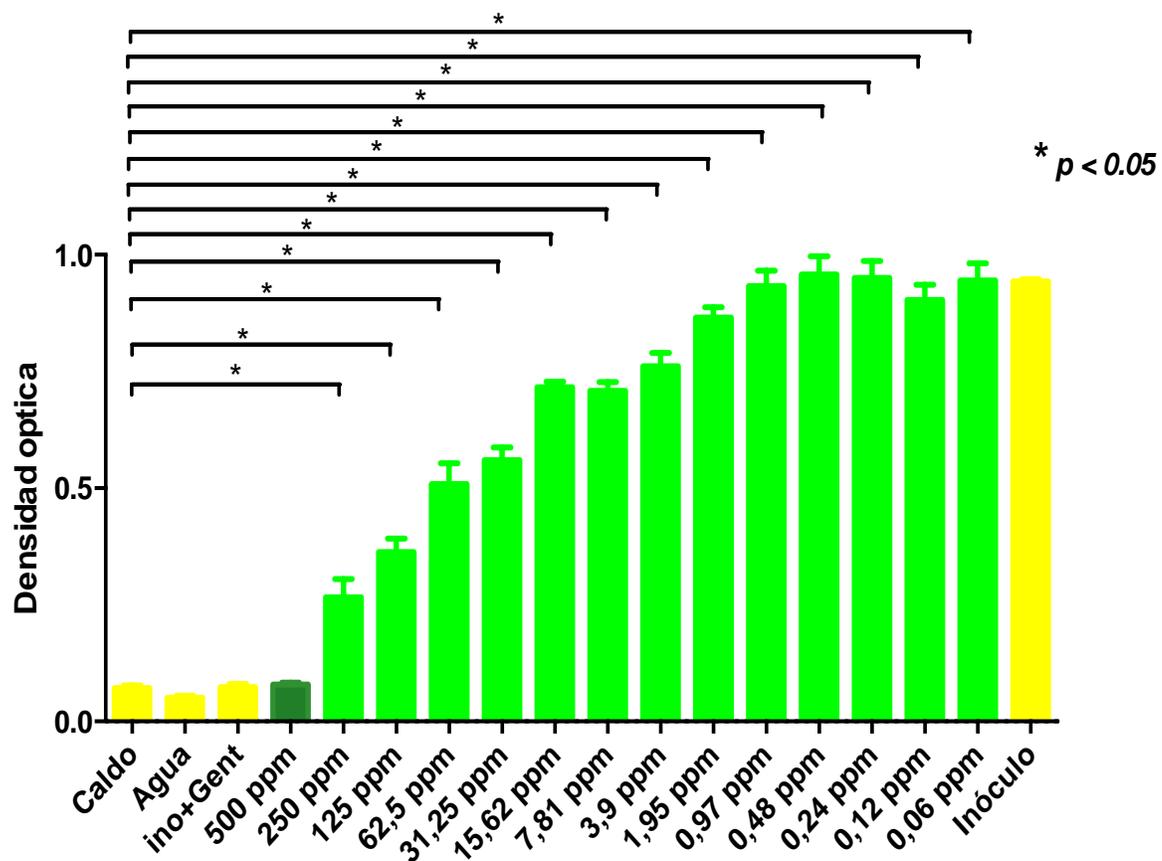
**Figura 21.** Se observa que, de las 14 concentraciones del extracto de hojas, 500ppm es la concentración mínima inhibitoria en *Porphyromonas Gingivalis*.

Concentración mínima inhibitoria de flores de *Splanthes acmella* (*P. gingivalis*).



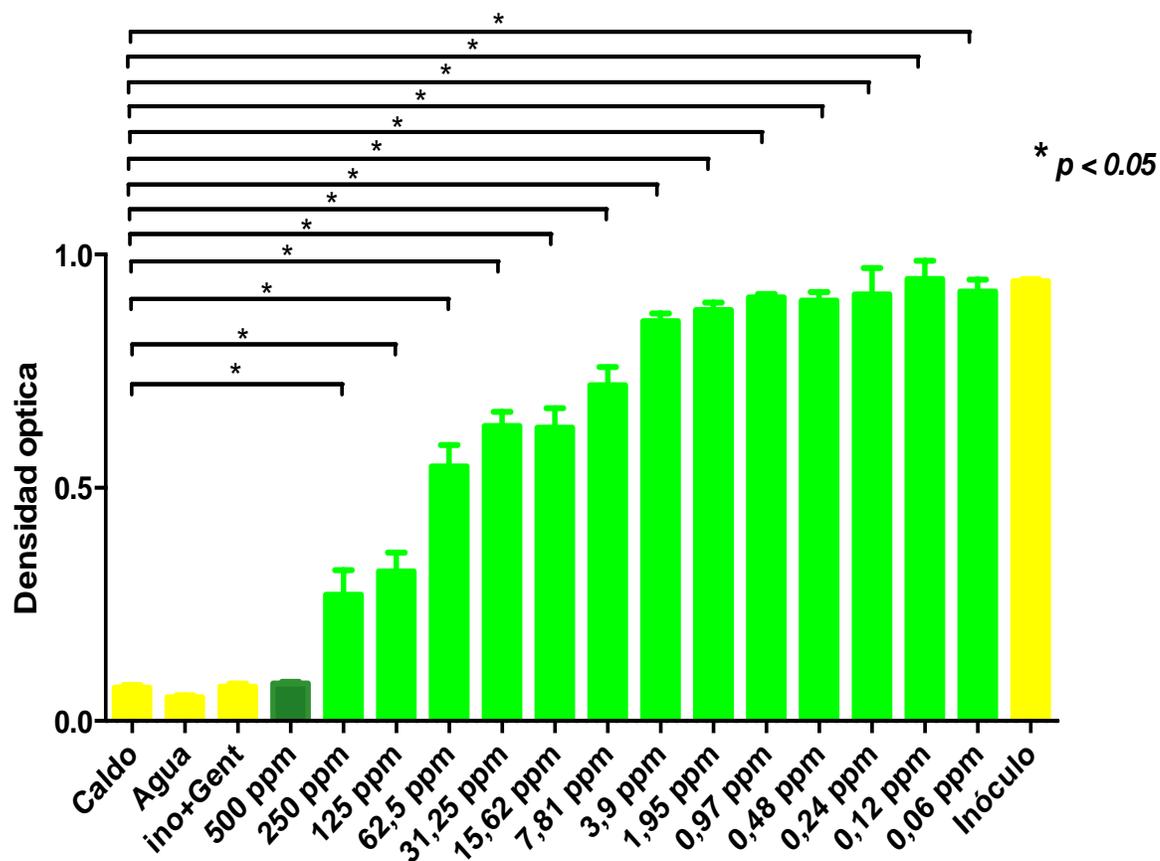
**Figura 22.** Se observa que, de las 14 concentraciones del extracto de flores, 500ppm es la concentración mínima inhibitoria en *Porphyromonas Gingivalis*.

### Concentración mínima inhibitoria de tallos de *Spilanthes acmella* (*S.mutans*).



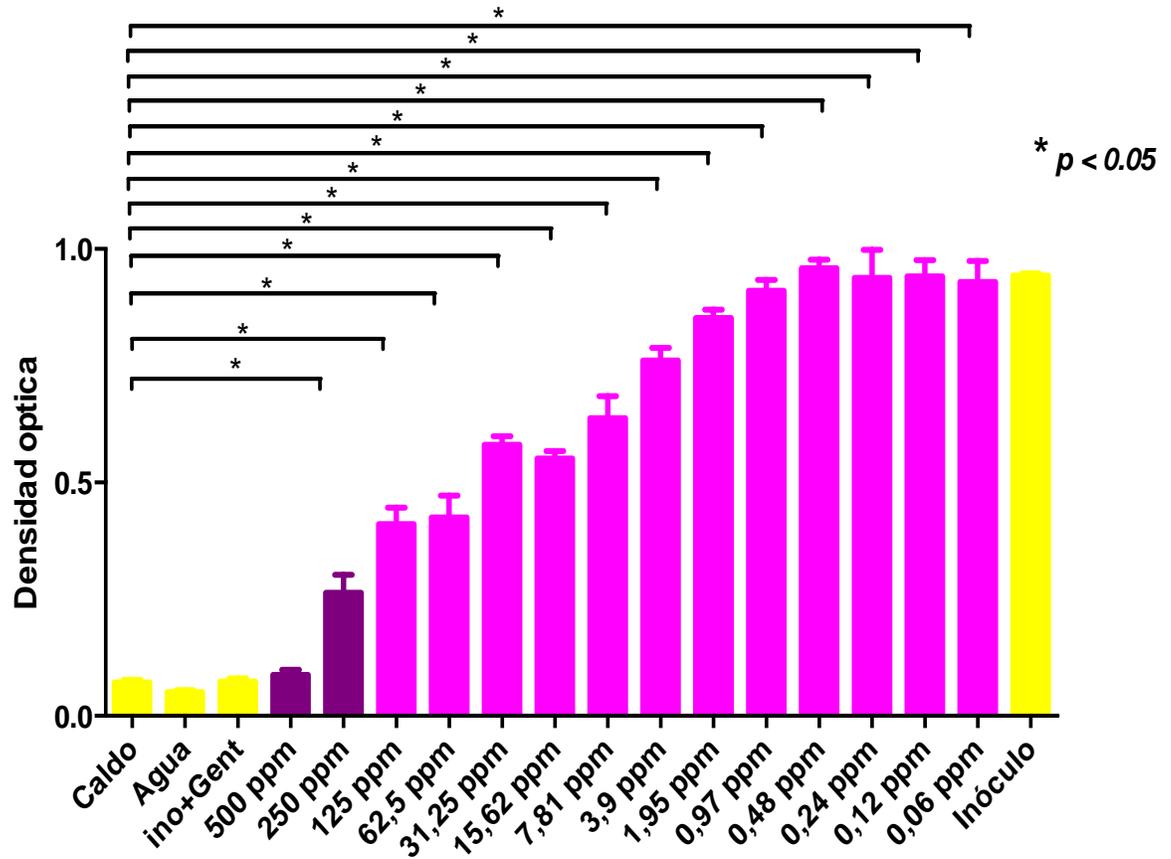
**Figura 23.** Se observa que, de las 14 concentraciones del extracto de tallos, 500ppm es la concentración mínima inhibitoria en *Streptococcus Mutans*.

### Concentración mínima inhibitoria de hojas de *Spilanthes acmella* (*S.mutans*).



**Figura 24.** Se observa que, de las 14 concentraciones del extracto de hojas, 500ppm es la concentración mínima inhibitoria en *Streptococcus Mutans*.

### Concentración mínima inhibitoria de flores de *Spilanthes acmella* (*S.mutans*).



**Figura 25.** Se observa que, de las 14 concentraciones del extracto de flores, 500ppm es la concentración mínima inhibitoria en *Streptococcus Mutans*.

## 6.6. CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (MCB)

La concentración mínima bactericida de los extractos de *Spilanthes Acmella* en *Streptococcus Mutans*, se tomó a partir de 500ppm en cada extracto respectivamente puesto que fue aquí donde no hubo crecimiento bacteriano.

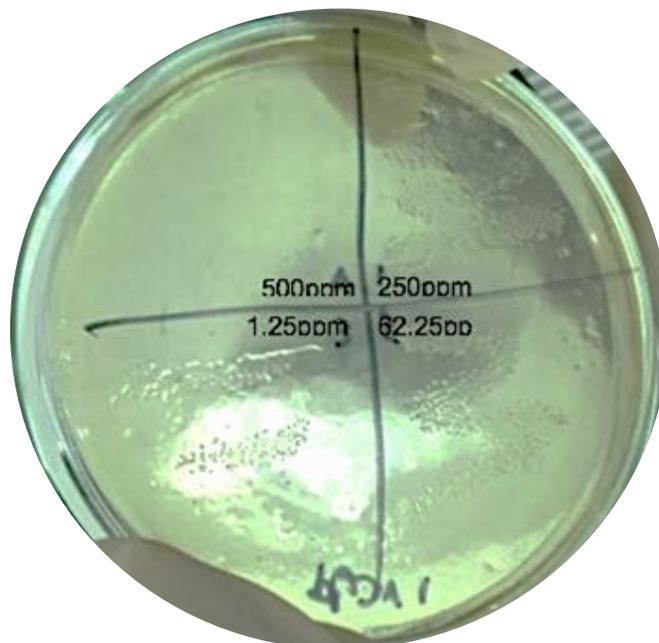
Por ende, para el caso de los tallos, hojas y flores en *Streptococcus Mutans* se evidencia que tienen efecto bactericida, debido a que a 500ppm no se encuentra crecimiento bacteriano, como se puede observar en la **FIGURA 26, 27, 28**.



**Figura 26.** Se observa la MCB de tallos en *Streptococcus Mutans* frente a 500ppm, donde se observa que éste es bactericida.



**Figura 27.** Se observa la MCB de hojas en *Streptococcus Mutans* frente a 500ppm, donde se observa que éste es bactericida.



**Figura 28.** Se observa la MCB de flores en *Streptococcus Mutans* frente a 500ppm, donde se observa que éste es bactericida.

## 6.7. SCREENING FITOQUÍMICO PRELIMINAR DE LOS EXTRACTOS DE *Spilanthes acmella*

N°	Extracto	Órgano	AL	AR	CA	CF	CU	FL	LE	SA	TA	TE
1	<i>Spilantes Acmella</i>	Tallos	-	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	-
2	<i>Spilantes Acmella</i>	Flores	-	-	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	-
3	<i>Spilantes Acmella</i>	Hojas		-	+++	ND	+++	+	-	ND	+++	-

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

**Figura 29.** Resultados del screening fitoquímico preliminar de los extractos de tallos, hojas y flores de *Spilanthes Acmella*. Donde se observan los metabolitos secundarios en presencia abundante [+++], presencia moderada [++], presencia leve [+], ausencia [-].

En el análisis fitoquímico preliminar se observa entonces que los tallos presentan abundantes metabolitos secundarios de azúcares reductores, cardiotónicos, compuestos fenólicos, cumarinas, flavonoides, saponinas y taninos. Con respecto a las flores, se evidencia la presencia abundante de metabolitos secundarios cardiotónicos, compuestos fenólicos, cumarinas, flavonoides, saponinas y taninos. En cambio, en las hojas se encuentra presencia abundante de metabolitos secundarios cardiotónicos, cumarinas y taninos; presencia leve de flavonoides y no se pudieron determinar la presencia de compuestos fenólicos y saponinas debido a la interferencia de color. Por tanto, se logra notar que los tres extractos, tallos, hojas y flores, presentan metabolitos secundarios abundantes cardiotónicos, cumarinas y taninas; así como también son los tallos los que presentan mayor número de metabolitos secundarios tanto en cantidad como en abundancia.

## 7. DISCUSIÓN

*Spilanthes Acmella* es una planta medicinal que se encuentra en su mayoría en lugares tropicales como lo es Latino América; esta realmente es una planta nativa de Brasil.<sup>65</sup> Desde tiempos antiguos se encontró que *Spilanthes* poseía un efecto anestésico en la cavidad oral al momento de masticar sus flores, es por esto que se conoce comúnmente como la planta “duerme lengua”, por tal razón científicos iniciaron estudios acerca de este tipo de propiedad y si se encontraban otras propiedades interesantes y útiles para la sociedad.<sup>66</sup>

Literatura científica actual demuestra que la planta *Spilanthes Acmella* posee diversos efectos entre los que encontramos efecto anestésico, antipirético, antifúngico, antioxidante, analgésico y antimicrobiano; predominando evidentemente su efecto anestésico. Así mismo demuestra tener buen efecto insecticida.<sup>67 68 69</sup> Sin embargo, existe muy poca literatura científica actual acerca del efecto antibacteriano de la planta *Spilanthes Acmella*, y más aún, en bacterias de la cavidad oral como lo son *Streptococcus Mutans* y *Porphyromonas Gingivalis*; por lo cual cabe preguntarse si realmente posee efecto antimicrobiano con

---

<sup>65</sup> HOLETZ, Fabíola Barbiéri, PESSINI, Greisiele Lorena, SANCHES, Neviton Rogério, CORTEZ, Diógenes Aparício Garcia, et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. En: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2002, Vol 97, no.7, p 1027-1031.

<sup>66</sup> LENG, Tan Chee, PING, Ning Shu, LIM, Boey Peng AND KENG, Chan Lai Detection of bioactive compounds from *Spilanthes acmella* (L.) plants and its various in vitro culture products. En: Journal of Medicinal Plants Research, 2011, Vol 5, no.3, p 371-378.

<sup>67</sup> BOONEN, Jente, BAERT, Bram, BURVENICH, Christian, BLONDEEL, Phillip, et al. LC-MS profiling of N-alkylamides in *Spilanthes acmella* extract and the transmucosal behaviour of its main bio-active spilanthol. En: Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2010, Vol 53, no.3, p 243-249.

<sup>68</sup> WONGSAWATKUL, Orapin, PRACHAYASITTIKUL, Supaluk, ISARANKURA-NA-AYUDHYA, Chartchalerm, SATAYAVIVAD, Jutamaad, et al. Vasorelaxant and antioxidant activities of *Spilanthes acmella* Murr. En: International journal of molecular sciences, 2008, Vol 9, no.12, p 2724-2744.

<sup>69</sup> HAW, Ang Boon AND KENG, Chan Lai Micropropagation of *Spilanthes acmella* L., a bio-insecticide plant, through proliferation of multiple shoots. En: J. Appl. Hort, 2003, Vol 5, no.2, p 65-68.

respecto a los microorganismos causantes de las dos enfermedades más prevalentes en la cavidad oral.

En el presente estudio los resultados muestran que los tallos podría ser el componente de la planta que mejor actividad antimicrobiana posee con respecto al *Streptococcus Mutans* y *Porphyromonas Gingivalis*, debido a la diversidad y cantidad de metabolitos secundarios que posee con respecto a las hojas y flores, lo cual representaría un gran avance para la comunidad académica y la sociedad puesto que esto podría significar que se podría generar un producto a partir de la *Spilanthes Acmella* que actúe como efecto anestésico y tenga a su vez efecto antimicrobiano, lo cual sería un buen producto a utilizar en los pacientes.

De hecho, los estudios realizados en evidencia científica profundizan mucho más acerca de qué tipo de metabolito activo posee la planta que la hace tener esas diversas propiedades; encontraron que *Spilanthes Acmella* posee un metabolito llamado Spilanthol, el cual es una N-isobutilamina química, que le otorga sus características insecticidas, que además tiene sabor ácido y, por ende, podría estimular además la salivación del paciente.<sup>70</sup> Sin embargo, Leng et al en el 2011<sup>71</sup> encontró que se encontró este metabolito especialmente en las flores de la planta, lo cual en el presente estudio no se evaluó la presencia del metabolito de Spilanthol, pero si se encontró diversos otros metabolitos como cumarinas, taninos y flavonoides podrían otorgarle la propiedad de efecto antimicrobiano que se busca.

---

<sup>70</sup> NAKATANI, Nobuji AND NAGASHIMA, Mayumi Pungent alkalamides from *Spilanthes acmella* L. var. *oleracea* Clarke. En: Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1992, Vol 56, no.5, p 759-762.

<sup>71</sup> LENG, Tan Chee, PING, Ning Shu, LIM, Boey Peng AND KENG, Chan Lai Detection of bioactive compounds from *Spilanthes acmella* (L.) plants and its various in vitro culture products. En: Journal of Medicinal Plants Research, 2011, Vol 5, no.3, p 371-378

Moin et al en 2012 reportaron que existe una actividad antibacteriana de *Spilanthes Acmella* en *Staphylococcus epidermis*, el cual presentó una MIC de 0.5 mg/mL<sup>72</sup>, que al compararla con la MIC obtenida en esta investigación que fue de un valor menor, que indica resultados promisorios.

Igualmente, Ardoino en 2014<sup>72</sup> comprobó la actividad antibacteriana de los taninos, pertenecientes al grupo de los terpenos, al igual que el de los núcleos esteroidales y los triterpenos las saponinas, los flavonoides, y los alcaloides; lo cual concuerda con lo encontrado en el screening fitoquímico preliminar de *Spilanthes Acmella*.

Narayana en el 2001<sup>73</sup> realizó un estudio de los efectos de los flavonoides, en donde encontró que este poseía un efecto antimicrobiano contra muchas bacterias, especialmente las gram-positivas; lo cual concuerda con lo encontrado en el presente estudio donde se evidenció presencia abundante en tallos y flores, y presencia leve en hojas y, además, se encontró efecto bactericida especialmente en *Streptococcus Mutans* a 500ppm. Adicionalmente, Narayana también encontró que este metabolito secundario posee efecto antiinflamatorio, lo cual ayudaría en la resolución o detención de la evolución de la enfermedad periodontal en la cavidad oral, que es precisamente lo que se busca resolver con el presente estudio.

---

<sup>72</sup> MOIN, Sarmad, SHIBU, Sahaya, WESLEY, Servin, DEVI, Chitra. Antimicrobial activity of in vitro raised acmella calva (dc.) r.k.jansen. En: International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2012, Vol 4, no. 5, p 124-127.

ARDOINO, Silvia Marina. Estudio fitoquímico de extractos con actividad antimicrobiana contra *Brucella canis* obtenidos a partir de plantas nativas y naturalizadas de la provincia de La Pampa, Argentina. Facultad de Ciencias Veterinarias, 2014.

<sup>73</sup> NARAYANA, K Raj, REDDY, M Spiral, CHALUVADI, MR AND KRISHNA, DR Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. En: Indian journal of pharmacology, 2001, Vol 33, no.1, p 2-16.

Así mismo, Domingo y López en el 2003<sup>74</sup> encontraron que algunos metabolitos secundarios con efectos antimicrobianos son los compuestos fenólicos, los cuales debido a su número de grupos hidroxilos pueden intervenir en la toxicidad de las bacterias; los taninos y las cumarinas los cuales pueden actuar a nivel del DNA eucariota lo cual explicaría su efecto en la bacteria. Así como también tienen efectos las flavonas al formar complejos entre las proteínas solubles y extracelulares y la pared celular de la bacteria, entre las que encontramos el *Streptococcus Mutans*; también poseen efecto las saponinas y los azúcares lo cual contribuye a lo encontrado en el experimento donde se encontró presencia abundante de cumarinas, taninas, azúcares reductores, flavonoides y compuestos fenólicos; y por tal razón se podría inferir que el extracto de tallos posee mejor efecto antimicrobiano por la presencia de mayor número de metabolitos secundarios, los cuales son los azúcares reductores, compuestos fenólicos, cumarinas, flavonoides, saponinas y taninas.

Además, se observa que los tallos, hojas y flores de *Spilanthes Acmella* poseen efecto bactericida, el cual se evidencia en la concentración mínima bactericida (MCB), lo cual es un gran aporte para la comunidad científica y para iniciar futuras y nuevas investigaciones para el uso de este extracto en odontología. Así como lo evidenció Ahmed et al en 2012, al encontrar que *Spilanthes Acmella* posee una fuerte actividad inhibitoria con respecto al crecimiento bacteriano, especialmente en bacterias gram-positivas y gram-negativas<sup>75</sup>, lo cual concuerda con el presente experimento al encontrar este efecto en *Streptococcus Mutans* (bacteria gram-positiva) y *Porphyromonas Gingivalis* (bacteria gram-negativa).

---

<sup>74</sup> DOMINGO, D AND LÓPEZ-BREA, M Plantas con acción antimicrobiana. En: Rev Esp Quimioterap, 2003, Vol 16, no.4, p 385-393.

<sup>75</sup> AHMED, S, RAHMAN, A, MUSLIM, T, SOHRAB, MH, et al. Antimicrobial cytotoxicity and phytochemical activities of *Spilanthes acmella*. En: Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research, 2013, Vol 47, no.4, p 437-440.

Por el contrario, Prachayasittikul et al en el 2013<sup>76</sup> encontró que al realizar pruebas de *Spilanthes Acmella* en métodos de disoluciones en agar poseen un efecto antimicrobiano inactivo, incluso aun cuando la MIC demuestre actividad antibacteriana en *Streptococcus Pyogenes*. Al igual que Holetz en el 2002<sup>77</sup>, quien por medio de estudios sus resultados también arrojaron actividad antimicrobiana inactiva para *Spilanthes Acmella* en comparación con otras 13 plantas medicinales de Brasil; así como también encontró que posee actividad antifúngica inactiva con respecto a todos los hongos evaluados. Sin embargo, esto no concuerda con lo hallado en el presente estudio puesto que mediante microdiluciones en agar se observó que si poseen efecto bactericida con respecto a *Streptococcus Mutans* a 500ppm.

A pesar de que no exista mucha evidencia científica que hable específicamente acerca del efecto antimicrobiano en *Streptococcus Mutans* y *Porphyromonas Gingivalis*, para lo cual el presente estudio brinda interesantes resultados para la comunidad científica. Sin embargo, se recomienda realizar mayores estudios con respecto al efecto que este posee en las bacterias de la cavidad oral e incluso, especificar qué tipo de metabolito activo es el que está provocando esta propiedad.

---

<sup>76</sup> PRACHAYASITTIKUL, Veda, PRACHAYASITTIKUL, Supaluk, RUCHIRAWAT, Somsak AND PRACHAYASITTIKUL, Virapong High therapeutic potential of *Spilanthes acmella*: A review. En: EXCLI journal, 2013, Vol 12, p 291-312.

<sup>77</sup> HOLETZ, Fabíola Barbiéri, PESSINI, Greisiele Lorena, SANCHES, Neviton Rogério, CORTEZ, Diógenes Aparício Garcia, et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. En: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2002, Vol 97, no.7, p 1027-1031.

## 8. CONCLUSIONES

El extracto de *Spilanthes Acmella*, segmentada en tallos, hojas y flores, presenta actividad antibacteriana con respecto a las bacterias *Porphyromonas Gingivalis* y *Streptococcus Mutans*; siendo los tallos las que podrían poseer mejor efecto antibacteriano según los resultados arrojados. Además, se encontró que tanto las hojas, tallos y flores poseen efecto bactericida con respecto a las bacterias *Streptococcus Mutans* y *Porphyromonas Gingivalis*. Se evidenció también que los tres extractos, tallos, hojas y flores, presentan metabolitos secundarios abundantes cardiotónicos, cumarinas y taninas; así como también son los tallos los que presentan mayor número de metabolitos secundarios tanto en diversidad como en abundancia.

Por ende, estos resultados son de gran importancia para la comunidad académica debido a que es un extracto 100% natural, que se puede aprovechar y realizar, generando bajos gastos económicos y aportando a la salud oral al prevenir la colonización y virulencia de bacterias como el *Streptococcus Mutans* y la *Porphyromonas Gingivalis* que intervienen en el proceso de la caries dental y la enfermedad periodontal.

## 9. RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar con las investigaciones acerca de los beneficios y efectos que poseen los extractos de *Spilanthes Acmella* en cavidad oral para así obtener resultados más específicos. Así como también se debe terminar el presente estudio mediante la realización de la concentración mínima bactericida en *Porphyromonas Gingivalis*, la cual no se pudo realizar por las condiciones actuales del laboratorio donde se llevaban a cabo las prácticas; para lograr determinar si los extractos poseen efecto bactericida o bacteriostático en esta bacteria.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. AHMED, S, RAHMAN, A, MUSLIM, T, SOHRAB, MH, et al. Antimicrobial cytotoxicity and phytochemical activities of *Spilanthes acmella*. En: Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research, 2013, Vol 47, no.4, p 437-440.
2. ARDOINO, Silvia Marina. Estudio fitoquímico de extractos con actividad antimicrobiana contra *Brucella canis* obtenidos a partir de plantas nativas y naturalizadas de la provincia de La Pampa, Argentina. Facultad de Ciencias Veterinarias, 2014.
3. ARORA, Shefali, VIJAY, Saurabh AND KUMAR, Deepak Phytochemical and antimicrobial studies on the leaves of *Spilanthes acmella*. En: J. Chem. Pharm. Res, 2011, Vol 3, no.5, p 145-150.
4. BOONEN, Jente, BAERT, Bram, BURVENICH, Christian, BLONDEEL, Phillip, et al. LC–MS profiling of N-alkylamides in *Spilanthes acmella* extract and the transmucosal behaviour of its main bio-active spilanthol. En: Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2010, Vol 53, no.3, p 243-249.
5. BOSTANCI, Nagihan AND BELIBASAKIS, Georgios N *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. En: FEMS microbiology letters, 2012, Vol 333, no.1, p 1-9.
6. BOWEN, WH AND 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.
7. CABALLERO, AD, REYES, RV, LLERENA, LP, MONTERROSA, MA, et al. Periodontitis, *Porphyromonas gingivalis* and its relation to quorum sensing expression. En: Revista cubana de estomatología, 2010, Vol 47, no.4, p 404-416.
8. CARVAJAL ROJAS, Lyndon, HATA URIBE, Yoshie, SIERRA MARTÍNEZ, Noralba AND RUEDA NIÑO, Diana Análisis fitoquímico preliminar de hojas,

tallos y semillas de cupatá (*Strychnos schultesiana* Krukoff). En: Colombia Forestal, 2009, Vol 12, no.1, p 161-170.

9. CHAIYA, A, SARAYA, S, CHUAKUL, W AND TEMSIRIRIRKKUL, R  
Screening for dental caries: Preventive activities of medicinal plants against *Streptococcus mutans*. En: Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013, Vol 40, no.1, p 9-17.
10. CHAKRABORTY, A, DEVI, BRK, SANJEBAM, R, KHUMBONG, S, et al.  
Preliminary studies on local anesthetic and antipyretic activities of *Spilanthes acmella* Murr. in experimental animal models. En: Indian journal of pharmacology, 2010, Vol 42, no.5, p 277.
11. CHAKRABORTY, A, DEVI, RK, RITA, S, SHARATCHANDRA, KH, et al.  
Preliminary studies on antiinflammatory and analgesic activities of *Spilanthes acmella* in experimental animal models. En: Indian journal of pharmacology, 2004, Vol 36, no.3, p 148.
12. DIAS, AMA, SANTOS, P, SEABRA, IJ, JÚNIOR, RNC, et al. Spilanthol from *Spilanthes acmella* flowers, leaves and stems obtained by selective supercritical carbon dioxide extraction. En: The Journal of Supercritical Fluids, 2012, Vol 61, p 62-70.
13. DOMINGO, D AND LÓPEZ-BREA, M Plantas con acción antimicrobiana. En: Rev Esp Quimioterap, 2003, Vol 16, no.4, p 385-393.
14. DUBEY, Suchita, MAITY, Siddhartha, SINGH, Mahendra, SARAF, Shubhini A, et al. Phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Spilanthes acmella*: a review. En: Advances in pharmacological sciences, 2013, Vol 2013, p.
15. DUQUE DE ESTRADA RIVERÓN, Johany, PÉREZ QUIÑONEZ, José Alberto AND HIDALGO-GATO FUENTES, Iliana Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar. En: Revista cubana de estomatología, 2006, Vol 43, no.1, p 0-0.

16. FEJERSKOV, Ole Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. En: Caries research, 2004, Vol 38, no.3, p 182-191.
17. FEJERSKOV, Ole AND KIDD, Edwina *Dental caries: the disease and its clinical management*. Edtion ed.: John Wiley & Sons, 2009. ISBN 1444309285.
18. GONZÁLEZ DÍAZ, María Elena, TOLEDO PIMENTEL, Bárbara AND NAZCO RÍOS, Caridad Enfermedad periodontal y factores locales y sistémicos asociados. En: Revista cubana de estomatología, 2002, Vol 39, no.3, p 374-395.
19. GROSS, Erin L, BEALL, Clifford J, KUTSCH, Stacey R, FIRESTONE, Noah D, et al. Beyond Streptococcus mutans: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. En: PloS one, 2012, Vol 7, no.10, p e47722.
20. GUILARTE, Carolina AND PERRONE, Marianella Bacterias Periodontopatógenas: Bacilos Anaerobios gran negativos como agentes Etiológicos de la Enfermedad Periodontal. En: Acta Odontológica Venezolana, 2005, Vol 43, no.2, p 198-204.
21. HATASA, Shigeyoshi AND IIOKA, I. Spilanthol-containing compositions for oral use. In.: Google Patents, 1973.
22. HAW, Ang Boon AND KENG, Chan Lai Micropropagation of Spilanthes acmella L., a bio-insecticide plant, through proliferation of multiple shoots. En: J. Appl. Hort, 2003, Vol 5, no.2, p 65-68.
23. HERRERA HERRERA, Alejandra, FRANCO OSPINA, Luis, FANG, Luis AND DÍAZ CABALLERO, Antonio Susceptibility of Porphyromonas gingivalis and Streptococcus mutans to Antibacterial Effect from Mammea americana. En: Advances in pharmacological sciences, 2014, Vol 2014, p.1-6.
24. HOLETZ, Fabíola Barbiéri, PESSINI, Greisiele Lorena, SANCHES, Neviton Rogério, CORTEZ, Diógenes Aparício Garcia, et al. Screening of some

plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. En: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2002, Vol 97, no.7, p 1027-1031.

25. JAHAN, Noor, KHATOON, Razia, AHMAD, Siraj AND SHAHZAD, Anwar Evaluation of antibacterial potential of medicinal plant *Spilanthes acmella* Murr. and its in vitro raised callus against resistant organisms especially those harbouring bla genes. En: Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2013, Vol 3, no.10, p 119.
26. KRZYŚCIAK, W, JURCZAK, A, KOŚCIELNIAK, D, BYSTROWSKA, B, et al. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. En: European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2014, Vol 33, no.4, p 499-515.
27. LENG, Tan Chee, PING, Ning Shu, LIM, Boey Peng AND KENG, Chan Lai Detection of bioactive compounds from *Spilanthes acmella* (L.) plants and its various in vitro culture products. En: Journal of Medicinal Plants Research, 2011, Vol 5, no.3, p 371-378.
28. MARSH, Philip D, MOTER, Annette AND DEVINE, Deirdre A Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. En: Periodontology 2000, 2011, Vol 55, no.1, p 16-35.
29. MERCADO, Juan Guerra Microbiología Bucal. En: BIOFARBO, 1993 Vol 2, no.2, p.69-72
30. METWALLI, Khalid H, KHAN, Shariq A, KROM, Bastiaan P AND JABRA-RIZK, Mary Ann *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the human mouth: a sticky situation. En: PLoS Pathog, 2013, Vol 9, no.10, p e1003616.
31. MEULMAN, T, PERUZZO, DC, STIPP, RN, GONCALVES, PF, et al. Impact of *Porphyromonas gingivalis* inoculation on ligature-induced alveolar bone loss. A pilot study in rats. En: Journal of periodontal research, 2011, Vol 46, no.5, p 629-636.

32. MOIN, Sarmad, SHIBU, Sahaya, WESLEY, Servin, DEVI, Chitra. Antimicrobial activity of in vitro raised acmella calva (dc.) r.k.jansen. En: International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2012, Vol 4, no. 5, p 124-127.
33. MOROMI, Hilda, CADILLO, Elba Martinez AND PERFECTO, Donald Ramos Antibacterianos naturales orales: Estudios en la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. En: Odontología Sanmarquina, 2009, Vol 12, no.1, p 25-28.
34. NAKATANI, Nobuji AND NAGASHIMA, Mayumi Pungent alkamides from *Spilanthes acmella* L. var. *oleracea* Clarke. En: Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1992, Vol 56, no.5, p 759-762.
35. NARAYANA, K Raj, REDDY, M Spiral, CHALUVADI, MR AND KRISHNA, DR Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. En: Indian journal of pharmacology, 2001, Vol 33, no.1, p 2-16.
36. NICOLAS, Guillaume G AND LAVOIE, Marc C [Streptococcus mutans and oral streptococci in dental plaque]. En: Canadian journal of microbiology, 2011, Vol 57, no.1, p 1-20.
37. NÚÑEZ, Daniel Pedro AND GARCÍA BACALLAO, Lourdes Bioquímica de la caries dental. En: Revista Habanera de Ciencias Médicas, 2010, Vol 9, no.2, p 156-166.
38. OJEDA-GARCÉS, Juan Carlos, OVIEDO-GARCÍA, Eliana AND SALAS, Luis Andrés Streptococcus mutans and dental caries. En: CES Odontología, 2013, Vol 26, no.1, p 44-56.
39. PAVUNRAJ, Manickam, BASKAR, Kathirvelu, JANARTHANAN, Sundaram AND ARUMUGAM, Munusamy Antibacterial and antifeedant activities of *Spilanthes acmella* leaf extract against Gram-negative and Gram-positive bacteria and brinjal fruit borer, *Leucinodes orbonalis* larvae. En: Journal of Coastal Life Medicine, 2014, Vol 2, no.12, p 980-985.

40. PEÑA SISTO, Maritza, PEÑA SISTO, Liliana, DÍAZ FELIZOLA, Ángela, TORRES KEIRUZ, Deysi, et al. La enfermedad periodontal como riesgo de enfermedades sistémicas. En: Revista cubana de estomatología, 2008, Vol 45, no.1, p 0-0.
41. PERAZZO, Fábio Ferreira, SILVA, Ricardo Souza, CARVALHO, José Carlos Tavares AND GROppo, FC Utilización sustancias naturales en Odontología. En: Jornal Brasileiro de Fitomedicina, 2004, Vol 2, no.1, p 9-15.
42. PERFECTO, Donald Ramos, NAKATA, Hilda Moromi AND CADILLO, Elba Martínez Porphyromonas gingivalis: patógeno predominante en la periodontitis crónica. En: Odontología Sanmarquina, 2011, Vol 14, no.1, p 34-38.
43. PHONGPAICHIT, Souwalak, SUBHADHIRASAKUL, Sanan AND WATTANAPIROMSAKUL, Chatchai Antifungal activities of extracts from Thai medicinal plants against opportunistic fungal pathogens associated with AIDS patients. En: Mycoses, 2005, Vol 48, no.5, p 333-338.
44. PRACHAYASITTIKUL, Supaluk, SUPHAPONG, Saowapa, WORACHARTCHEEWAN, Apilak, LAWUNG, Ratana, et al. Bioactive metabolites from Spilanthes acmella Murr. En: Molecules, 2009, Vol 14, no.2, p 850-867.
45. PRACHAYASITTIKUL, Veda, PRACHAYASITTIKUL, Supaluk, RUCHIRAWAT, Somsak AND PRACHAYASITTIKUL, Virapong High therapeutic potential of Spilanthes acmella: A review. En: EXCLI journal, 2013, Vol 12, p 291-312.
46. RANI, A Sabitha AND MURTY, U Suryanarayana Evaluation of Antimicrobial activity of Spilanthes acmella flower head extract. En: Journal of Natural Remedies, 2005, Vol 5, no.2, p 170-171.
47. RANI, S AND MURTY, S Antifungal potential of flower head extract of Spilanthes acmella Linn. En: African Journal of Biomedical Research, 2006, Vol 9, no.1, p.

48. SAVADI, RV, YADAV, R AND YADAV, N Study on immunomodulatory activity of ethanolic extract of *Spilanthes acmella* Murr. leaves. En: *Ind. J. Nat. Prod. Res*, 2010, Vol 1, p 204-207.
49. SHADDOX, LM, ALFANT, B, TOBLER, J AND WALKER, C Perpetuation of subgingival biofilms in an in vitro model. En: *Molecular oral microbiology*, 2010, Vol 25, no.1, p 81-87.
50. TANWER, Babeet S, CHOUDHARY, Ramkishan AND VIJAYVERGIA, Rekha In vitro and in vivo comparative study of primary metabolites and antioxidant activity in *Spilanthes acmella* Murr. En: *Int. J. Biotechnol. Biochem*, 2010, Vol 6, no.5, p 819-825.
51. TEQUIDA-MENESES, Martín, CORTEZ-ROCHA, Mario, ROSAS-BURGOS, Ema Carina, LÓPEZ-SANDOVAL, Susana, et al. Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. En: *Revista iberoamericana de micología*, 2002, Vol 19, p 84-88.
52. VAN DER WEIJDEN, Fridus AND SLOT, Dagmar Else Oral hygiene in the prevention of periodontal diseases: the evidence. En: *Periodontology* 2000, 2011, Vol 55, no.1, p 104-123.
53. WONGSAWATKUL, Orapin, PRACHAYASITTIKUL, Supaluk, ISARANKURA-NA-AYUDHYA, Chartchalem, SATAYAVIVAD, Jutamaad, et al. Vasorelaxant and antioxidant activities of *Spilanthes acmella* Murr. En: *International journal of molecular sciences*, 2008, Vol 9, no.12, p 2724-2744.
54. WU, Li-chen, FAN, Nien-chu, LIN, Ming-hui, CHU, Inn-ray, et al. Anti-inflammatory effect of spilanthol from *Spilanthes acmella* on murine macrophage by down-regulating LPS-induced inflammatory mediators. En: *Journal of agricultural and food chemistry*, 2008, Vol 56, no.7, p 2341-2349.

55. YADAV, Kuldeep AND SINGH, Narender Micropropagation of *Spilanthes acmella* Murr.—An important medicinal plant. En: *Nature and Science*, 2010, Vol 8, no.9, p 5-11.