



UADY
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE
ODONTOLOGÍA

EFICACIA DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE
Allium sativum y *Morinda citrifolia* CONTRA *Enterococcus faecalis*

Tesis presentada por:

JONATHAN BARDALES ALCOCER

En opción al Diploma de Especialización en:

ENDODONCIA

Directores:

M. EN C. MIGUEL ÁNGEL PUC FRANCO

DRA. MARÍA EUGENIA LÓPEZ VILLANUEVA

Mérida, Yucatán, Septiembre 2020



UADY
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE
ODONTOLOGÍA

EFICACIA DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE
Allium sativum y *Morinda citrifolia* CONTRA *Enterococcus faecalis*

Tesis presentada por:

JONATHAN BARDALES ALCOCER

En opción al Diploma de Especialización en:

ENDODONCIA

Directores:

M. EN C. MIGUEL ÁNGEL PUC FRANCO

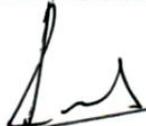
DRA. MARÍA EUGENIA LÓPEZ VILLANUEVA

Mérida, Yucatán, Septiembre 2020

Mérida, Yucatán, 9 de septiembre de 2020

C. JONATHAN BARDALES ALCOCER

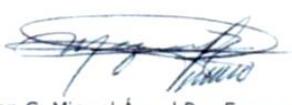
Con base en el dictamen emitido por sus Directores y revisores, le informo que la Tesis titulada "**Eficacia de los extractos hidroalcohólicos de *Allium sativum* y *Morinda citrifolia* contra *Enterococcus faecalis***", presentada como cumplimiento a uno de los requisitos establecidos para optar al Diploma de la Especialización en Endodoncia, ha sido aprobada en su contenido científico, por lo tanto, se le otorga la autorización para que una vez concluidos los trámites administrativos necesarios, se le asigne la fecha y hora en la que deberá realizar su presentación y defensa.



Dr. José Rubén Herrera Atoche
Jefe de la Unidad de Posgrado e Investigación



Dra. María Eugenia López Villanueva
Directora de Tesis



M. en C. Miguel Ángel Puc Franco
Director de Tesis



Dra. Elma María Vega Lizama
Revisora



Dr. Florencio Rueda Gordillo
Revisor

Artículo 78 del reglamento interno
de la facultad de Odontología de la
Universidad Autónoma de Yucatán.

Aunque una tesis hubiera servido para
el examen profesional y hubiera sido
aprobada por el sínodo, solo su autor o
autores es responsable de las
doctrinas emitidas en ella.

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi de la Universidad Autónoma de Yucatán, bajo la dirección de la Doctora María Eugenia López Villanueva y el Maestro en Ciencias Miguel Ángel Puc Franco. Los resultados presentados, son parte del proyecto de investigación “Terapia endodóntica en dientes permanentes en diferentes estadios de formación radicular” con registro en el SISTPROY con clave FODO-2017-0002.

AGRADECIMIENTOS

A mis profesores de la especialidad, por su tiempo, paciencia y dedicación; excelentes personas que transmiten el amor por la profesión cada día. Gracias por el conocimiento transmitido, por los consejos y las críticas constructivas que hicieron de un servidor una persona mejor preparada y con la convicción de seguir el mismo ejemplo.

A la Dra. María Eugenia López Villanueva, por ser una excelente persona, por brindarme su apoyo y amistad incondicional durante mis estudios de licenciatura y ahora en esta etapa de posgrado, agradezco su paciencia, su conocimiento, usted siempre nos brindaba una sonrisa y siempre tenía tiempo para ayudarnos en cualquier situación. Es una fortuna poder haber coincidido en esta etapa profesionalizante, es un digno ejemplo de persona.

A la Dra. Eugenia Guzmán Marín por el apoyo, tiempo, paciencia y consejos durante la especialidad, así como todo el conocimiento transmitido para la realización de este trabajo de investigación.

Al Maestro en Ciencias Miguel Ángel Puc Franco, por su paciencia, entrega y pasión para la realización de este proyecto de investigación, gracias por permitirme trabajar a su lado y por el compromiso en todo este tiempo.

Al Centro de Investigaciones Regionales de la UADY “Dr. Hideyo Noguchi” por permitirme trabajar en sus instalaciones durante la elaboración de este trabajo.

Al Psicólogo Jorge Brito López y su apoyo incondicional en la realización de este proyecto de investigación, gracias por tu tiempo, paciencia y consejos. Agradezco también a Casa Savia por permitirme trabajar en sus instalaciones durante la elaboración de este trabajo.

A la Dra. Elma María Vega Lizama y al Dr. Florencio Rueda Gordillo por su tiempo dedicado en la revisión de este proyecto de investigación, así como por sus consejos, correcciones y mejoras realizadas a este proyecto de investigación.

Gracias a Dios y a las circunstancias de la vida por permitirme vivir esta gran etapa.

DEDICATORIA

A ti, Liliana, por ser un apoyo fundamental en mi formación personal y profesional, por ser una gran esposa, amiga y pilar en mi vida; tu cariño, comprensión, consejos, enseñanzas y amor es una motivación para hacer las cosas mejor cada día.

A ti, Emma, mi amada hija, mi fuente de inspiración; tu vida y existencia me motiva a ser mejor persona cada día.

A mis padres, Raúl y Ligia, sin ustedes esto no hubiese sido posible, gracias por su amor, confianza y apoyo incondicional. Los valores inculcados y sus enseñanzas han sido muy importantes para mí, son un ejemplo de superación digno de admirar.

A mis hermanos, Raúl y Karina, por su amor, cariño y cuidados.

A mis suegros, Hugo y Lilia, por su apoyo incondicional, consejos y por ser un ejemplo de superación.

A Celia Lima, amada abuela, hasta al cielo, gracias por tu amor infinito.

A mis amigos endodónticos, a ustedes malixes, por su amistad, compañerismo y por su apoyo durante este efímero ciclo de especialidad, de cada uno de ustedes aprendí algo nuevo.

ÍNDICE

RESUMEN	
DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
HIPÓTESIS	8
JUSTIFICACIÓN	9
OBJETIVOS	10
MATERIAL Y MÉTODOS	11
RESULTADOS	18
DISCUSIÓN	23
CONCLUSIÓN	26
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Extractor Soxhlet	12
Figura 2. Pesaje del noni	13
Figura 3. Filtración de los extractos de ajo y noni	13
Figura 4. Extractos de ajo y noni filtrados	14
Figura 5. Inoculación de la placa	16
Figura 6. Colocación de los compuestos estudiados	16
Figura 7. Halos de inhibición bacteriana	18
Figura 8. Actividad antimicrobiana en dilución al 25%	19
Figura 9. Actividad antimicrobiana en dilución al 50%	19
Figura 10. Actividad antimicrobiana en dilución al 75%	20
Figura 11. Extracto de ajo al 25% en diferentes tiempos	20
Figura 12. Extracto de ajo al 75% en diferentes tiempos	21
Figura 13. Extracto de noni al 25% en diferentes tiempos	22
Figura 14. A) extracto de noni al 50% y al 75%	22

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de un agente antiplaca ideal	6
Tabla 2. Pruebas bioquímicas de identificación utilizadas para la caracterización fenotípica de <i>E. faecalis</i>	15
Tabla 3. Volúmenes utilizados para obtener las diluciones de los extractos, controles positivos y control negativo. Además de la cantidad de inóculo bacteriano	17
Tabla 4. Concentraciones de extracto de ajo expuesto a un inóculo bacteriano a diferentes tiempos.	20
Tabla 5. Concentraciones de extracto de noni expuesto a un inóculo bacteriano a diferentes tiempos.	21

RESUMEN

Introducción: Los compuestos naturales, en su mayoría de plantas, han sido el pilar de la medicina tradicional durante miles de años. El *Allium sativum* comúnmente llamado ajo se utilizó desde la antigüedad en aplicaciones culinarias y médicas. Contiene una sustancia llamada alicina, que es equivalente a la penicilina, dicha sustancia puede destruir la pared celular y la membrana celular de las bacterias. La *Morinda citrifolia*, es conocida también como noni, Se ha planteado que el noni tiene efectos antimicrobiano, anticanceroso, antioxidante, antiinflamatorio y analgésico. Los Extractos Hidroalcohólicos son extractos líquidos concentrados, obtenidos de la extracción de una planta o parte de ella, utilizando como solvente alcohol y agua. La bacteria *Enterococcus faecalis* se aísla típicamente de los conductos radiculares de dientes con enfermedad periapical persistente, su prevalencia varía entre 24% y 77%. Su resistencia a los irrigantes y medicamentos antibacterianos reside en su modo de crecimiento a manera de biopelícula en las paredes de los conductos radiculares. Objetivo: Determinar la eficacia antimicrobiana *in vitro* de los extractos hidroalcohólicos de *Allium sativum* y *Morinda citrifolia* contra *E. faecalis*. Material y métodos: El estudio es de carácter experimental. El universo fueron microorganismos pertenecientes al género y especie *E. faecalis*; se realizó la recolección de la muestra vegetal y la preparación de los extractos por medio de extractor de vapor con el equipo Soxhlet. Posteriormente se realizaron las pruebas de susceptibilidad con el método Kirby Bauer y con el método Kelsey Maurer con los extractos en diferentes concentraciones (25%, 50% y 75%), y en determinado tiempo (1, 2, 5, 10 y 20 minutos). Resultados: En el método Kirby Bauer en el cual se colocaron los extractos puros se observaron halos de inhibición en el ajo, noni, hipoclorito de sodio y clorhexidina. En el método Kelsey Maurer el ajo mostró inhibición bacteriana a partir de la concentración al 75% desde el minuto 1. El noni mostró inhibición bacteriana a partir de la concentración al 25% desde el minuto 5 y en las concentraciones al 50 y 75% mostró actividad antibacteriana desde el minuto 1. El hipoclorito de sodio y la clorhexidina mostraron inhibición bacteriana en todas sus concentraciones desde el minuto 1. Conclusión: Los extractos hidroalcohólicos fueron efectivos contra *E. faecalis* y se sugiere seguir estudiándolos para verificar su toxicidad y poder realizar pruebas y estudios en pacientes *in vivo*.

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

El éxito del tratamiento endodóntico depende de varios factores tales como el acceso hacia los conductos radiculares, la preparación y la obturación de estos, procedimiento que debe complementarse con el uso de irrigantes, medicación intraconducto y el sellado hermético, evitando así un fracaso del órgano dental tratado.

En endodoncia, se utilizan diversas soluciones irrigantes para los conductos radiculares, principalmente el hipoclorito de sodio, el cual posee alta eficacia antimicrobiana, pero diversos estudios han confirmado que en altas concentraciones es muy tóxico para los tejidos.

El uso de soluciones irrigantes, ayuda a la eliminación de las bacterias durante la limpieza y conformación del conducto radicular durante el tratamiento endodóntico, creando así un ambiente propicio para la reparación de los tejidos periapicales.

Existen microorganismos que de una u otra manera persisten y resisten a la desinfección intraconducto, uno de ellos es el *Enterococcus faecalis*, el cual se encuentra comúnmente en casos de infecciones endodónticas fallidas. Estudios recientes también han demostrado que *E. faecalis* es altamente resistente a los medicamentos intraconductos e irrigantes de uso común.

Los productos a base de plantas se han utilizado desde la antigüedad en la medicina popular, involucrando tanto a las tradiciones medicinales orientales como occidentales. Muchas plantas con propiedades biológicas y antimicrobiológicas han sido estudiadas ya que ha habido un aumento relevante en la resistencia a los antibióticos.

Históricamente, los bulbos de *Allium sativum* (ajo) y *Morinda citrifolia* comúnmente llamada noni, se han utilizado medicinalmente como agente antimicrobiano, desintoxicante, antioxidante, anticancerígeno, anticoagulante, antihipertensivo, antibacteriano, antifúngico, antiviral y antiinflamatorio.

La utilización de plantas en odontología se ha vuelto más populares debido a su fácil disponibilidad, rentabilidad, baja toxicidad, falta de resistencia microbiana y mayor vida útil.

Diversos estudios en Latinoamérica comprueban la eficacia de diversos extractos hidroalcohólicos contra microorganismos orales. En México no existen estudios acerca de su eficacia contra el *E. faecalis*, utilizándolos como soluciones irrigantes.

De acuerdo con lo anteriormente descrito se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Los extractos hidroalcohólicos de *Allium sativum* y *Morinda citrifolia*, tendrán actividad antimicrobiana contra *E. faecalis*?

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En el tratamiento de la patología pulpo-periapical, uno de los objetivos fundamentales del tratamiento endodóntico, consiste en conseguir la máxima eliminación de los microorganismos residentes en los conductos radiculares de los dientes a tratar.

El medio que permite cumplir mayormente este objetivo es la combinación de la instrumentación (limpieza mecánica de las paredes dentinarias internas del conducto mediante instrumental endodóntico estandarizado) y la irrigación de los conductos mediante soluciones que posean capacidad antiséptica, pero que no sean excesivamente irritantes para el tejido conectivo periapical (1).

MICROBIOTA DE LA CAVIDAD ORAL

La microbiota de la cavidad bucal es compleja; está compuesta por microorganismos que ahí se desarrollan y sobreviven, sólo aquellos que pueden adherirse y permanecer en la cavidad bucal tienen oportunidad de crecer, multiplicarse y establecerse; gran parte de los microorganismos, se eliminan y sólo un pequeño porcentaje puede adherirse y persistir en la microbiota bucal (2).

Los microorganismos han sido reconocidos durante mucho tiempo como la etiología primaria en el desarrollo de lesiones óseas periapicales y el fracaso del tratamiento endodóntico, la reinfección y la inflamación periapical continua pueden ocurrir a partir de bacterias residentes del sistema del conducto radicular y los túbulos dentinarios (2).

El éxito del tratamiento endodóntico depende de la eliminación de la microflora infecciosa del conducto radicular, sin embargo, los estudios demuestran que la desinfección completa es difícil de lograr, debido a las complejidades anatómicas del sistema de conductos radiculares. En la cavidad oral, comúnmente existen microorganismos en comunidades complejas de biopelícula que son difíciles de erradicar y a menudo son resistentes a los agentes antimicrobianos (2). Las bacterias en la biopelícula pueden ser 10-1,000 veces más resistentes a los efectos de los agentes antimicrobianos que las bacterias planctónicas (3).

Los enterococos son cocos grampositivos y, debido a sus características morfológicas y genéticas, pueden resistir procedimientos intraconductos y antibióticos sistémicos, incluso en condiciones ecológicas de estrés (4).

1. MICROBIOLOGÍA ENDODÓNTICA

La complejidad de una infección endodóntica depende de las propiedades de las especies microbianas infectantes, de las condiciones de los tejidos de la pulpa y de los factores de defensa del hospedador. Existen bacterias que prevalecen luego de realizar el tratamiento endodóntico (5).

1.1 *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis se aísla típicamente de los conductos radiculares de dientes con enfermedad periapical persistente, en la que su prevalencia varía entre 24% y 77% (6). Su resistencia a los irrigantes y medicamentos antibacterianos reside principalmente en su modo de crecimiento como una biopelícula en las paredes de los conductos radiculares. Los mecanismos de resistencia de *E. faecalis* son el resultado de cambios fisiológicos o estructurales en la célula bacteriana (3).

Generalmente se ha pensado que el *E. faecalis* posee varios factores de virulencia, incluyendo enzimas líticas, citolisina, sustancias de agregación, feromonas y ácido lipotéico, y que estos factores de virulencia juegan un papel clave en la supervivencia de *E. faecalis* en el entorno del conducto radicular y lo hacen capaz de adherirse a la dentina e invadir los túbulos dentinarios, este microorganismo es capaz de transferir estos rasgos de virulencia entre las especies, lo que contribuye aún más a su supervivencia y a su capacidad de causar enfermedades. Además, los genes de resistencia pueden ser inducidos y transferidos entre bacterias, lo que conduce a una mayor resistencia microbiana a los antibióticos (3,7).

Kishen *et al.* destacaron la secuencia de eventos en la interacción de la biopelícula del *E. faecalis* con un sustrato dentinario. Esta bacteria formó primero una biopelícula en la dentina del conducto radicular y luego indujo la disolución de la fracción mineral de la dentina. La capacidad del *E. faecalis* para formar biopelículas puede ser un factor que contribuya a su persistencia después de los tratamientos endodónticos (8).

SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS

Una gran variedad de agentes antimicrobianos se utiliza para el control de los microorganismos bucales relacionados con la formación de la biopelícula de placa dental. El control químico de la placa organizada resulta poco efectivo ante la resistencia que opone esta verdadera biopelícula a la acción de los antimicrobianos (9).

2.1 Hipoclorito de sodio

El hipoclorito de sodio es el irrigante de conductos radiculares más utilizado. Se ha utilizado en diluciones que van del 0,5% al 5,25%. Disuelve el tejido vital y necrótico al descomponer las proteínas en aminoácidos. Es un bactericida de elevada potencia y amplio espectro antimicrobiano, su efectividad antibacterial depende de su concentración (10,11).

La disminución de la concentración de la solución reduce su toxicidad, su efecto antibacteriano y su capacidad de disolver los tejidos. El aumento de su volumen o su calentamiento aumenta su eficacia como irrigante del conducto radicular. El hipoclorito de sodio actúa inhibiendo las reacciones enzimáticas y desnaturalizando las proteínas (11).

2.2 Clorhexidina

El gluconato de clorhexidina se ha utilizado durante los últimos 50 años para la prevención de caries, en la terapia periodontal y como enjuague bucal antiséptico oral.

Tiene una acción antibacteriana de amplio espectro, acción sostenida y baja toxicidad. Debido a estas propiedades, también ha sido recomendado como un potencial irrigante del conducto radicular. Las principales ventajas de la clorhexidina sobre el NaOCl son su menor citotoxicidad y que no presenta mal olor, ni mal sabor. Sin embargo, a diferencia del NaOCl, no puede disolver las sustancias orgánicas, ni los tejidos necróticos presentes en el sistema de conductos radiculares. Además, al igual que el NaOCl, es incapaz de destruir todas las bacterias y eliminar el barrillo dentinario (12,13).

Tabla 1. Características de un agente antiplaca ideal (5,10).

a)	Debe eliminar rápidamente la placa organizada
b)	Debe inhibir la formación de nueva placa
c)	No debe ser tóxico
d)	No debe poseer efectos secundarios adversos
e)	Debe tener características organolépticas aceptables
f)	Debe poseer sustentividad
g)	No debe ser inactivado por productos de los microorganismos o del hospedador
h)	No debe generar resistencia bacteriana
i)	Debe alterar en forma mínima la microbiota asociada con la salud
j)	No debe ser carcinogénico

PLANTAS UTILIZADAS EN MEDICINA

Los compuestos naturales en su mayoría de plantas, han sido el pilar de la medicina tradicional durante miles de años. También han sido la fuente de compuestos para la medicina moderna. Las propiedades medicinales de las plantas están descritas en tablillas de arcilla asiria fechadas alrededor del año 2000 A.C, también han sido documentadas en la cultura egipcia, en el Ayurveda indio, en la medicina tradicional china y en varios documentos europeos (14).

3.1 *Allium Sativum* (ajo)

El ajo es una de las especias comunes de los alimentos, que se utiliza como un medicamento herbolario para la prevención y el tratamiento de las enfermedades, incluidas varias enfermedades infecciosas. Se utilizó desde la antigüedad en aplicaciones culinarias y médicas (15). Es un fuerte agente antibacteriano y actúa como inhibidor, tanto de las bacterias Gram positivas como de las bacterias Gram negativas (16). Hace aproximadamente 3000 años, el ajo era utilizado para combatir los parásitos y prevenir epidemias (15). El principal componente antimicrobiano del ajo se ha identificado como el compuesto de azufre oxigenado di-propenil tiosulfonato, al que se le suele denominar

alicina (16). La alicina puede destruir la pared y la membrana celulares de las bacterias del conducto radicular (15).

La actividad de la alicina ha sido investigada contra un amplio rango de bacterias gram-positivas y gram-negativas, la alicina no está presente en el diente de ajo fresco, pero se libera después de aplastar y picar con la actividad de la enzima aliinasa. Los alíolos, componentes del ajo, incluyen principalmente los cisteinesulfóxidos. La conversión de la aliinasa en alicina por los cisteinóxidos se transforma en tiosulfatos, que son volátiles y lacrimógenos (17). Se demostró que la alicina, un compuesto organosulfúrico que previene la biosíntesis de lípidos, daña la pared de la célula de *Candida albicans* y causa inhibición de la síntesis de ARN de las bacterias (18). Las actividades antimicrobianas de la alicina y el extracto de ajo mostraron un amplio espectro contra Micobacterias, Fotobacterias, Proteus, Pseudomonas, Salmonella, Estafilococo, Escherichia, Helicobacter, Clostridium, Criptocariocario, Klebsiella y especies de Bacilosis (19).

3.2 *Morinda citrifolia* (noni)

La *Morinda citrifolia*, de la familia Rubiaceae, es conocida también como noni y a todas las partes de la planta como el fruto, hojas, flores, corteza y raíces se le han atribuido usos medicinales. Las hojas y el fruto han sido utilizados por más de 2 000 años para el tratamiento de la artritis, para reducir diferentes tipos de dolor, así como para tratar varias enfermedades. Se ha planteado que el noni tiene efectos antimicrobiano, anticanceroso, antioxidante, antiinflamatorio y analgésico (20).

Singh *et al.* en 2019 determinaron que existe efecto antimicrobiano contra *E. faecalis* con el extracto de *Morinda citrifolia* en concentraciones elevadas (21).

Chaitanya *et al.* en 2016 encontraron inhibición de crecimiento de *E. faecalis* con extractos hidroalcohólicos de *Morinda citrifolia* (22).

HIPÓTESIS

Los extractos hidroalcohólicos de *Allium sativum* y *Morinda citrifolia* tienen efecto bactericida contra *E. faecalis*.

JUSTIFICACIÓN

El tratamiento de las enfermedades infecciosas bucales es complejo, la utilización de antisépticos y desinfectantes para el control de diferentes agentes infecciosos y contaminantes aún presenta inconvenientes; además, se ha descrito la resistencia adquirida por las bacterias ante los fármacos.

En años recientes, se ha dirigido la atención hacia las plantas quienes producen diversos metabolitos secundarios, algunos de ellos con actividad antimicrobiana, considerándose una fuente importante para el hallazgo de nuevos agentes terapéuticos.

Diversos estudios en Latinoamérica comprueban la eficacia de diversos extractos hidroalcohólicos contra microorganismos orales. En México existen pocos estudios acerca de la eficacia de soluciones irrigantes contra el *E. faecalis*.

Este estudio brindará la oportunidad de conocer y poder utilizar soluciones irrigantes alternativas con baja toxicidad para el huésped y alta eficacia contra los microorganismos patógenos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la eficacia antimicrobiana *in vitro* de los extractos hidroalcohólicos de *Allium sativum* y *Morinda citrifolia* contra *E. faecalis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener los extractos hidroalcohólicos de *Allium sativum* y *Morinda citrifolia*.
2. Determinar la actividad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Allium sativum* contra *E. faecalis*.
3. Determinar la actividad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Morinda citrifolia* contra *E. faecalis*.
4. Comparar la actividad *in vitro* de los extractos hidroalcohólico de *Allium sativum* y *Morinda citrifolia* con la solución de hipoclorito de sodio y clorhexidina al 2% en diferentes concentraciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO DE ESTUDIO: Experimental, longitudinal y prospectivo.

VARIABLES Y ANALISIS ESTADÍSTICOS

Nombre de variable	Tipo de variable	Indicador	Escala de medición	Objetivo a cumplir	Análisis estadístico
Actividad antimicrobiana	Dependiente	Capacidad del extracto en eliminar o inhibir el crecimiento bacteriano que se desarrolla en un medio dado	Cualitativa - Presencia - Ausencia de crecimiento bacteriano	Objetivo #2 y #3	Descriptivo Chi cuadrada
Tiempo	Independiente	Tiempo de acción de las soluciones	Cualitativa Minutos	Objetivo #2, #3 y #4	
Extractos hidroalcohólicos y controles positivos en concentraciones al 25, 50 y 75%	Independiente	Comparar actividad antimicrobiana con las diferentes soluciones irrigantes	Cualitativa Porcentaje	Objetivo #2, #3 y #4	

POBLACIÓN DE ESTUDIO

1. UNIVERSO

Microorganismos pertenecientes al género y especie *E. faecalis*.

METODOLOGÍA

Recolección de la muestra vegetal

Preparación de los extractos hidroalcohólicos

Se recolectaron los dientes de ajo y el fruto del noni, se separaron las sustancias extrañas tales como partículas de tierra y hojas pegadas al fruto y se procedió a lavar el material vegetal con agua potable a chorro y después con agua destilada.

Se descartaron las muestras vegetales que no reunieron las características necesarias para su utilización, tales como dientes de ajo o partes del noni que se encontraron dañados o en proceso de descomposición.

La obtención de los extractos se realizó mediante un proceso de extracción sólido-líquido utilizando un equipo de extracción continua tipo Soxhlet de 250mL de capacidad.



Figura 1. Extractor soxhlet

Se pesaron 25gr de ajo y 25 gr de noni, se extrajeron los compuestos secundarios con 200mL de metanol al 98% por el método de extracción continua con el extractor tipo Soxhlet (23).



Figura 2. Pesaje del noni

Posteriormente se evaporó el metanol de los extractos obtenidos mediante la colocación de los mismos en una estufa de calor controlada a una temperatura de 50°C por 48 horas. Una vez evaporado el metanol se realizó una filtración de los extractos por medio de un filtro de membrana de 0.45 μm para la eliminación de partículas. Todo lo anterior fue realizado bajo condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar. Los extractos permanecieron en refrigeración hasta su uso.



Figura 3. Filtración de los extractos de ajo y noni



Figura 4. Extractos de ajo y noni filtrados

Obtención de la cepa de *E. faecalis*

El material microbiológico perteneciente al género y especie *E. faecalis* fue donado por el laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación Regional Dr. Hideyo Noguchi.

Recuperación de las cepas

Se sembraron alícuotas de las cepas conservadas en congelación en caldo soya tripticaseína (TSB) y se incubaron de 4 a 6 horas a 37°C.

Una asada de este crecimiento se inoculó directamente en cajas con agar soya tripticaseína (TSA) y se incubaron durante 24 horas a 37°C en condiciones aeróbicas. A las colonias sugestivas de *Enterococcus* se les realizaron las pruebas bioquímicas recomendadas por la American Society for Microbiology (24).

Pruebas bioquímicas de identificación:

Para poder determinar las características específicas metabólicas de la bacteria, se realizaron pruebas bioquímicas de identificación para *E. faecalis*. Las pruebas de identificación realizadas se enlistan en la tabla 2.

Tabla 2. Pruebas bioquímicas de identificación utilizadas para la caracterización fenotípica de *E. faecalis*

PRUEBA BIOQUÍMICA	INDICADOR
Prueba de Catalasa	Respuesta positiva (burbujeo)
Siembra en caldos de cultivo adicionado con azúcares al 6.5% (Manitol, Sacarosa, Sorbitol)	Cambio de coloración del medio de cultivo
Siembra en caldo de cultivo adicionado con telurito al 0.4%	Cambio de coloración del medio de cultivo
Siembra en caldo de cultivo adicionado con 6.5% de cloruro de sodio	Presencia de Turbidez

Fuente: Juliet I. Chrystal. Estudio de susceptibilidad *in vitro* de *Enterococcus* spp. Rev. chil. infectol (25).

Método de difusión en agar (Método Kirby-Bauer)

I.- Preparación del inóculo

De las cepas identificadas como *E. faecalis*, se tomó una asada, se sembró en 5 mL de caldo Müeller Hinton (M.H.) y se incubó a 37°C durante 2-3 horas. Pasado el tiempo de incubación se ajustó la densidad a una turbidez equivalente a la del tubo 0.5 del nefelómetro de Mac-Farland (esto equivale a una concentración aproximada de 1.5×10^8 UFC/mL), utilizando solución salina estéril (26).

Inoculación del agar Müeller Hinton

Se sumergió un aplicador de algodón estéril dentro de la suspensión del caldo bacteriano (M.H.), (se colocó el aplicador por encima del nivel del contenido del tubo y se rotó contra las paredes del mismo para remover el exceso del inóculo) y se sembró el inóculo uniformemente sobre la superficie del medio con el aplicador. Haciendo esta

siembra en tres direcciones. Se dejó reposar la placa 5 minutos a temperatura ambiente para que se seque el inóculo.



Figura 5. Inoculación de la placa

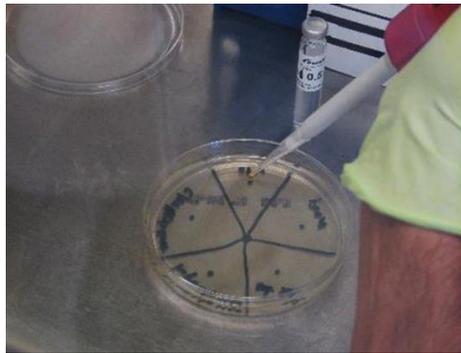


Figura 6. Colocación de los compuestos estudiados

Después se procedió a depositar 10 microlitros de los extractos al 100% de concentración (noni y ajo) y de las soluciones control (hipoclorito de sodio al 5.25%, clorhexidina al 2% y solución salina), dejando entre cada inóculo un espacio para evitar que las zonas de inhibición queden sobrepuestas. Se dejaron secar los inóculos y se incubaron las cajas a 37°C en condiciones aeróbicas. Las cajas fueron revisadas después de 16-24 horas de incubación, con el objetivo de observar halos de inhibición con las soluciones probadas.

Método Kelsey Maurer

En tubos de microcentrífuga (Eppendorf®) con capacidad de 1.5mL, se prepararon las siguientes diluciones; 25%, 50% y 75%, de los extractos (noni y ajo) y de las soluciones control (hipoclorito de sodio al 5.25%, clorhexidina al 2%), utilizando como diluyente caldo M.H.

La preparación del inóculo bacteriano se realizó como se mencionó previamente (preparación del inóculo). Después se procedió a diluir la suspensión bacteriana a 10^7 UFC/mL (1:10) quedando lista para usarse como inóculo final.

Evaluación de la inhibición bacteriana.

En un tubo Ependorf® de 1.5mL se depositó 90 microlitros del extracto de noni al 25% y se le agrego 10 microlitros del inóculo diluido y se mezcló en vortex, se dejó reposar 1 minuto, para posteriormente tomar 10 microlitros y sembrarlo en agar MH. Se incubó a 37°C durante 24 horas para evaluar la presencia o ausencia bacteriana.

Los dos extractos fueron evaluados de la misma forma anteriormente mencionada, en sus diferentes diluciones (25%, 50% y 75%) y con diferentes tiempos (1, 2, 5, 10 y 20 minutos), utilizando como controles positivos (hipoclorito de sodio y la clorhexidina) y como control negativo solución salina estéril. Después de cada exposición bacteriana se sembró un inóculo de 10 microlitros en agar MH. Además, se sembró un agar MH con el inoculo inicial utilizado (10^7 UFC/ML). La prueba se realizó por triplicado.

Tabla 3. Volúmenes utilizados para obtener las diluciones de los extractos, controles positivos y control negativo. Además de la cantidad de inóculo bacteriano.

Extractos y controles	Caldo MH (cbp)	Inóculo bacteriano	Concentración
25 µl	65 µl	10 µl	25%
50 µl	40 µl	10 µl	50%
75 µl	15 µl	10 µl	75%

RESULTADOS

En el presente estudio se evaluó la capacidad bactericida de los extractos hidroalcohólicos *in vitro* de ajo (*Allium sativum*) y noni (*Morinda citrifolia*), contra el *Enterococcus faecalis* por dos métodos (método de Kirby-Bauer y el método de Kelsey Maurer). Utilizando como controles positivos las soluciones de hipoclorito de sodio y clorhexidina, y como control negativo solución salina estéril.

En el método de Kirby-Bauer se observó inhibición bacteriana en hipoclorito y en la clorhexidina los cuales fueron utilizados como controles positivos, en la solución salina no se observó inhibición (control negativo). Para los extractos utilizados, en el noni se observó inhibición bacteriana y en el ajo se pudo apreciar una ligera disminución en la densidad bacteriana (figura 7).



Figura 7. Halos de inhibición bacteriana

Utilizando el método de Kelsey Maurer, donde se evaluó la capacidad bactericida de los extractos a diferentes concentraciones (25%, 50% y 75%), contra el *Enterococcus faecalis* a diferentes tiempos de exposición (1, 2, 5, 10 y 20 minutos) se pudo observar lo siguiente: En la dilución de los extractos hidroalcohólicos al 25%, el de ajo no mostró inhibición de crecimiento bacteriano en ninguno de los tiempos establecidos (1, 2, 5, 10 y 20 minutos), el extracto de noni mostró inhibición a partir del minuto cinco y respecto a las soluciones de hipoclorito y clorhexidina mostraron inhibición en todos los tiempos establecidos.



Figura 8. Actividad Antimicrobiana en dilución al 25%

Al hacer el análisis estadístico por el método de Chi cuadrada, este no procedió debido a que no hubo variación entre las réplicas de los tratamientos generando un comportamiento constante en la respuesta.

En la dilución de los extractos al 50%, el extracto de ajo no mostró inhibición de crecimiento bacteriano en ninguno de los tiempos establecidos, el extracto de noni mostró inhibición de crecimiento bacteriano en todos los tiempos establecidos al igual que las soluciones de hipoclorito de sodio y clorhexidina.

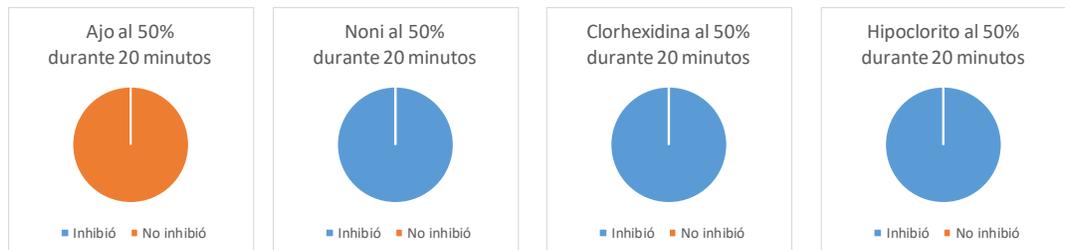


Figura 9. Actividad Antimicrobiana en dilución al 50%

En la dilución de los extractos al 75%, el extracto de ajo mostró inhibición de crecimiento bacteriano a partir del minuto uno y en todos los demás tiempos establecidos, el extracto de noni también mostró inhibición de crecimiento bacteriano en todos los tiempos establecidos, al igual que las soluciones de hipoclorito de sodio y clorhexidina.

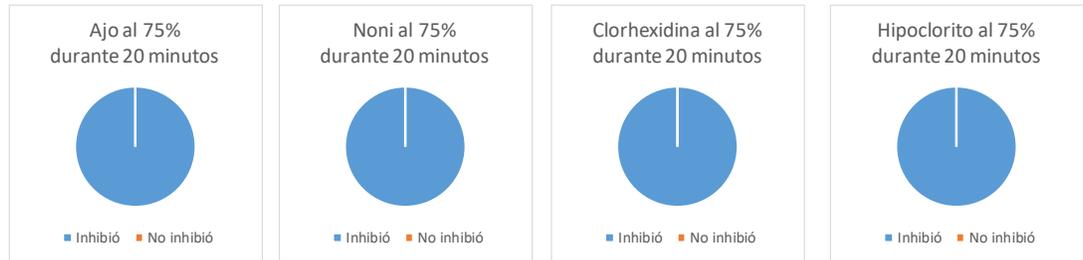


Figura 10. Actividad Antimicrobiana en dilución al 75%

Tabla 4. Concentraciones de extracto de ajo expuesto a un inóculo bacteriano a diferentes tiempos.

Extracto de ajo	Tiempo en minutos				
	1	2	5	10	20
25%	+	+	+	+	+
50%	+	+	+	+	+
75%	-	-	-	-	-

Actividad antimicrobiana (+) No inhibición, (-) Inhibición

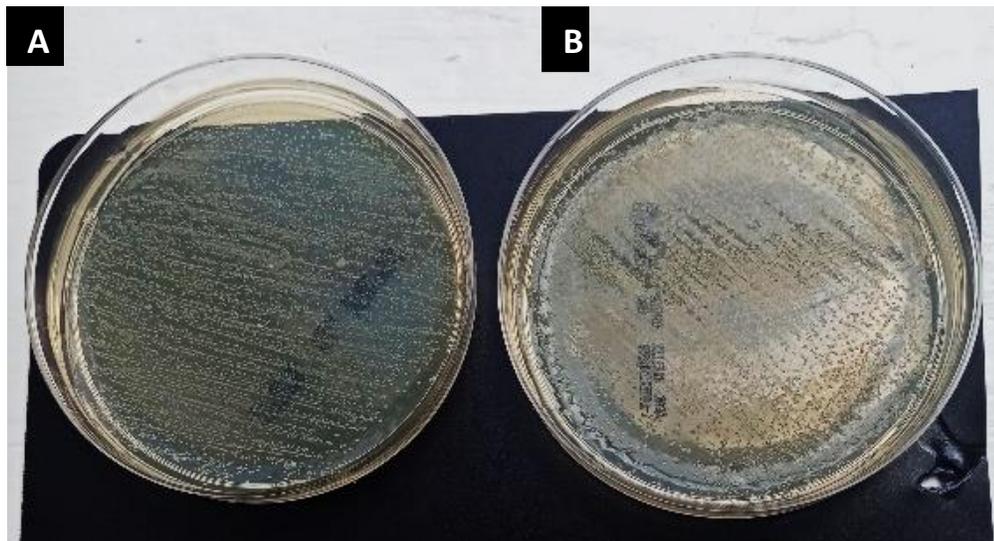


Figura 11. Extracto de ajo al 25%, A) 1 minuto, B) 2 minutos, presencia de crecimiento bacteriano

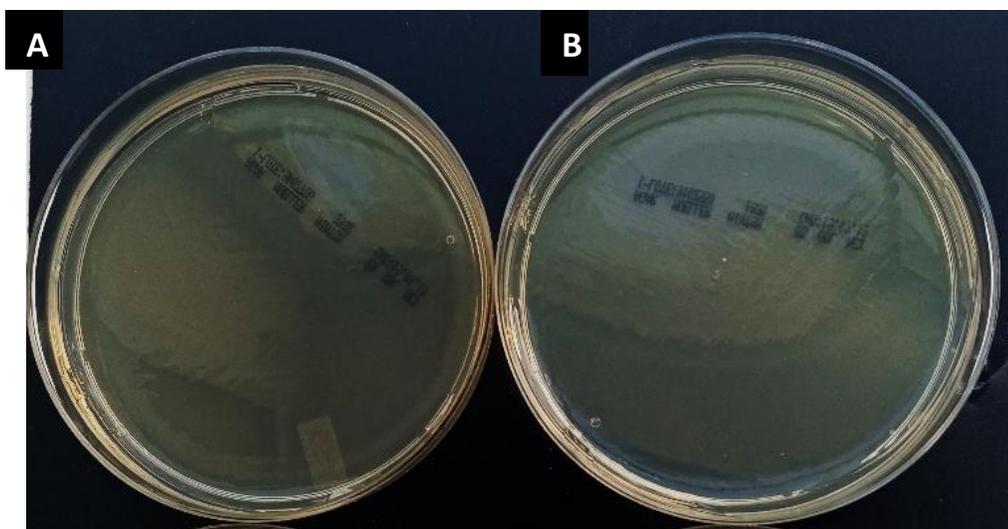


Figura 12. Extracto de ajo al 75%. A) 1 minuto, B) 5 minutos, ausencia de crecimiento bacteriano

Tabla 5. Concentraciones de extracto de noni expuesto a un inóculo bacteriano a diferentes tiempos.

Extracto de noni	Tiempo en minutos				
	1	2	5	10	20
25%	+	+	-	-	-
50%	+	-	-	-	-
75%	-	-	-	-	-

Actividad antimicrobiana (+) No inhibición, (-) Inhibición

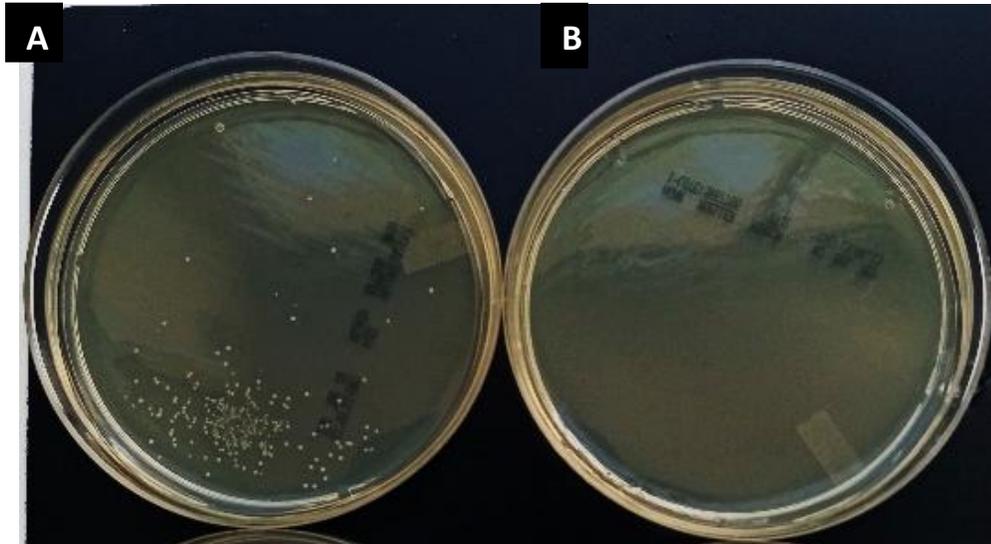


Figura 13. A) extracto de noni al 25%, 2 minutos; Presencia de crecimiento bacteriano, b) extracto de noni al 25%, 5 minutos; Ausencia de crecimiento bacteriano

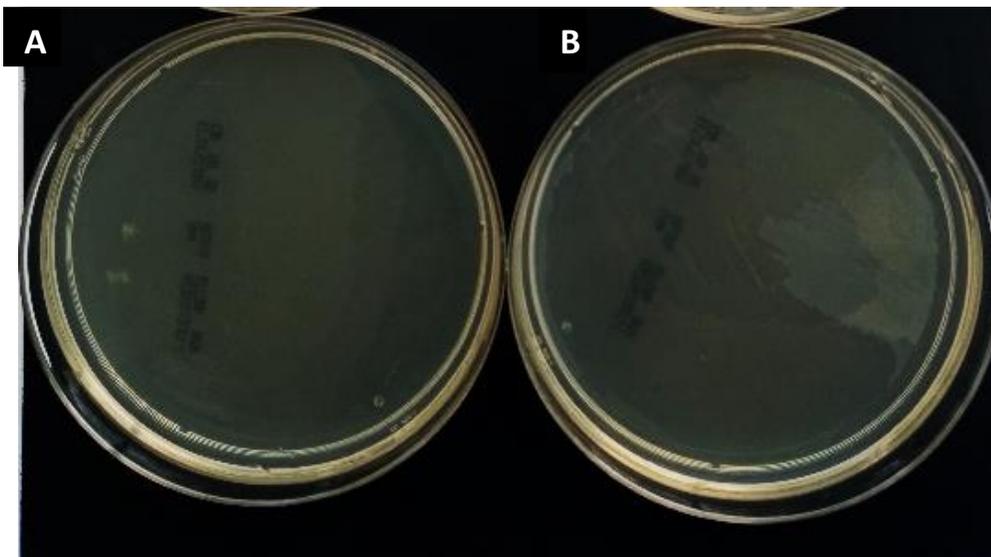


Figura 14. A) extracto de noni al 50%, 1 minuto; B) extracto de noni al 75%, 1 minuto; Ausencia de crecimiento bacteriano

DISCUSIÓN

Son escasos los estudios de *Allium sativum* y *Morinda citrifolia*, frente al *E. faecalis*, pero se han realizado estudios con otros microorganismos al igual que con otras plantas medicinales, resultando ser eficientes antimicrobianos.

Gull, I. *et al.* en 2012 investigaron el potencial antimicrobiano de diferentes tipos de extractos de ajo (acuoso, metanólico y etanólico) contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus epidermidis* y *Salmonella*. Los resultados indican que los diferentes tipos de extractos mostraron actividad antibacterial con grados de inhibición variables. En nuestro estudio se utilizó un extracto metanólico de ajo mostrando resultados favorables en la inhibición de crecimiento bacteriano en concentraciones elevadas de dicho extracto.

Karkare *et al.* en 2015 compararon la actividad de extractos hidroalcoholicos de aloe vera y ajo puro y en dilución, así como hipoclorito de sodio al 5% contra *E. faecalis*, encontrando inhibición de crecimiento bacteriano, en mayor medida con el hipoclorito de sodio, seguida de aloe vera y ajo. Tal como se esperaba en nuestro estudio, el hipoclorito de sodio fue el que presentó mayor actividad antimicrobiana, así como también del extracto del ajo en menor medida.

Chaitanya, en 2016 demostró actividad antimicrobiana del extracto de *Morinda citrifolia* contra *E. faecalis*, con resultados similares en nuestro estudio, siendo el hipoclorito de sodio el que presentó mayor inhibición de crecimiento bacteriano en comparación con el extracto de *Morinda citrifolia*.

Babaji *et al.* en 2016 compararon el efecto antimicrobiano de *Morinda citrifolia*, *Azadirachta indica* y *Aloe vera* con hipoclorito de sodio como irrigantes de conductos, encontrando una alta zona de inhibición del hipoclorito de sodio en contra de la bacteria, seguida del extracto de *Morinda citrifolia*, *A. indica* y finalmente del *Aloe vera*, demostrando que la planta *Morinda citrifolia* tiene propiedades antimicrobianas al igual que en nuestro estudio.

Uc Cen en 2018 evaluó la capacidad antimicrobiana de extractos acuosos de *Azadirachta indica* en contra *E. faecalis*, la concentración de dichos extractos era al 10 % y al 20 %, sin embargo, en este estudio los extractos acuosos no mostraron actividad antimicrobiana contra el *E. faecalis*, a pesar de que se ha demostrado que la *A. indica* tiene propiedades antimicrobianas, la resistencia del *E. faecalis* pudo deberse a que la manera de extraer los metabolitos secundarios de la planta por medio de extractos acuosos fue insuficiente. En nuestro estudio al utilizar el método de destilación con el equipo Soxhlet y utilizando metanol al 98 % como solvente, conseguimos extraer mejor los metabólicos secundarios del ajo y del noni para tener un óptimo aprovechamiento de los mismos y demostrar eficacia contra el *E. faecalis*.

Barani Kumarasamy en 2014 demostró inhibición de crecimiento de *S. mutans* y *S. mitis*, con extracto acuoso de *M. citrifolia* en diferentes concentraciones contra estas bacterias relacionadas con la aparición de caries. Con este estudio se puede determinar que, a pesar de utilizar diferentes tipos de extractos, se pueden aprovechar las propiedades antimicrobianas de las plantas.

Podar *et al.* en 2015 evaluaron *in vivo* la *Morinda citrifolia* al 6%, *Azadirachta indica* al 6% e hipoclorito de sodio al 3%, utilizando dichas soluciones como irrigantes intraconducto en dientes no vitales. En este estudio se concluyó que no existe diferencia significativa en la eficacia antimicrobiana con los extractos de *Morinda citrifolia*, *azadirachta indica* al 6% y el hipoclorito de sodio al 3%; comparado con nuestro estudio, en concentraciones elevadas el extracto de ajo y de noni fueron igual de efectivas que la clorhexidina al 2% y al hipoclorito de sodio al 5.25%.

Anuj Bhardwaj *et al.* en 2013, evaluaron la eficacia, *in vitro*, de los extractos de *Morinda citrifolia*, *Aloe vera* y Propóleo como irrigantes intraconducto activados ultrasónicamente en comparación con hipoclorito de sodio al 1% para remover biopelícula de *E. faecalis* en las paredes de los conductos radiculares, el hipoclorito de sodio al 1% resultó ser más efectivo que las demás soluciones pero, las demás soluciones fueron efectivas en cierta medida para remover biopelícula cuando se activaba ultrasónicamente.

A pesar de demostrarse actividad antimicrobiana del *Allium sativum* y de la *Morinda citrifolia* se sugiere seguir estudiando estos extractos con la finalidad de determinar si poseen toxicidad a nivel celular para el huésped, para poder realizar estudios *in vivo* con la seguridad de no hacer daño a los tejidos del huésped; así como también de seguir investigando la capacidad antimicrobiana de estos extractos en contra de bacterias organizadas en forma de biopelícula, es prometedor que se haya demostrado que existe cierta capacidad de remover biopelícula cuando se activa ultrasónicamente; realizar estudios *in vivo* aplicándolos, ya sea como soluciones irrigantes o como medicamento intraconducto, con la ventaja de ser plantas relativamente fáciles de conseguir.

CONCLUSIÓN

En este estudio se determinó que los extractos hidroalcohólicos de ajo (*Allium sativum*) y noni (*Morinda citrifolia*) demostraron actividad antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis* en concentraciones al 25, 50 y 75%, y en diferentes tiempos establecidos (1, 2 5, 10 y 20 minutos), el extracto del noni (*Morinda citrifolia*) mostró actividad antimicrobiana a partir de la concentración al 25%, desde los 5 minutos, siendo más efectivo en comparación con el extracto de ajo (*Allium sativum*), el cual mostró actividad antimicrobiana a partir de la concentración al 75% desde el minuto 1. Cabe mencionar que las soluciones de hipoclorito de sodio y de clorhexidina inhibieron el crecimiento del *E. faecalis* en todas las diluciones probadas siendo estas excelentes antimicrobianos, con características diferentes, así como con diferentes ventajas y desventajas, es por eso que son un referente de uso en el área endodóntica.

Es importante conocer que pueden existir alternativas al hipoclorito de sodio y la clorhexidina, de origen natural y de plantas relativamente fáciles de conseguir que nos pueden servir como antimicrobianos en endodoncia y en la odontología en general, sin embargo, es necesario tener la mayor cantidad de estudios que avalen esta práctica con la finalidad de usar soluciones más compatibles y sin efecto citotóxico para el cuerpo humano.

Es conveniente aprovechar los recursos que la naturaleza nos brinda y que han servido de base en la medicina desde hace muchos años, pero es necesario realizarlo de manera responsable y con conocimiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Spangberg L, Engström B, Langeland K. Biologic effects of dental materials. 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1973;36(6):856-71.
2. Xie Q, Johnson BR, Wenckus CS, Fayad MI, Wu CD. Efficacy of berberine, an antimicrobial plant alkaloid, as an endodontic irrigant against a mixed-culture biofilm in an in vitro tooth model. *J Endod.* 2012;38(8):1114–7.
3. Tong Z, Ling J, Lin Z, Li X, Mu Y. The effect of MTADN on 10 *Enterococcus faecalis* isolates and biofilm: An in vitro study. *J Endod.* 2013;39(5):674–8.
4. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod.* 2002;28(10):689–93.
5. Negroni M. *Microbiología Estomatológica: fundamentos y guía práctica.* 2a ed. Buenos Aires. Médica Panamericana. 2009.
6. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, et al. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.* 2006;32(2):93-98.
7. Kishen A, Sum CP, Mathew S, Lim CT. Influence of irrigation regimens on the adherence of *Enterococcus faecalis* to root canal dentin. *J Endod.* 2008;34(7):850-854.
8. Xu J, He J, Shen Y, et al. Influence of Endodontic Procedure on the Adherence of *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2019;45(7):943-949.
9. Abbot PV. Diagnosis and management planning for root-filled teeth with persisting or new apical pathosis. *Endod Top.* 2008;19(1):1–21.
10. Zehnder M. Root Canal Irrigants. *J Endod.* 2006;32(5):389–98.
11. Johnson WT, Noblett WC. *Cleaning and Shaping in: Endodontics: Principles and Practice.* 4th ed. Saunders, Philadelphia, PA, 2009.

12. Lee LW, Lan WH, Wang GY. An evaluation of chlorhexidine as an endodontic irrigant. *J Formos Med Assoc* 1990;89:491-7.
13. Southard SR, Drisko CL, Killoy WJ, Cobb CM, Tira DE. The effect of 2.0% chlorhexidine digluconate irrigation on clinical parameters and the level of *Bacteroidesgingivalis* in periodontal pockets. *J Periodontol* 1989;60:302-9.
14. Ginsburg H, Deharo E. A call for using natural compounds in the development of new antimalarial treatments - an introduction. *Malar J.* 2011;10 Suppl 1:S1.
15. Karkare SR, Ahire NP1, Khedkar SU. Comparative evaluation of antimicrobial activity of hydroalcoholic extract of Aloe vera, garlic, as root canal irrigants against *Enterococcus faecalis*: An in vitro study, *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2015; 33(4):274-8.
16. Dwivedi VP, Bhattacharya D, Singh M, et al. Allicin enhances antimicrobial activity of macrophages during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Ethnopharmacol.* 2019;243:111634.
17. Block, E., Naganathan, S., Putman, D., & Zhao, S. H. Allium chemistry: HPLC analysis of thiosulfinates from onion, garlic, wild garlic (ramsoms), leek, scallion, shallot, elephant (great-headed) garlic, chive, and Chinese chive. Uniquely high allyl to methyl ratios in some garlic samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1992. 40(12), 2418–2430.
18. Feldberg, R. S., Chang, S. C., Kotik, A. N., Nadler, M., Neuwirth, Z., Sundstrom, D. C., & Thompson, N. H. In vitro mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1988. 32(12), 1763–1768.
19. Guo, J. J. ; Kuo, C. M. ; Hong, J. W. ; Chou, R. L. ; Lee, Y. H. ; Chen, T. I. The effects of garlic-supplemented diets on antibacterial activities against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and *Streptococcus iniae* and on growth in *Cobia*, *Rachycentron canadum*. *Aquaculture.* 2015. 435, 111–115.

20. Sánchez Rodríguez Nora, Bu Wong Margarita, Pérez-Saad Héctor, Lara Fernández Gloria, Scull Isidoro. Efecto del zumo de *Morinda citrifolia* L. (noni) en modelos de analgesia. *Rev Cubana Plant Med.* 2012. (3): 213-216.
21. Singh M, Singh S, Salgar AR, Prathibha N, Chandrahari N, Swapna LA. An In Vitro Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Propolis, *Morinda Citrifolia* Juice, Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine on *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *J Contemp Dent Pract.* 2019;20(1):40-45.
22. Chaitanya, B. V. Comparison of Antibacterial Efficacy of Turmeric Extract, *Morinda Citrifolia* and 3% Sodium Hypochlorite on *Enterococcus faecalis*: An In-vitro Study. *J Clin Diagn Res.* 2016. 10(10): ZC55–ZC57.
23. Yue, Y, Qiu, Z, Qu, X, Deng, A, Yuan, Y. Discoursing on Soxhlet extraction of ginseng using association analysis and scanning electron microscopy. *Journal of Pharmaceutical Analysis.* 2018.08.003.
24. Kelly M T, Brenner D J and Farmer J J. *Manual of Clinical Microbiology.* American Society for Microbiology. 2003: 422-433
25. Juliet L. Chrystal. Estudio de susceptibilidad in vitro de *Enterococcus* spp. *Rev. chil. infectol.* 2002. 19: 111-115.
26. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. XII Informational Supplement. M100-S12. 2002 NCCLS.