



# **BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado  
Facultad de Estomatología

TESIS

**“ACTIVIDAD ANTIADHESIVA *IN VITRO* DE HIDROGEL DE  
QUITOSANO/*RUMEX OBTUSIFOLIUS* CONTRA *STREPTOCOCCUS*  
*MUTANS* EN ÓRGANOS DENTARIOS PRIMARIOS.”**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**Maestría en Estomatología con opción terminal en Pediatría**

**PRESENTA:**

**L.E. Mariana Ruiz Herrera ID: 218450011**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**D.C. Alberto Vinicio Jerezano Domínguez ID: NSS524063**

**DIRECTOR DISCIPLINARIO:**

**D.C. Miguel Ángel Casillas Santana ID: 100526485**

**DIRECTOR METODOLÓGICO:**

**D.C. Diana del Carmen Pazos Guarneros ID: 100524009**

**ASESOR:**

**D.C. Yolanda Elizabeth Morales García ID: 100523492**

**LECTOR:**

**Mtra. Adriana María Martínez Hernández ID:100483611**

**Puebla, Pue. 20 de mayo 2020**





**BUAP**

Oficio No. FESIEP/095/2020

C. Mariana Ruiz Herrera  
Matrícula: 218450011  
Alumno de la Maestría en Estomatología  
Con opción Terminal en Pediatría  
De la Facultad de Estomatología  
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla  
**P R E S E N T E.**

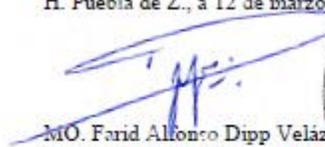
*El que suscribe, MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez, Secretario de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por este medio me permito informar a usted que esta Secretaría aprueba la impresión de la Tesis titulada "Actividad antiadhesiva in vitro de hidrogel de quitosano/rumex obtusifolius contra streptococcus mutans en órganos dentarios primarios", misma que presentará para realizar su examen profesional y obtener el grado de Maestro en Estomatología con Opción Terminal en Pediatría.*

*Sin más por el momento, deseándole lo mejor, le reitero mi distinguida consideración.*

Atentamente

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z., a 12 de marzo de 2020

  
MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez  
Secretario de Investigación y Estudios de Posgrado  
Facultad de Estomatología



Facultad  
de Estomatología

31 Poniente 1364, Col. Volcanes,  
Puebla, Pue. C. P. 72410  
01 (222) 229 55 00 Ext. 6400

**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**  
**FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA**  
**SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS RECEPCIONAL**

Para obtener el Grado de: Maestro(a) en Estomatología con opción terminal en Pediatría  
Registro CIFE: 2018097 Fecha: 12 de marzo de 2020

Título de la Tesis (anexarlo impreso y CD) **ACTIVIDAD ANTIADHESIVA *IN VITRO* DE HIDROGEL DE QUITOSANO/*RUMEX* *OBTUSIFOLIUS* CONTRA *STREPTOCOCCUS MUTANS* EN ÓRGANOS DENTARIOS PRIMARIOS.**

Nombre del alumno: **MARIANA RUIZ HERRERA** Matrícula: 218450011

Domicilio: **RADAMES TREVIÑO #4842 COL. UNIDAD MAGISTERIAL MÉXICO 68 PUEBLA, PUE.**

Tel: 2224250960 Fecha de ingreso a la Facultad: **ENERO 2018**

Firma: \_\_\_\_\_ 

Director de tesis: **DC. ALBERTO VINICIO JEREZANO DOMÍNGUEZ** Grado académico: **Doctor en Ciencias**

Adscripción: **Facultad de Estomatología ID: NSS524063 TEL: 2224269508**

Firma: \_\_\_\_\_ 

Director disciplinario: **DC. MIGUEL ANGEL CASILLAS SANTANA** Grado académico: **Doctor en Ciencias**

Adscripción: **Facultad de Estomatología ID: 100526485 Tel: 4448467645**

Firma: \_\_\_\_\_ 

Director metodológico: **DC. DIANA DEL CARMEN PAZOS GUARNEROS** Grado académico: **Doctor en Ciencias**

Adscripción: **Facultad de Estomatología ID: 100524009 Tel: 5540806082**

Firma: \_\_\_\_\_ 

Asesor: **DC. YOLANDA ELIZABETH MORALES GARCÍA** Grado académico: **Doctor en ciencias**

Adscripción: **Facultad de Ciencias Biológicas ID: 100523492 Tel: 2214438505**

Firma: \_\_\_\_\_ 

Lector: **Mtra. ADRIANA MARÍA MARTÍNEZ HERNÁNDEZ** Grado académico: **Maestría en Ciencias**

**Médicas e Investigación** Adscripción: **Facultad de Estomatología ID:100483611 Tel: 2221937773**

Firma: \_\_\_\_\_ 

Nombre y firma de aprobación Responsable de la Maestría en  
Estomatología con Opción terminal en Pediatría

MEP. José Alberto Hachity Ortega

Firma: \_\_\_\_\_ 

La Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología, autoriza la  
impresión de la Tesis.

  
MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez

Fecha: 12 de marzo de 2020

Sello



## AGRADECIMIENTOS

“Todo lo que hagas en la vida será insignificante, pero es importante que lo hagas”  
Gandhi

A mi madre Rosario Herrera Martínez y a mi padre Alfredo Ruiz Castillo por ser personas de carácter fuerte, valiente y amoroso, por educarme con todos los valores necesarios para llegar a ser la mujer que soy, por creer en mí y apoyarme en cada paso, por nunca dejarme caer, sé que estos dos años fueron difíciles, pero lo logramos. Gracias por ser un gran ejemplo de dedicación, esfuerzo, bondad y amor.

A mi hermana Elisa, por su apoyo incondicional y por creer en mí cuando ni yo creía que podía lograrlo. Te amo

A mi novio Enrique, por su paciencia y apoyo, por aguantar estos años a mi lado, con buenos y malos momentos, por darme la paz y la distracción que muchas veces necesitaba y sobre todo por ayudarme a creer en mí misma y motivarme a esforzarme cada día.

A mi tío Jesús Herrera, que siempre me ha impulsado a ser mejor

A mis ángeles que me cuidan desde el cielo.

A Dios por su bondad y amor. Gracias infinitas por darme la oportunidad de cumplir un sueño más, te pido nunca me abandones y siempre me des la dicha de poder ayudar a otros.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por darme la oportunidad de culminar mis estudios.

A mis 3 compañeras, que se volvieron mis hermanas durante estos dos años y medio y para toda la vida, fueron tantos momentos que compartimos, gracias por darme su apoyo cuando más lo necesite, por la confianza y por la paciencia que tuvieron con todos mis TOCS, las quiero mucho para siempre.

A toda la familia de pediatría: compañeros, pasantes, personal administrativo y a todos aquellos que a diario al igual que yo trabajaban para hacer funcionar este posgrado.

A todos mis maestros que fueron parte de mi formación a lo largo de toda la maestría, me llevo cada una de sus enseñanzas y siempre los recordare con mucho cariño.

A mis asesores de tesis, Dra. Yolanda, Dra. Diana, Dr. Jerezano y Dr. Casillas por su paciencia y colaboración en este proyecto.

A todas aquellas personas, que sin estar dentro del proyecto me brindaron confianza y armas para culminarlo, Dra. Irene y Dr. Carrasco docentes de la Facultad de estomatología, Dr. Jesús líder de grupo Ecología y Supervivencia de microorganismos, Dr. Erick personal del CUVYT BUAP, Dra. Maricela directora del Herbario y Jardín Botánico BUAP.

## ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN .....	1
2.	ANTECEDENTES GENERALES .....	2
2.1	Biofilm .....	2
2.2	<i>Rumex</i> .....	6
2.3	Quitosano.....	6
3.	ANTECEDENTES ESPECÍFICOS .....	8
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	14
5.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	14
6.	JUSTIFICACIÓN .....	15
7.	HIPÓTESIS.....	16
8.	OBJETIVOS .....	17
8.1	Objetivo General.....	17
8.2	Objetivos Específicos.....	17
9.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
9.1	Diseño del estudio .....	18
9.2	Población de estudio y muestra .....	18
9.3	Criterios de selección.....	18
9.3.1	Inclusión: .....	18
9.3.2	Exclusión:.....	18
9.3.3	Eliminación:.....	18
9.4	Concordancia y fiabilidad.....	19
9.5	Ubicación espacio-temporal.....	19
9.6	Variables.....	20
9.7	Procedimientos y técnicas .....	21
9.7.1.	Obtención del extracto etanólico de <i>Rumex obtusifolius</i> y clasificación etnobotánica.....	21
9.7.2	Síntesis de Hidrogel de quitosano/ extracto etanólico <i>Rumex obtusifolius</i> al 1% .....	22
9.7.4	Síntesis de Hidrogel de quitosano.....	22
9.7.5	Caracterización de Hidrogel de quitosano/extracto etanólico <i>Rumex obtusifolius</i> .....	23
9.7.6	Caracterización del Hidrogel de quitosano.....	24

9.7.7	Recolección de las muestras .....	24
9.7.8	Evaluación de la actividad antiadhesiva (Fig. 7) .....	24
9.8	Logística.....	27
9.9.1	Recursos Humanos.....	27
9.9.2	Recursos Materiales.....	27
9.9.3	Recursos Financieros.....	28
9.9	Bioética .....	28
9.10	Análisis estadístico .....	28
10.	RESULTADOS .....	29
10.1	Caracterización de Hidrogel de quitosano/ extracto etanólico <i>Rumex obtusifolius</i> e Hidrogel de quitosano .....	29
10.2	Evaluación de la actividad antiadhesiva .....	32
11.	DISCUSIÓN.....	37
12.	CONCLUSIONES.....	41
13.	BIBLIOGRAFÍA.....	42
14.	ANEXOS .....	46
14.1	Anexo 1 Clasificación etnobotánica .....	46
14.2	Anexo 2 Consentimiento informado .....	47
14.3	Anexo 3 Asentimiento informado .....	47
14.4	Anexo 4 Compra de Cloramina T.....	48
14.5	Anexo 5 Compra de la cepa <i>S. Mutans</i> CDBB-B-1455 en el CINVESTAV .....	49
14.6	Anexo 6 Formato de recolección de datos.....	50
15.	Productos de la investigación.....	51
15.1	Participación en el XI Encuentro Internacional de Cuerpos Académicos y Grupos de Investigación Odontológica. CONSEJO NACIONAL DE CUERPOS ACADÉMICOS EN ODONTOLOGÍA .....	51
15.2	Participación en el XXVII Encuentro Nacional y XVIII Iberoamericano de Investigación en Odontología .....	52

## ABREVIATURAS

<b>SM</b>	<b><i>Streptococcus mutans</i></b>
<b>CD</b>	<b>Caries dental</b>
<b>GTFs</b>	<b>Glucosiltransferasas</b>
<b>GBP</b>	<b>Proteínas de unión</b>
<b>%p/v</b>	<b>Porcentaje peso por volumen</b>
<b>BHI-S</b>	<b>Brain Heart Infusion suplementado con sacarosa</b>
<b>BHI</b>	<b>Brain Heart Infusion</b>
<b>h</b>	<b>Horas</b>
<b>mm</b>	<b>Milímetros</b>
<b>UFC/mL</b>	<b>Unidades formadoras de colonias por mililitro</b>
<b>mL</b>	<b>Mililitros</b>
<b>µL</b>	<b>Microlitros</b>
<b>mg</b>	<b>Miligramos</b>
<b>MEB</b>	<b>Microscopía electrónica de barrido</b>
<b>g</b>	<b>Gramos</b>
<b>rpm</b>	<b>Revoluciones por minuto</b>
<b>MS</b>	<b>Agar Mitis Salivarius</b>
<b>SYP</b>	<b>Agar Sacarosa y Fosfatos</b>
<b>GSPM</b>	<b>Goteo por Sellado en Placa Masivo</b>

## RESUMEN

El presente trabajo describe la actividad antiadhesiva contra *Streptococcus mutans* de una formulación novedosa de hidrogel de quitosano con *Rumex obtusifolius* al 1% en la superficie de órganos dentales primarios. La potencial actividad antiadhesiva de algunos extractos orgánicos de plantas medicinales y/o fitomoléculas son de gran interés como alternativa en el tratamiento de la caries dental, con pocos efectos secundarios. En este sentido, el gel de gluconato de clorhexidina (perioxidin) es usado como un agente antiadhesivo en control de la caries actualmente, que limita el crecimiento de microorganismos cariogénicos como *S. mutans* en la cavidad bucal, aunque causa alteración en la sensación del sabor, erosión de la mucosa bucal, pigmentación y efectos perjudiciales en los tejidos y puede causar resistencia bacteriana.

El Hidrogel de quitosano/extracto etanólico *Rumex obtusifolius* posee actividad antiadhesiva contra *S. Mutans* CDBB-B-1455 a los 20 y 60 minutos en medio de cultivo Mitis Salivarius y Sacarosa y Fosfato. Se llevó a cabo la caracterización del gel por microscopía electrónica de barrido y FTIR. Aunque se sugiere continuar con estudios de biocompatibilidad, el Hidrogel de quitosano/extracto etanólico *Rumex obtusifolius* puede ser una alternativa antiadhesiva utilizada como agente preventivo para disminuir la incidencia y prevalencia de caries dental.

Palabras Clave: *Rumex obtusifolius*, Quitosano, Antiadhesiva, Hidrogeles, Clorhexidina

## ABSTRACT

The present work describes the anti-adhesive activity against *Streptococcus mutans* of a novel formulation of chitosan hydrogel with 1% *Rumex obtusifolius* on the surface of primary dental organs. The potential non-stick activity of some organic extracts of medicinal plants and / or phytomolecules are of great interest as an alternative in the treatment of dental caries, with few side effects. In this sense, chlorhexidine gluconate gel (perioxidín) is currently used as an anti-adhesive agent in caries control, which limits the growth of cariogenic microorganisms such as *S. mutans* in the oral cavity, although it causes an alteration in the taste sensation, erosion of the oral mucosa, pigmentation and harmful effects on tissues and can cause bacterial resistance.

Chitosan based Hydrogel / *Rumex obtusifolius* ethanolic extract has antiadhesive activity against *S. Mutans* CDBB-B-1455 at 20 and 60 minutes in Mitis Salivarius and Sacarosa and Phosphate culture medium. The hydrogel characterization was carried out by scanning electron microscopy and FTIR. Although it is suggested to continue with biocompatibility studies, Chitosan based Hydrogel / *Rumex obtusifolius* ethanolic extract may be an antiadhesive alternative used as a preventive agent to reduce the incidence and prevalence of dental caries.

Keywords: *Rumex obtusifolius*, Chitosan, Antiadhesive, Hydrogeles, Clorhexidine

## 1. INTRODUCCIÓN

El *Streptococcus mutans* (SM) es considerado como el principal agente microbiano que favorece la agregación bacteriana en un conjunto de poliespecies (biofilm) conocido como placa dental (1), el cual se adhiere a la superficie del diente (2). El biofilm produce diferentes enfermedades bucales como la caries dental (CD); enfermedad multifactorial que afecta ampliamente al ser humano durante toda su vida (3) (4). SM se adhiere a las superficies de los dientes mediante la síntesis de polisacáridos extracelulares a partir de sacarosa, posteriormente, metaboliza azúcares provenientes de la dieta en ácidos orgánicos, lo que provoca desmineralización del esmalte dental (5) (6).

Las intervenciones de control de CD, apuntan principalmente a disminuir los estreptococos cariogénicos de la cavidad bucal, inhibir la producción de glucanos y evitar la formación de biopelículas, para bloquear o modificar los sitios implicados en la adherencia de *S. mutans*, lo que reduce la eficacia de las interacciones con la superficie dental (1). Sobre esta base, en el proceso de desarrollo de nuevos compuestos farmacológicamente activos, los recursos naturales de origen vegetal, representan una importante fuente de moléculas potencialmente activas (7).

Diversos estudios han reportado potente actividad antiadhesiva y antibacterial de extractos naturales contra bacterias cariogénicas. *Rumex obtusifolius* es común en la región de Teziutlán, perteneciente a la familia *Polygonaceae*, donde crece en casi cualquier tipo de suelo, pero prefiere suelos ricos en hierro, estanques, humedales, y áreas de bosque sombrío (8). Actualmente, no se encuentran en la literatura estudios que determinen la actividad antiadhesiva contra SM del extracto etanólico de las partes aéreas de *Rumex obtusifolius*. Por lo que el siguiente estudio tiene como propósito evaluar la actividad antibiofilm del extracto *Rumex obtusifolius* contra la bacteria cariogénica primaria, SM.

Evaluar la actividad antiadhesiva del extracto permitirá considerar el uso del hidrogel de quitosano/*Rumex obtusifolius* como una potencial alternativa en el tratamiento de la formación de biofilm, disminuyendo la incidencia de CD y el tratamiento costoso para eliminarla.

Palabras Clave: *Rumex obtusifolius*, Quitosano, Actividad Antiadhesiva, Hidrogeles.

## 2. ANTECEDENTES GENERALES

### 2.1 Biofilm

Un biofilm se define como una comunidad diversa de microorganismos que están unidos a una superficie o un grupo de microorganismos que forman agregados microbianos, encerrados dentro de una matriz extracelular de polisacáridos, proteínas y glicoproteínas, denominada sustancia polimérica extracelular (9). Las distintas fases de desarrollo del biofilm, incluyen (10) (Fig. 1):

- a) Adsorción de moléculas del huésped y bacterianas en la superficie del diente: esta película de acondicionamiento o película adquirida se forma inmediatamente después de la erupción o limpieza e influye directamente en el patrón de colonización microbiana inicial;
- b) Transporte pasivo de bacterias bucales a la superficie del diente: las interacciones fisicoquímicas débiles y de largo alcance entre la superficie de la célula microbiana y el diente recubierto de película crean un área débil de atracción que facilita la adhesión reversible. Posteriormente, las interacciones fuertes y de corto alcance entre moléculas específicas en la superficie de las células bacterianas (adhesinas) y los receptores complementarios en la película pueden provocar una unión irreversible;
- c) Coagregación: implica interacciones interbacterianas específicas de adhesina-receptor que facilitan la organización funcional de la placa dental lo que conduce a un aumento en la diversidad de la biopelícula y a la formación de estructuras morfológicas inusuales;
- d) Multiplicación de los microorganismos adheridos: la división celular conduce a un crecimiento confluyente y, finalmente, a un biofilm tridimensional espacialmente y funcionalmente organizado, de cultivo mixto. La producción de polímeros da como resultado la formación de una matriz extracelular compleja compuesta por glucanos, fructanos y heteropolímeros solubles e insolubles; la matriz puede ser biológicamente activa y retener nutrientes, agua y enzimas clave dentro de la biopelícula;
- e) Desprendimiento activo: las bacterias pueden responder a señales ambientales y desprenderse de las superficies, lo que permite colonización en otros lugares.

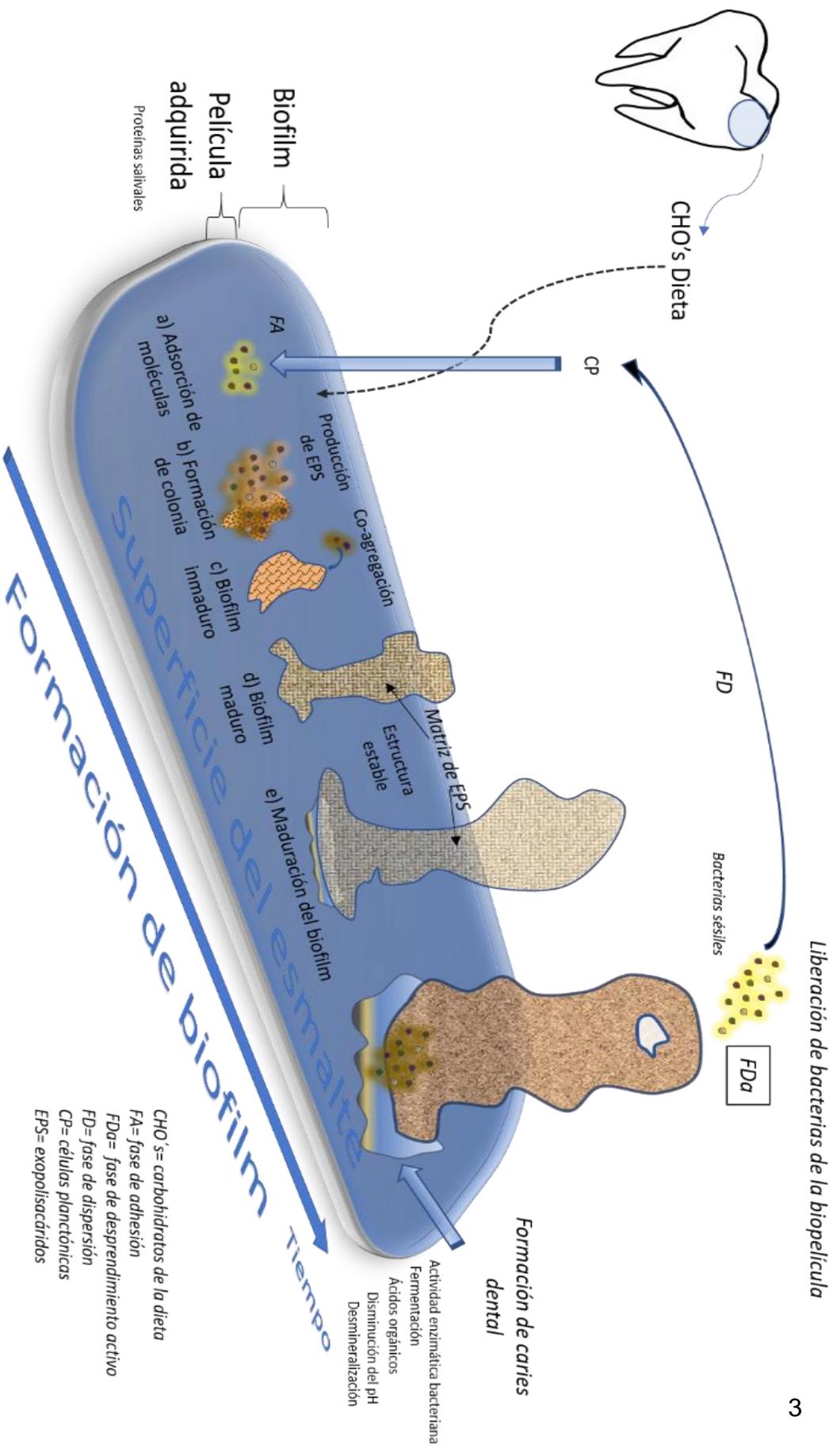


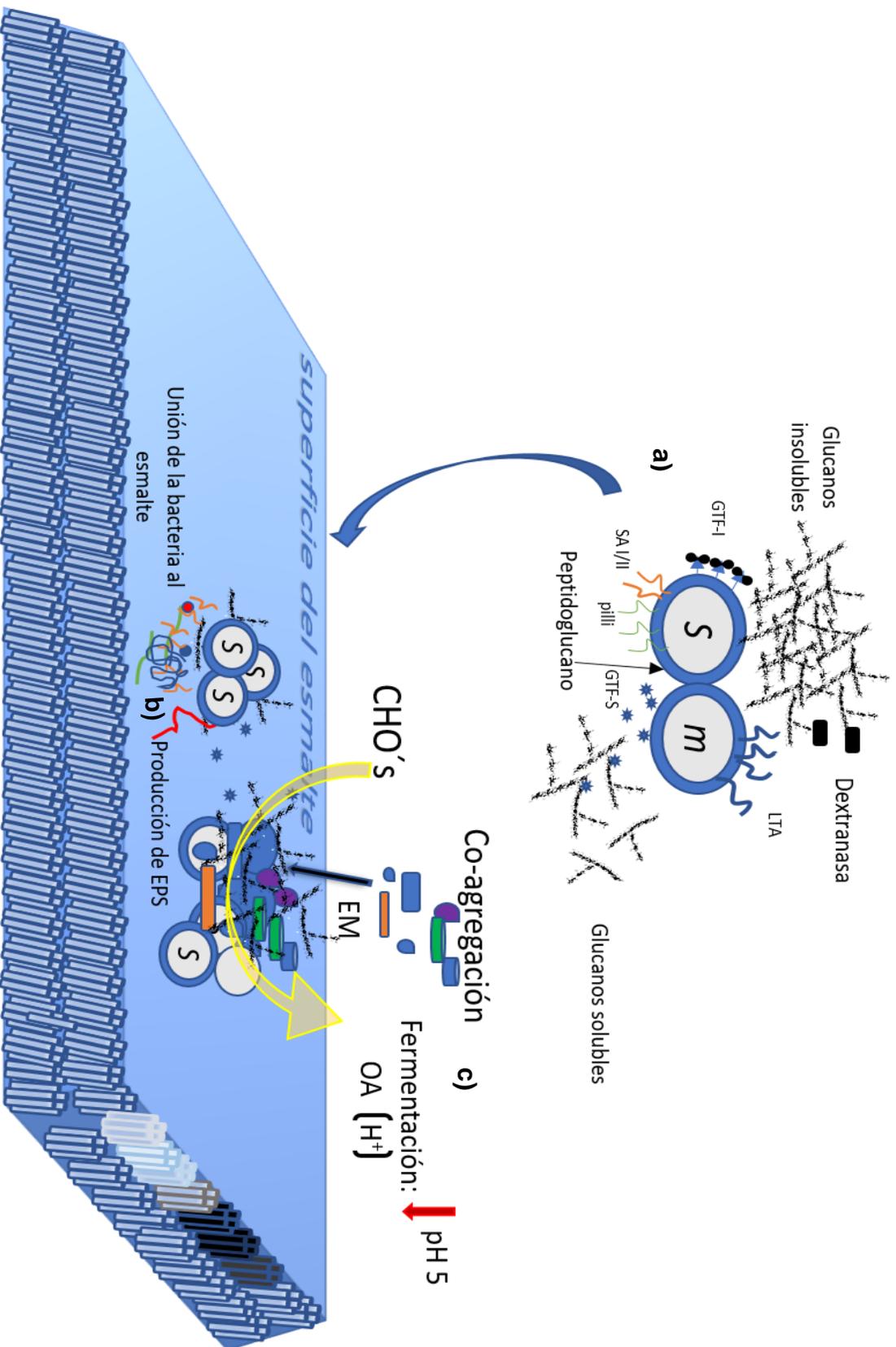
Fig. 1 Fuente propia. Fases del desarrollo del biofilm.

Un biofilm dental maduro, es de naturaleza polimicrobiana que consta de hasta 100 especies diferentes, predominantemente bacterias, además puede contener levaduras, protozoos, arqueas y virus. De acuerdo con estudios actuales, las bacterias del biofilm son la principal causa de enfermedades dentales (11). Se cree que los principales agentes etiológicos bacterianos y formadores de biofilm son los dos estreptococos  $\alpha$  hemolíticos, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, potentes cariogénicos; también pueden estar implicados otros tipos de bacterias (especialmente lactobacilos y actinomyces) (12).

SM es un coco Gram positivo, anaerobio facultativo, acidófilo, acidogénico (13) que desempeña un papel central en la patogénesis de la enfermedad, ya que produce glucosiltransferasas (GTFs) y sintetiza glucanos a partir de sacarosa, los cuales median la adhesión bacteriana y la acumulación en la superficie del esmalte. Después de la formación del biofilm, los ácidos producidos por bacterias desmineralizan la superficie del esmalte (7).

SM produce tres tipos de GTFs (GTFB, GTFC y GTFD) que polimerizan el resto glucosilo de la sacarosa y carbohidratos en glucanos  $\alpha$ 1-3 y  $\alpha$ 1-6. La unión de los glucanos mediante las proteínas de unión (GBPA, -B, -C y -D) y las GTFs, facilita la adherencia bacteriana, la adhesión inter-bacteriana y la acumulación de biofilm en las superficies dentales. GTFB, C y D y GBPA, B, C y D, junto con los glucanos extracelulares adhesivos, constituyen la vía dependiente de sacarosa para que *S. mutans* se establezca en la superficie del esmalte y sea de importancia central en la formación de biofilm y desarrollo de CD. Los sustratos de carbohidratos pueden estar disponibles directamente (como el azúcar ingerido en alimentos y bebidas) o derivarse del almidón de la dieta mediante la acción de amilasas bacterianas y salivales (Fig. 2) (12).

Diversos métodos se han utilizado para eliminar, inhibir o matar a *S. mutans*, con el objetivo de prevenir la formación del biofilm (14) (15); por ejemplo, el uso de alcohol o antibióticos, como el gluconato de clorhexidina, eritromicina, ampicilina y penicilina, los cuales han demostrado su eficacia en el mercado. Sin embargo, se ha informado que el uso excesivo de estas formulaciones modifica la microbiota bucal, con efectos secundarios como vómito, manchas en los dientes o cáncer bucal. Además, es importante destacar que los agentes antibacterianos pueden promover el desarrollo de resistencia bacteriana (16).



**Fig. 2** Fuente propia. Desarrollo de CD: a) unión inicial mediada por adhesinas de *S. mutans*; b) agregación mediada por la síntesis de polisacáridos extracelulares; c) el metabolismo de los hidratos de carbono resulta en la producción de ácido, lo que lleva a la desmineralización y cavitación del diente. Se ha demostrado que algunos extractos de plantas y los compuestos fitoquímicos pueden inhibir cualquiera o todas estas etapas. Es decir, actividad contra bacterias cariogénicas, inhibición de la adherencia/agregación/ formación de biofilm e inhibición de la producción de ácidos.

## 2.2 Rumex

En la búsqueda de nuevos compuestos farmacológicamente activos, los recursos naturales de origen vegetal, representan una importante fuente de moléculas potencialmente bioactivas (7). México usa alrededor de 7000 especies como plantas medicinales (8), ya que contienen gran cantidad de principios activos útiles en el tratamiento de múltiples enfermedades (17).

La especie *Rumex*, perteneciente a la familia *Polygonaceae*, comprende unas 200 especies ampliamente distribuidas en todo el mundo. El nombre *Rumex* se originó a partir de la palabra latina “dardo”, debido a la forma de las hojas (18). *Rumex obtusifolius* o “Lengua de vaca”, es común en la región de Teziutlán, Puebla, donde crece en casi cualquier tipo de suelo, pero prefiere suelos ricos en hierro, estanques, humedales, y áreas de bosque sombrío en general. La planta mide 50 cm de altura tiene hojas perennes, raíces leñosas y profundas. Las hojas son oblongas de 5 a 10 cm de largo, con forma de dardo en su base, anchas y largas, sin hojas superiores a menudo con un tinte escarlata (8).

Se sabe que las plantas que pertenecen a la familia *Polygonaceae*, producen una gran cantidad de metabolitos secundarios biológicamente activos, como antraquinonas, naftalenos, estilbenoides, esteroides, glucósidos de flavonoides, leucoantocianidinas y ácidos fenólicos. Las hojas y las raíces de la planta se utilizan en la medicina tradicional para el tratamiento de varios trastornos de la salud como infecciones, inflamación, diarrea, estreñimiento, diabetes, edema, ictericia, antihipertensivo, diurético, analgésico, trastornos del hígado y la vesícula.

En el área de la salud bucal, existen pocos reportes que muestran la actividad antiadhesiva de *Rumex obtusifolius*, contra SM.

## 2.3 Quitosano

En los últimos años, los polímeros naturales han recibido mucha atención debido a que pueden ser una alternativa a los polímeros sintéticos (19).

El quitosano es un derivado desacetilado de quitina, el segundo polímero natural más abundante encontrado en conchas de crustáceos y paredes de hongos. Es una sustancia no tóxica, estable, esterilizable y biocompatible; presenta un perfil único y atractivo con propiedades antimicrobianas, inmunoestimulantes y hemostáticas (20). Su carga positiva se acumula en las paredes celulares de las bacterias, que genera una propiedad bactericida y bacteriostática junto con la capacidad de formar una película y adherirse al diente, haciendo del quitosano una base ideal para la liberación sostenida de medicamentos (21).

Recientemente, varios autores han informado sobre la actividad antimicrobiana y antibiofilm del quitosano sobre varios microorganismos relacionados con enfermedades bucales (19). Bae y cols, informaron que presenta efecto antibacteriano *in vitro* sobre *S. mutans*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis*. Además, mencionan que el quitosano de bajo peso molecular evita la adsorción de *S. mutans* a la hidroxiapatita (22). Su actividad antibacteriana contra *S. mutans* y otros microorganismos presentes en la cavidad bucal lo convierte en un agente antiadhesivo potencialmente prometedor (23).

### 3. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

En el área de salud bucal, los efectos antiadhesivos de las moléculas potencialmente activas de diferentes plantas han sido estudiados.

En 1985, Segal y cols, mencionaron las propiedades terapéuticas del regaliz (*Glycyrrhiza glabra*) debido al contenido de flavonoides y en mayor cantidad de glicirricina. Evaluaron la capacidad de inhibición en el crecimiento de *Streptococcus mutans* y la formación de placa bacteriana mediante el método de adherencia al tubo. Los resultados demostraron que el compuesto activo presente en el regaliz, inhibe el crecimiento de SM y la formación de placa. Sugieren que la glicirricina podría servir como un vehículo eficiente para medicamentos bucales tópicos (24).

En 2012, Al-Sohaibani y cols, mencionaron que la planta *Salvadora pérsica* tiene uso extendido como medida de higiene bucal debido a la presencia de agentes activos fitoquímicos. Evaluaron su capacidad de inhibición de crecimiento y efectos antibiofilm contra *Streptococcus mutans in vitro* mediante extractos metanólicos, etanólicos, acetónicos y acuosos. La capacidad de formación de biofilm se evaluó mediante dos métodos cualitativos diferentes: prueba de adherencia al tubo (Christensen y cols, 1982) y método de Agar Rojo Congo; además utilizaron el método cuantitativo en placas de microtitulación. La actividad antibiofilm se determinó mediante el análisis de placa de microtitulación (Pitts y cols, 2003). Se utilizó ANOVA de un factor para comparar los efectos de los diferentes extractos. Los resultados mostraron que los agentes bioactivos, de extractos etanólicos y metanólicos de *Salvadora pérsica* inhiben en mayor porcentaje el crecimiento, además controlan la colonización y acumulación de *S. mutans* (25).

En 2005, Decker y cols, evaluaron el impacto de nuevas formulaciones de clorhexidina con dos compuestos de quitosano bioadhesivos en dos formas de vida diferentes (planctónicas y sésiles) de *S. Sanguinis*, con la utilización de una cámara de flujo preclínica que permitió el tratamiento por separado. Se realizaron dos tipos de experimentos: a) tratamiento de estreptococos en estado planctónico y b) tratamiento de estreptococos unidos al esmalte. El primer experimento consistió en tratar durante 2 minutos los estreptococos planctónicos con una de las siguientes formulaciones: solución salina, clorhexidina, quitosano 1 (Tinocare CP, Ciba Specialty Chemicals, Basle, Switzerland), quitosano 2 (CL 113, Biopolymer AS, Drammen, Norway), combinación 1 (quitosano 1 y clorhexidina), combinación 2 (quitosano 2 y clorhexidina). Después de lavar con solución salina, las bacterias se suspendieron en saliva humana estéril y se expusieron a láminas de esmalte insertados a la cámara de flujo, finalmente, después de 60 minutos, se monitorizó la viabilidad bacteriana en la suspensión salival y en las láminas de esmalte.

El experimento de estreptococos adheridos al esmalte consistió en exponer estreptococos sésiles suspendidos en saliva humana estéril a láminas de esmalte en la cámara de flujo, después de 60 minutos, las bacterias unidas al esmalte se trataron con los mismos seis agentes durante 2 minutos y posteriormente se determinó la viabilidad bacteriana. De acuerdo a los resultados, los autores concluyeron que nuevas formulaciones de clorhexidina y quitosano son beneficiosas al unificar las propiedades bioadhesivas del quitosano con la actividad antibacteriana de la clorhexidina de forma sinérgica, lo que resulta en un efecto antiplaca superior al de la clorhexidina sola (26).

En 2008, Pasquantonio y cols, evaluaron la actividad antiadhesiva y antibiofilm de un derivado de quitosano soluble en agua contra cepas de *S. mutans*. Como control negativo y positivo utilizaron agua destilada y una solución de digluconato de clorhexidina al 0.1% respectivamente. Las cepas bacterianas se aislaron de la placa dental de 84 sujetos adultos inscritos en el estudio, con un hisopo estéril y se cultivaron en caldos de infusión Brain Heart suplementado con 3% (%p/v) de sacarosa (BHI-S). Para el estudio clínico de la vitalidad de la biopelícula los 84 participantes se sometieron a un tratamiento profiláctico preliminar con pasta y cepillo de dientes durante una semana antes de las 6 semanas de pruebas. Se asignaron las siguientes sustancias: quitosano (concentración final 1%), digluconato de clorhexidina (concentración final 0.12%) y agua destilada. Para establecer el índice de vitalidad (VI), se tomaron muestras de placa supragingival de las superficies de los dientes 16 y 46 (IV1) los días 8, 22 y 36, y de los dientes 26 y 36 (IV2) los días 11, 25 y 39. Las muestras se depositaron en un portaobjetos y se tiñeron directamente con diacetato de fluoresceína, que colorea los microorganismos vivos en verde, y bromuro de etidio, que tiñe de rojo las bacterias muertas. La examinación de las muestras y la vitalidad de la biopelícula fueron determinadas mediante un microscopio fluorescente con una cuadrícula para contar el número de bacterias vivas y se calculó el porcentaje de bacterias viables, es decir, el índice de vitalidad. La formación y cuantificación *in vitro* de la biopelícula de *S. mutans* se llevó a cabo en microplacas de 96 pocillos acondicionados con una solución de saliva artificial. Se añadieron células de *S. mutans* a la densidad apropiada a cada pocillo que contenía BHI-S. Las placas se incubaron a 37°C sin agitar. La formación de placa se dividió en 4 fases: adherencia, acumulación activa, acumulación temprana, acumulación tardía (4, 12, 20 y 24 horas respectivamente). La cantidad de formación de biofilm se calculó con el método de violeta cristal. El análisis estadístico se realizó en el programa Statgraphic Centurion XV (StatPoint Inc.) y las diferencias entre los grupos se analizaron con una prueba t pareada.

Los resultados mostraron que *S. mutans* en la fase de adhesión (4 h) fue completamente inhibida por quitosano a cualquier concentración o tiempo de exposición investigado, mientras que *S. mutans* en etapas sucesivas de acumulación (12-24 h) se inhibió solo con concentraciones más altas y tiempos de exposición más largos. Estos datos confirman la acción efectiva del quitosano contra las biopelículas de *S. mutans* (23).

En 2013, Costa y cols, evaluaron el efecto del quitosano sobre la capacidad de *Streptococcus mutans* para adherirse y formar biopelículas. Además, evaluaron el efecto sobre biopelículas maduras y polimicrobianas. Para el estudio de la adhesión utilizaron microplacas de 24 pocillos y para la formación de biopelículas adaptaron el método descrito por Christensen. Los resultados obtenidos mostraron que el quitosano es capaz de interferir en la adhesión de *S. mutans* y la formación de biopelículas primarias. Esta acción se observó hasta una semana con poca o ninguna disminución en la eficiencia. Asimismo, el quitosano fue capaz de inhibir las biopelículas formadas por dos microorganismos y pudo actuar sobre las biopelículas maduras, reduciendo significativamente (94%) la supervivencia de las biopelículas (27).

Costa y cols, en 2014, evaluaron el efecto en la adherencia y las biopelículas de enjuagues bucales con quitosano sobre varios patógenos bucales. Su estudio consistió en comparar formulaciones de quitosano con diferentes enjuagues comerciales que contenían como principio activo aceites esenciales o clorhexidina. Utilizaron cinco microorganismos bucales (4 bacterias y 1 levadura) como microorganismos modelo y midieron la concentración mínima inhibitoria, la adherencia, la formación de biopelículas y el efecto de los enjuagues sobre biopelículas maduras. Los resultados mostraron que el enjuague bucal a base de quitosano fue capaz de inhibir la adhesión microbiana y la formación de biopelículas al mismo tiempo que fue capaz de promover la disolución de biopelículas ya formadas. Los autores concluyen que el quitosano posee actividad biológica igual o mejor que los productos comerciales disponibles en la actualidad (19).

En 2018, Goncalves y cols, evaluaron el efecto de los extractos hidroalcohólicos de *Myracrodruon urundeuva* y *Qualea grandiflora* en la viabilidad del biofilm de *Streptococcus mutans* y en la prevención de la desmineralización del esmalte. El extracto se obtuvo con etanol al 70% por percolación a temperatura ambiente. Los filtrados se concentraron en seco y a presión reducida a 40°C. Finalmente fueron liofilizados, pesados y almacenados en una botella ámbar a temperatura ambiente. Se usaron cepas de *S. mutans* (ATCC 25175) reactivadas en caldo de BHI. Se prepararon ciento treinta y cinco muestras de esmalte (4 mm x 4 mm) a partir de dientes de bovino con una máquina de corte de semiprecisión.

Las muestras de esmalte se distribuyeron aleatoriamente en los grupos de tratamiento. Para la formación de biofilm de *S. mutans* en el esmalte bovino, la cepa se reactivó en caldo BHI y se diluyó (concentración de  $5 \times 10^5$  UFC/mL) en saliva artificial. Veinticuatro placas con muestras de esmalte se llenaron con inóculo ( $5 \times 10^5$  UFC / mL de saliva artificial, 1.5 mL / pocillo), que se incubó al 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C. Después de 8 h, se eliminó el inóculo, las muestras se lavaron con solución salina y saliva artificial fresca que contenía ahora 0.2% de sacarosa en los pocillos. Las microplacas se incubaron al 5% de CO<sub>2</sub> y a 37°C durante otras 16 h. Durante los siguientes 2 días, la biopelícula fue tratada diariamente con los niveles submicrométricos de extractos de *Myracrodruon urundeuva* y *Qualea grandiflora* aislados o combinados. Después del tratamiento, las muestras se lavaron con solución fisiológica y se añadió saliva artificial fresca con 0.2% de sacarosa. Periogard se aplicó como control positivo (clorhexidina al 0.12%, Colgate, Brasil); solución fisiológica pura como control negativo. Las microplacas se incubaron en las mismas condiciones descritas anteriormente. La biopelícula se tiñó con los marcadores de ácido nucleico diluidos en PBS (1 mL de PBS + 1 µL de SYTO9 + 1 µL de yoduro de propidio, 10 µL/ pocillo) (ensayo de viabilidad de las células Kit Live & Dead®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.) por 15 minutos en un ambiente oscuro. Las bacterias vivas se tiñeron con SYTO9 lo que genera una fluorescencia verde y las bacterias muertas se tiñeron con yoduro de propidio /SYTO9 lo que genera una fluorescencia roja. La biopelícula se examinó con microscopía de láser confocal-CLSM (Leica TCS SPE, Mannheim, Alemania) y el software Leica Application Suite-Advanced Fluorescence (LAS AF, Mannheim, Alemania). Se tomaron tres imágenes (275 µm<sup>2</sup>) de cada superficie de muestra y se analizaron mediante el software BioImage L 2.0, para cuantificar las bacterias vivas y muertas (%). Los datos se analizaron estadísticamente en el software Graph Pad InStat para Windows (GraphPad Software, San Diego, EE. UU.). El porcentaje de microorganismos vivos y muertos se compararon con el uso de la prueba estadística Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Dunn.

Los resultados mostraron que los extractos de *Myracrodruon urundeuva* en las concentraciones  $\geq 0.625$  mg/mL fueron capaces de reducir la viabilidad de las bacterias, mientras que *Qualea Grandiflora* solo tenía efecto antimicrobiano a 5 mg/mL (6).

En 2017, Orban y cols, evaluaron la actividad antibacteriana de las diferentes especies de *Rumex* nativas de la cuenca de los Cárpatos y aislaron los compuestos activos de las especies más eficientes. Evaluaron los efectos antibacterianos de n-hexano, cloroformo y fracciones acuosas con extractos de metanol preparados a partir de diferentes partes de 14 especies de *Rumex* (*R. acetosella*, *R. acetosa*, *R. alpinus*, *R. aquaticus*, *R. conglomeratus*, *R. crispus*, *R. hydrolapathum*, *R. obtusifolius subsp. obtusifolius*, *R. obtusifolius subsp. subalpinus*, *R. patientia*,

*R. pulcher*, *R. scutatus*, *R. stenophyllus* y *R. thyrsoiflorus*) contra *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* mediante el método de difusión en disco.

Los resultados de su estudio mostraron una alta actividad antibacteriana (zonas de inhibición >15 mm) contra una o más cepas bacterianas. Respecto a los compuestos activos encontraron naftalenos (musizina y su glucósido, toracrisona-glucósido, 2-metoxiestipandrona), antraquinonas (emodina, crisofanol, parietina, citreoseína, crisofanol-8-O-glucósido), flavonoides (quercetina, quercetina-3,3'-dimetiléter, isokaempferido, quercetina 3-O-arabinósido, quercetina 3-O-galactósido, catequina), estilbenos (resveratrol, piceid). Concluyeron que especialmente los naftalenos ejercían notables efectos antibacterianos contra varias cepas bacterianas (28).

Wegiera y cols, en 2011, investigaron la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos de frutos de seis especies de *Rumex*: *R. acetosa* L., *R. acetosella* L., *R. confertus* Willd., *R. crispus* L., *R. hydrolapathum* Huds. y *R. obtusifolius* L. mediante agar y método de dilución en caldo. Los resultados de su estudio mostraron que los extractos de *R. confertus*, *R. crispus*, *R. hydrolapathum* y *R. obtusifolius* ejercen un efecto inhibitor diferencial sobre el crecimiento de bacterias Gram-positivas (estafilococos) y bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas aeruginosa*). Además, los mismos extractos inhibieron también el crecimiento de hongos (*Candida* spp., *Trichophyton mentagrophytes*). Concluyeron que esto se debe al alto contenido en polifenoles, derivados de antraceno y taninos (29).

Yadav y cols, en 2010, evaluaron la actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos de benceno y acetato de etilo de *Rumex nepalensis spreng* contra dos bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*), dos bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) y un hongo, *Candida albicans* mediante el método de difusión. Su estudio demostró un efecto inhibitor significativo contra la mayoría de los microorganismos sometidos a prueba. Concluyen que las raíces y las partes aéreas de los miembros de la familia *Polygonaceae*, incluidas las de *Rumex*, se han utilizado como hierbas medicinales tradicionales en todo el mundo para una variedad de usos terapéuticos, como psicofármacos, antioxidantes, citotóxicos, antiinflamatorios, antimicrobianos, actividad purgativa, antidiarreica y antiviral debido a que contienen gran cantidad de compuestos químicamente complejos y biológicamente activos (30).

En 2017, Korkorian y cols, identificaron compuestos activos con actividades antibacterianas y anti-quorum de extractos acuosos y de metanol de *Rumex alveolatus*. La actividad antibacteriana se evaluó mediante el método de difusión en disco contra *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. typhi*, *S. sonnei*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. La actividad anti-quorum se investigó contra la producción de pirocianina, la producción de proteasas y la formación de biofilm. Los compuestos activos en *R. alveolatus* se identificaron con el método de cromatografía de gases. Los resultados mostraron que el principal compuesto fenólico obtenido fue ácido 1-bencenodicarboxílico y que el extracto metanólico impidió la formación de biofilm y redujo la producción de pirocianina (31).

#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La CD es una enfermedad multifactorial causada por la presencia de biofilm y agentes bacterianos como el *Streptococcus mutans*; principal microorganismo involucrado en la etiología, cuyo metabolismo depende de los azúcares de la dieta.

Un método de control actual, es el uso de agentes antiadhesivos que limitan el crecimiento de microorganismos cariogénicos tales como SM en la cavidad bucal. En la práctica odontológica, los enjuagues bucales con agentes antibacterianos como la clorhexidina han demostrado su eficacia. Sin embargo, se ha informado que el uso excesivo de estos productos químicos cambia la flora bucal e intestinal lo que genera efectos secundarios.

Por esta razón, es conveniente investigar métodos alternativos, como el uso de plantas medicinales que puedan ayudar en la actividad antiadhesiva contra *Streptococcus mutans* y por consiguiente en la disminución de la incidencia de caries dental.

Actualmente, no se encuentran en la literatura estudios que determinen la actividad antiadhesiva contra SM de las partes aéreas de *Rumex obtusifolius*.

De lo anteriormente mencionado, surge la siguiente pregunta de investigación:

#### **5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿La aplicación tópica del Hidrogel a base de quitosano/extracto *Rumex obtusifolius* inhibe la adhesión de *S. mutans in vitro* en órganos dentarios primarios?

## 6. JUSTIFICACIÓN

La CD es la patología crónica más extendida a nivel mundial, se atribuye principalmente a la presencia de bacterias bucales como *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus spp* que forman una biopelícula que se adhiere a la superficie del diente. Su incidencia ha disminuido continuamente en la mayoría de las ciudades desarrolladas en los últimos 30 años, pero a pesar de esto continúa altamente prevalente en poblaciones con niveles socioeconómicos bajos. A nivel mundial afecta del 60 al 90% de los escolares y casi el 100% de los adultos, en México se dice que 9 de cada 10 personas han padecido caries dental o la padecerán en un futuro.

Hoy en día, el agente antiadhesivo más probado y eficaz que se conoce en la práctica dental es el gluconato de clorhexidina, la cual se ha utilizado por más de tres décadas, pero su uso se limita a corto plazo debido a sus efectos secundarios. Actualmente la importancia del estomatólogo en el tratamiento de la caries dental, debe enfocarse en la búsqueda de nuevas alternativas para el control de enfermedades bucales, sobre esta base, la utilización de plantas medicinales para controlar la formación de placa debido a sus componentes biológicamente activos, ha incrementado el interés por su estudio y uso.

Es por esto que se realiza la síntesis de hidrogel de quitosano con extracto *Rumex obtusifolius* que ofrezca la capacidad de impedir la formación de placa dentobacteriana mediante la inhibición de la principal bacteria cariogénica, para potencializar las acciones preventivas, disminuir la incidencia de caries dental al igual que las enfermedades periodontales y fomentar el uso de alternativas terapéuticas naturales que eviten los efectos adversos de las terapias actuales.

La relevancia del trabajo estriba en la búsqueda de alternativas naturales, no tóxicas, con efecto inhibitorio en la formación de biopelículas y por consiguiente en el número de bacterias cariogénicas adheridas al diente, mejorando el proceso de remineralización-desmineralización, contribuyendo al control de la caries dental.

## 7. HIPÓTESIS

### **Hipótesis de investigación (H<sub>i</sub>):**

La aplicación tópica del Hidrogel a base de quitosano/extracto *Rumex obtusifolius* inhibe la adhesión de *S. mutans in vitro* en órganos dentarios primarios

### **Hipótesis nula (H<sub>0</sub>):**

La aplicación tópica del Hidrogel a base de quitosano/extracto *Rumex obtusifolius* no inhibe la adhesión de *S. mutans in vitro* en órganos dentarios primarios.

## 8. OBJETIVOS

### 8.1 Objetivo General

Determinar la actividad antiadhesiva *in vitro* del Hidrogel de quitosano/extracto etanólico *Rumex obtusifolius* contra *Streptococcus mutans* en órganos dentarios primarios.

### 8.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar un Hidrogel de quitosano/ extracto etanólico *Rumex obtusifolius*.
- Sintetizar un Hidrogel de quitosano.
- Caracterizar un Hidrogel de quitosano/ extracto etanólico *Rumex obtusifolius* por medio de microscopía electrónica de barrido (MEB), Infrarrojo (FTIR) y cinética de liberación.
- Caracterizar un Hidrogel de quitosano por medio de microscopía electrónica de barrido (MEB) e Infrarrojo (FTIR).
- Comparar la actividad antiadhesiva del Hidrogel de quitosano extracto etanólico *Rumex obtusifolius* contra *Streptococcus mutans* con respecto a la actividad antiadhesiva del gel bioadhesivo de digluconato de clorhexidina al 0.2%, Hidrogel de quitosano al 1% y control, a los 20 y 60 minutos respectivamente.
- Comparar la actividad antiadhesiva entre los 20 y 60 minutos.

## 9. MATERIALES Y MÉTODOS

### 9.1 Diseño del estudio

- Tipo de Investigación: básica, *in vitro*
- De acuerdo a la intervención del investigador: cuasi-experimental
- De acuerdo al número de mediciones: longitudinal

### 9.2 Población de estudio y muestra

- Población: Dientes incisivos primarios humanos
- Muestreo: muestreo no probabilístico por conveniencia de dientes incisivos que cumplan con los criterios de inclusión.
- La conformación de los grupos de estudio se realizó de la siguiente forma (Fig. 3):

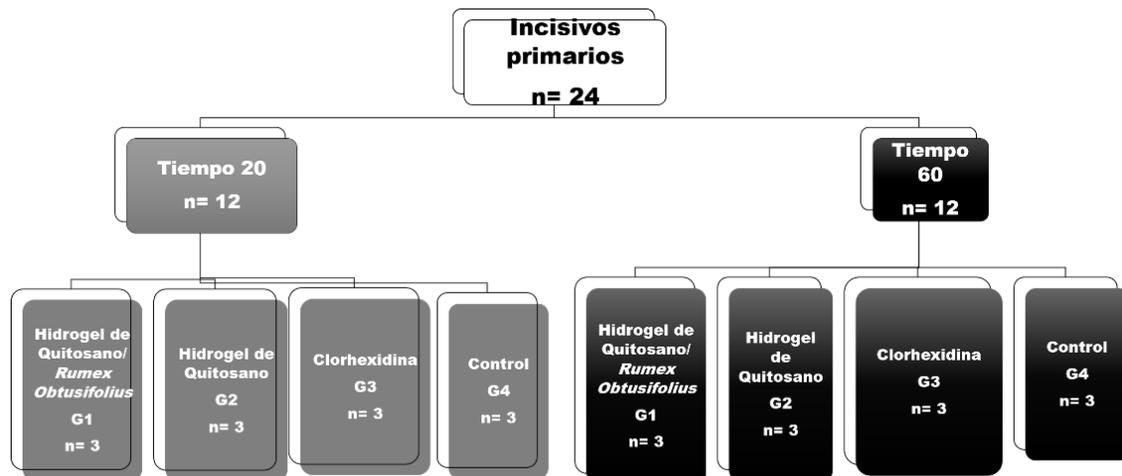


Fig. 3 Cada muestra se trabajó por triplicado obteniendo una n=9 en cada grupo de estudio; obteniendo 36 muestras para el tiempo 20 y 36 muestras para el tiempo 60.

### 9.3 Criterios de selección

#### 9.3.1 Inclusión:

Esmalte sano de órganos incisivos primarios extraídos por razones de exfoliación.

#### 9.3.2 Exclusión:

Esmalte con defectos de anomalía de forma.

#### 9.3.3 Eliminación:

Esmalte que durante el estudio sufra algún tipo de fractura.

#### **9.4 Concordancia y fiabilidad**

El presente trabajo no desarrolló un nuevo procedimiento que deba ser estandarizado, ya que actualmente existe literatura (Corral y cols, 2012) (32) que describe la técnica que se utilizó en la presente investigación.

Para garantizar una adecuada realización de la prueba antiadhesiva cada ensayo se realizó por triplicado biológico y bajo una campana de flujo laminar para evitar contaminación, de acuerdo con la norma NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.

#### **9.5 Ubicación espacio-temporal**

- ✓ Unidad de laboratorio de Fisiología de la FEBUAP
- ✓ Dirección de Innovación y Transferencia de Conocimiento (DITCo) de la BUAP
- ✓ Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas (ICUAP) de la BUAP
- ✓ Herbario y Jardín Botánico de la BUAP

## 9.6 Variables

<b>Variable <u>Dependiente</u></b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Escala</b>	<b>Categorías</b>
<b>Actividad antiadhesiva</b>	Capacidad para inhibir la adhesión de las bacterias en el esmalte	Cuantificar UFC/mL	Cuantitativa	Discreta
<b>Variable <u>Independiente</u></b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Escala</b>	<b>Categorías</b>
<b>Hidrogel a base de quitosano/ extracto <i>Rumex obtusifolius</i></b>	Forma farmacéutica de consistencia semisólida de liberación prolongada de fármacos	Grupo 1  (Hidrogel de quitosano/ extracto <i>Rumex obtusifolius</i> )	Cualitativa	Nominal
<b>Hidrogel a base de quitosano al 1%</b>	Forma farmacéutica de consistencia semirrígida de liberación prolongada de fármacos	Grupo 2  (Hidrogel de quitosano)	Cualitativa	Nominal
<b>Gluconato de clorhexidina al 0.2%</b>	Agente desinfectante bacteriostático y bactericida dependiendo de la concentración	Grupo 3  (Clorhexidina)	Cualitativa	Nominal
<b>Agua destilada</b>	Sustancia estéril que se utiliza como control negativo	Grupo 4  (Control)	Cualitativa	Nominal

## 9.7 Procedimientos y técnicas

### 9.7.1. Obtención del extracto etanólico de *Rumex obtusifolius* y clasificación etnobotánica

Se recolectaron las hojas de la planta *Rumex obtusifolius*, se dejaron secar a temperatura ambiente por 2 semanas. Posteriormente, se trituraron con Moulinex y se maceraron exhaustivamente con etanol por 48 horas con agitación esporádica, después se filtraron y el disolvente se eliminó a presión reducida con rotavapor BÜCHI R-100 para obtener el extracto etanólico. Para identificar la especie de la planta *Rumex*, se recolectó un espécimen completo y se envió al Herbario y Jardín Botánico de la BUAP para reservorio y clasificación etnobotánica (Fig.4) (Anexo 1).

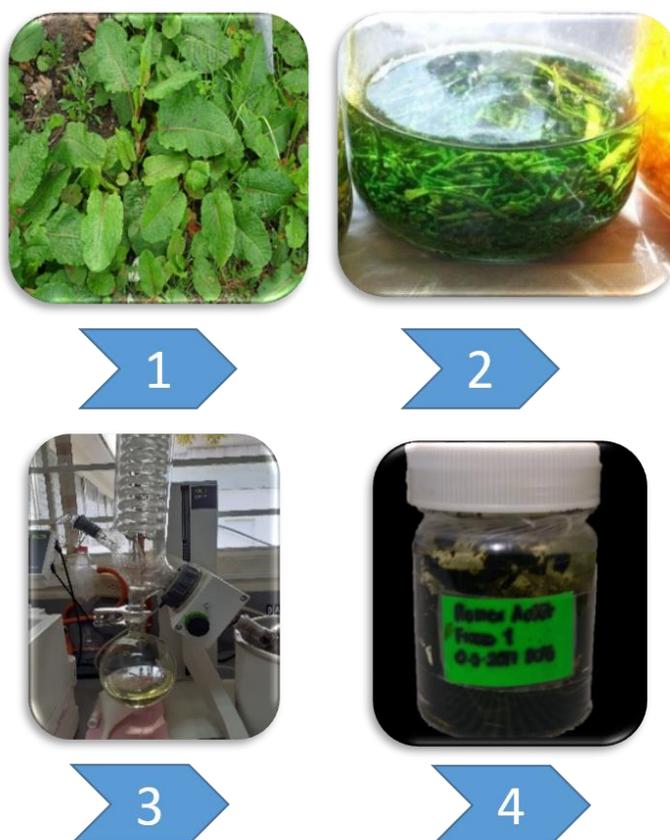


Fig. 4 Extracción de extracto etanólico *Rumex obtusifolius*

### 9.7.2 Síntesis de Hidrogel de quitosano/ extracto etanólico *Rumex obtusifolius* al 1%

El procedimiento que se llevó a cabo para la síntesis del Hidrogel de quitosano/ extracto etanólico *Rumex obtusifolius* al 1% fue (Fig. 5):

1. Previamente se pesaron los materiales en una balanza analítica.
2. Se disolvieron 0.005 g del extracto etanólico de *Rumex obtusifolius* en 4.81 mL de agua destilada, con ayuda de un mortero y pistilo.
3. La solución que se obtuvo, se calentó a 60°C y se mantuvo en agitación a 700 rpm con un agitador magnético.
4. Posteriormente se agregaron en forma de lluvia 0.169 g de quitosano a la solución.
5. Una vez que se finalizó la incorporación del quitosano se agregaron 0.095 mL de ácido acético.
6. Se continuó la agitación hasta la formación del hidrogel.

### 9.7.4 Síntesis de Hidrogel de quitosano

El procedimiento que se llevó a cabo para la síntesis del Hidrogel de quitosano fue el mismo que para la síntesis del hidrogel de quitosano/*Rumex obtusifolius* excepto que no se agregó el extracto etanólico.



**Fig. 5** Fuente propia. Síntesis de Hidrogel de quitosano/ extracto etanólico *Rumex obtusifolius*

### 9.7.5 Caracterización de Hidrogel de quitosano/extracto etanólico *Rumex obtusifolius*

La morfología de la superficie del Hidrogel de quitosano/*Rumex obtusifolius* se estudió utilizando microscopía electrónica de barrido.

La presencia de varias frecuencias vibratorias de moléculas funcionales (grupos) se analizó por espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR).

Adicionalmente se realizó la cinética de disolución colocando 1g del Hidrogel de quitosano/*Rumex obtusifolius* en un vaso de precipitado previamente pesado en una balanza digital. Posteriormente se agregaron 500 mL de saliva artificial y luego se colocó el recipiente en una parrilla de agitación a 37°C a 100 rpm con un agitador magnético. Se tomaron muestras cada minuto y a cada muestra se le tomó una medida de absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 365 nanómetros (Fig. 6).



*Fig. 6 Fuente propia. Cinética de disolución del Hidrogel de quitosano/Rumex obtusifolius*

### 9.7.6 Caracterización del Hidrogel de quitosano

Se observó la morfología del Hidrogel de quitosano utilizando microscopía electrónica de barrido.

Las características del hidrogel se estudiaron por espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR).

### 9.7.7 Recolección de las muestras

Dientes incisivos primarios humanos sanos extraídos por indicación de persistencia o próximos a exfoliar (Anexo 2,3) fueron recolectados y preservados en una solución de cloramina T al 0.5% (Anexo 4) (33) hasta el comienzo del experimento.

### 9.7.8 Evaluación de la actividad antiadhesiva (Fig. 7)

- Compra de la cepa

Se utilizó la cepa de *Streptococcus mutans* CDBB-B-1455 procedente del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del I.P.N. (Anexos 5).

- Preparación del medio de cultivo

Los medios de cultivo que se utilizaron en este estudio, fueron Agar Mitis Salivarius (MS) y Agar Sacarosa y Fosfatos (SYP).

- Sembrado e inoculación

La cepa se sembró de forma masiva en 10 placas Petri en medio Mitis Salivarius en la campana de flujo laminar. Posteriormente se incubó a 37°C por 72 horas. Para evaluar la actividad antiadhesiva, se preparó una suspensión bacteriana de aproximadamente  $1.5 \times 10^9$  UFC/mL de *Streptococcus mutans* CDBB-B-1455.

- Preparación de las muestras

Se aplicó los distintos tratamientos a cada muestra con ayuda de un ultrabrush. Después de 30 minutos, las muestras de cada grupo se sumergieron en tubos Falcon con 1 mL de suspensión bacteriana durante 20 y 60 minutos respectivamente.

- Inoculación de las muestras

Después de 20 y 60 minutos respectivamente cada muestra se transfirió a un tubo Eppendorf con 1 mL de agua destilada estéril. Las bacterias que se adhirieron a las

muestras se dispersaron agitando vigorosamente con ayuda de un vórtex durante 40 segundos. La suspensión generada se utilizó para realizar diluciones seriadas en factor 1:10 para cuantificar el número de bacterias adheridas mediante el método de Goteo por Sellado en Placa Masivo (GSPM). El experimento se realizó por triplicado biológico (n = 3 para cada réplica).

- Cuantificación de bacterias adheridas por el método de GSPM

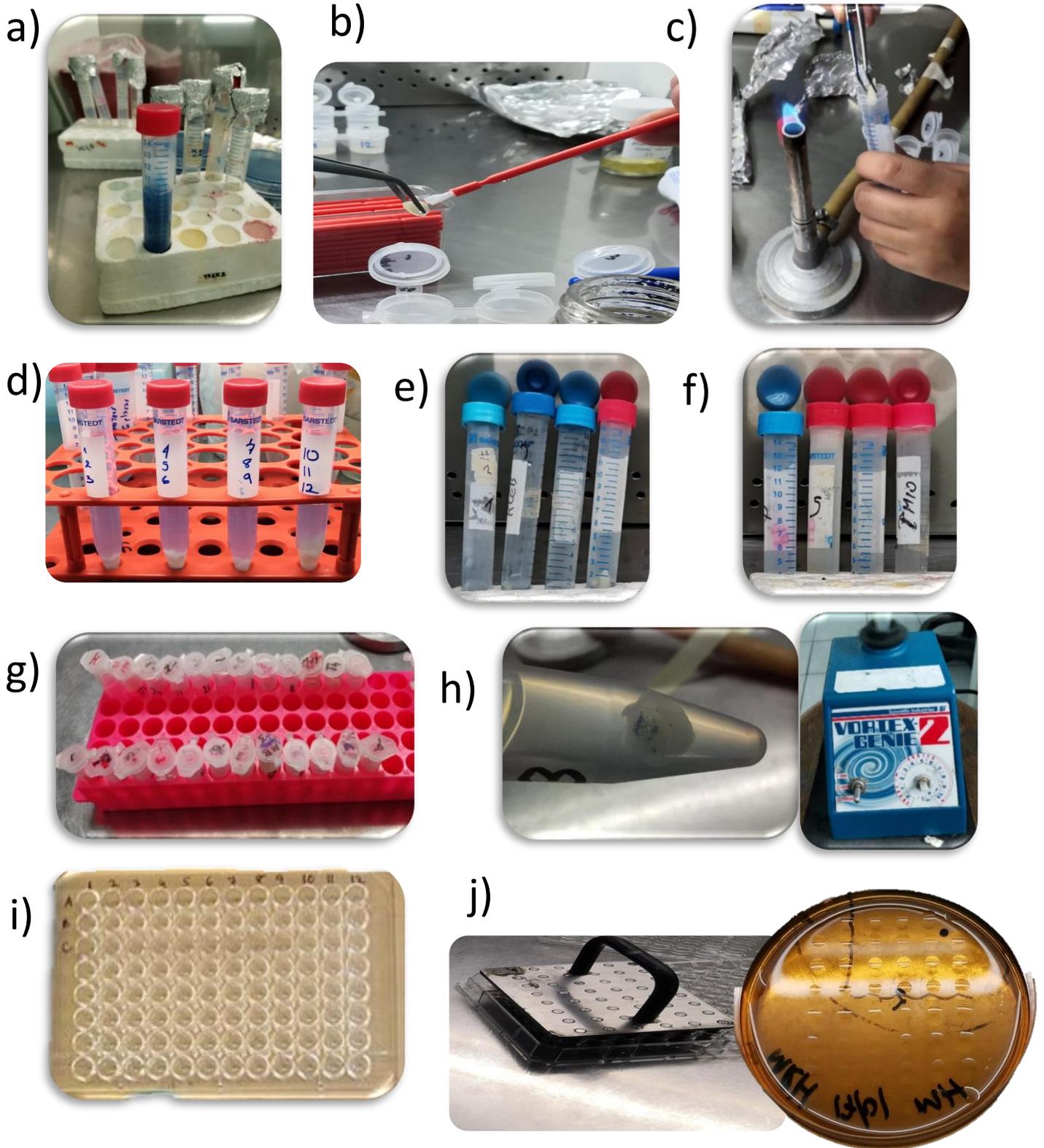
Mediante el método GSPM se cuantificaron las bacterias adheridas presentes en la suspensión generada. Para ello se colocaron 100  $\mu$ L de la suspensión generada de cada muestra en la parte derecha de una placa multipozos (Columna 1). Posteriormente se depositaron 180  $\mu$ L de agua destilada estéril en el resto de los pozos (Columna 2 a 6). Una vez lista la placa, se realizaron diluciones seriadas en factor 1:10 con ayuda de una pipeta multicanal:

- I. Con puntas estériles se tomaron 20  $\mu$ L de la Columna 1 y se transfirieron a la Columna 2, diluyendo y homogenizando las muestras en el agua contenida en los pozos por medio de resuspensión que consistió en subir y bajar 3 veces la suspensión a través de las puntas de la pipeta
- II. Las muestras de la Columna 2 resultaron en una dilución 1/10.
- III. Posteriormente se tomaron 20  $\mu$ L de la Columna 2 y se transfirieron a la Columna 3
- IV. Las muestras de la columna 3 resultaron en una dilución 1/100.
- V. Se continuó hasta diluir la muestra a 1/100000 (Columna 6).

Una vez lista la placa, cada una de las diluciones fue inoculada en los medios de cultivo (MS y SYP) con ayuda de un replicador estéril, el cual permitió tomar un volumen de 1.65  $\mu$ L de cada una de las muestras de la placa multipozos y depositarlas en los medios de crecimiento en forma de gota. Una vez que las muestras fueron inoculadas en el medio respectivo, las placas se incubaron a 37 °C por 48 h.

- Evaluación del efecto antiadhesivo

Posterior a las 48 h de incubación se midió las UFC/mL, estos datos se recolectaron en una hoja de Excel. Para calcular el número de UFC/mL en cada una de las muestras, se tomó el número de colonias de la dilución contable. Asumiendo que una colonia es igual a una UFC/mL, el valor equivale al número de UFC/mL que existe en el volumen de la gota que dejó el replicador. Después mediante una “regla de tres”, se determinó el número de colonias que hay en 100 $\mu$ l y después en 1 mL (Anexo 6).



**Fig. 7** Fuente propia. Evaluación de la adhesión: a) Preparación del inóculo, b) Aplicación del tratamiento, c) y d) Inmersión en suspensión bacteriana, e) Muestras para 20 minutos, f) Muestras para 60 minutos, g) Inoculación de las muestras, h) Dispersión de las bacterias adheridas, i) Cuantificación de bacterias adheridas por GSPM, j) Replicador.

## 9.8 Logística

### 9.9.1 Recursos Humanos

Para la ejecución de la presente investigación se requirió de:

- Un tesista de Maestría en Estomatología con terminal en Pediatría
- Un director
- Un codirector
- Un director disciplinario
- Un director metodológico

### 9.9.2 Recursos Materiales

- Extracto etanólico de *Rumex obtusifolius* al 1%
- Mortero y pistilo
- Agua destilada
- Parilla de agitación magnética
- Quitosano (Sigma –Aldrich)
- Ácido acético
- Cloramina T al 0.5% (Sigma-Aldrich)
- Solución salina
- Balanza analítica
- Agar Mitis Salivarius (Sigma –Aldrich)
- Agar Sacarosa y fosfatos
- Tubos Falcon
- Tubos Eppendorf
- Puntas para micropipeta azules
- Puntas para micropipeta amarillas
- Pipeta multicanal
- Pipeta ajustable multivolumen
- Placas de microtitulación de 96 pozos estériles
- Placas de Petri
- Campana de flujo laminar
- Replicador
- Gel bioadhesivo de digluconato de clorhexidina al 0.2% (Perioxidin)
- Incubadora
- Contador de colonias
- Cepa bacteriana de *S. mutans* CDBB-B-1455 (Adquirida en el CINVESTAV)

### 9.9.3 Recursos Financieros

Recursos propios de Formulación de Inoculantes de Segunda Generación.

### **9.9 Bioética**

Esta investigación se realizará conforme a los principios éticos del Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas en colaboración con la Organización Mundial de la Salud: CIOMS/OMS (2002); así como también se apega a la Ley General de Salud en Materia de Investigación. De acuerdo con el artículo 13, en el cual prevalecerá el criterio de respeto a su dignidad y la protección de sus derechos, así como el bienestar de los sujetos que aceptaron donar sus órganos dentarios.

Una vez concluido el procedimiento y la fase experimental se procedió a eliminar todo residuo generado durante el estudio, de acuerdo con la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. (NORMA Oficial Mexicana NOM- 087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental – Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo).

### **9.10 Análisis estadístico**

Los datos fueron vaciados en el programa Excel 2013 para posteriormente pasarlos al paquete estadístico SPSS, versión 22.

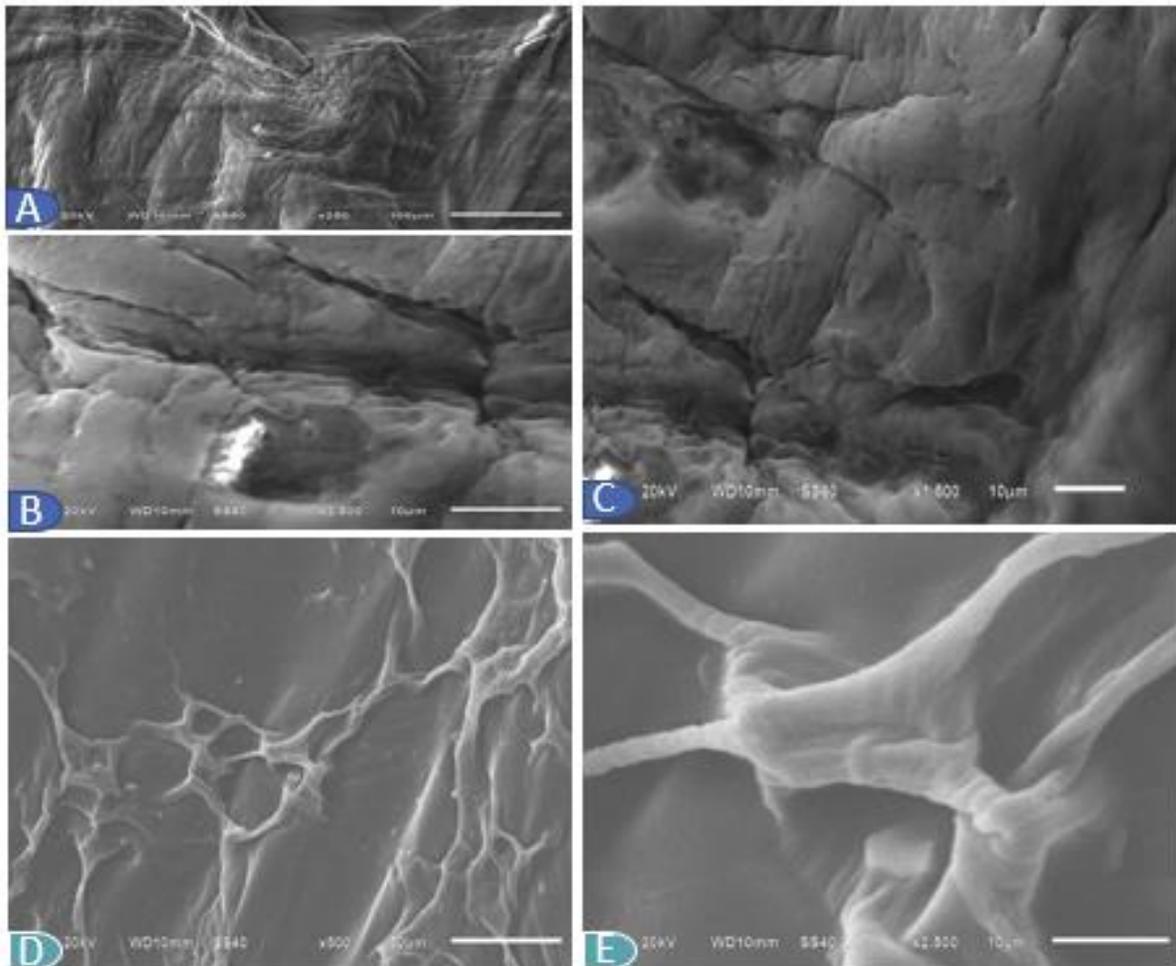
Para la estadística descriptiva se analizaron medidas de tendencia central y desviación estándar.

Para la estadística inferencial se utilizó la prueba de Kruskal Wallis y la prueba U de Mann Whitney con una significancia de  $p < 0.05$ .

## 10. RESULTADOS

### 10.1 Caracterización de Hidrogel de quitosano/ extracto etanólico *Rumex obtusifolius* e Hidrogel de quitosano

En las Imágenes del MEB (Fig. 8) del Hidrogel de quitosano se observó que el hidrogel presenta varias capas irregulares entrecruzadas de quitosano con un borde irregular, mientras que en los Hidrogeles de quitosano con el extracto etanólico *Rumex obtusifolius* se observó un borde liso y formación de una red fibrilar sin porosidad. El cuerpo fibrilar es de aproximadamente 20 micras, estos cuerpos están entrecruzados con fibras de 10 micras aproximadamente.



*Fig. 8 Fuente propia. Imágenes ABC: Hidrogel de quitosano; Imágenes DE: Hidrogel de quitosano con extracto etanólico Rumex obtusifolius*

Mediante la comparación de los espectros infrarrojos con Transformada de Fourier (FT-IR) (Fig. 9) del Hidrogel de quitosano (Infrarrojo rojo) y el Hidrogel de quitosano extracto etanólico *Rumex obtusifolius* (Infrarrojo azul) fue posible observar la aparición y desaparición de grupos funcionales, que indican los cambios químicos en los materiales iniciales hacia la formación del hidrogel entrecruzado con el extracto.

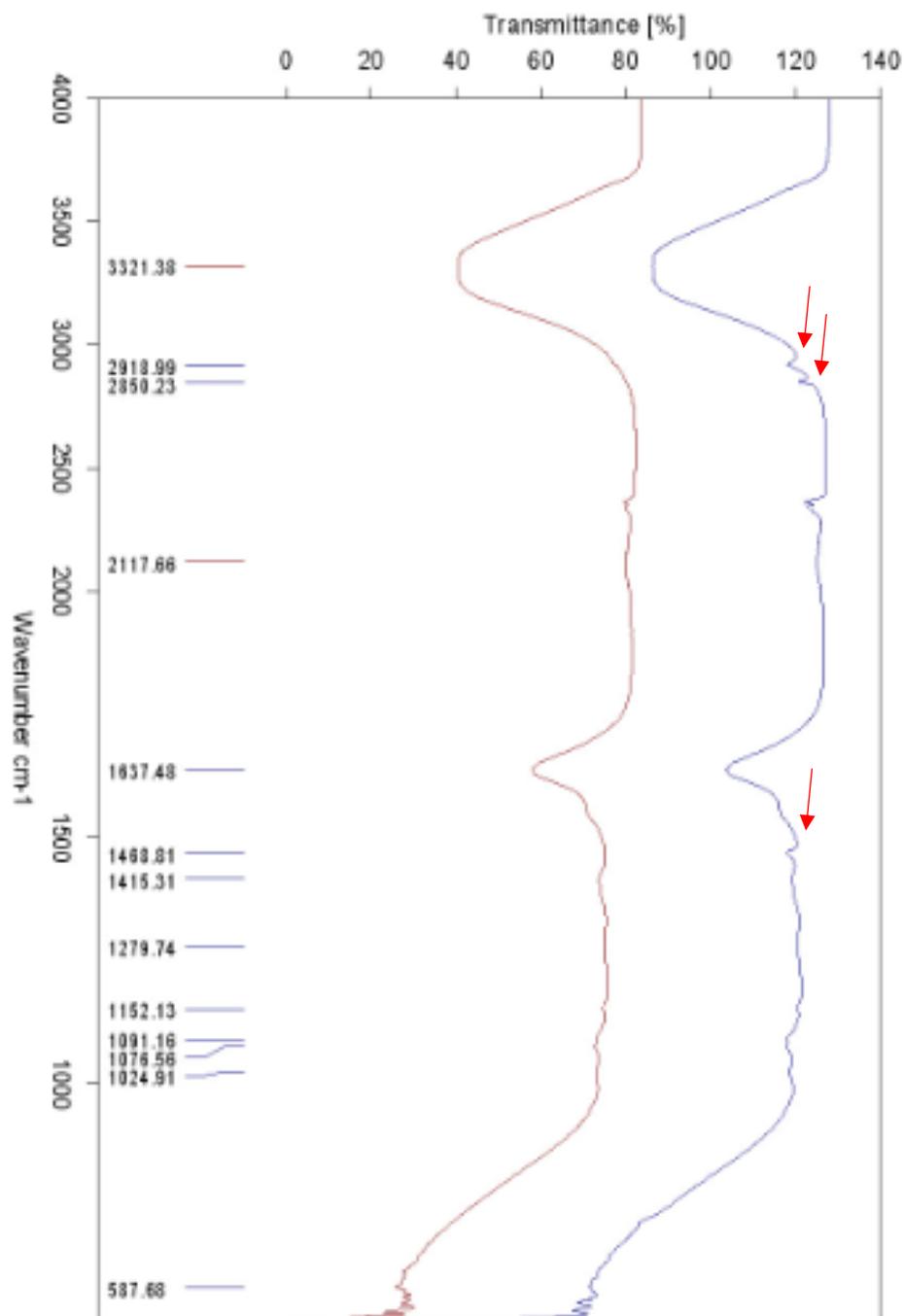


Fig. 9 FT-IR del Hidrogel de quitosano e Hidrogel de quitosano/*Rumex obtusifolius*

En cuanto a la cinética de disolución se observó un comportamiento acelerado de absorción en los primeros instantes de tiempo en contacto con los fluidos y después de cierto tiempo, empezó a perder velocidad de absorción, debido a que el hidrogel comienza a alcanzar su equilibrio fisicoquímico, en donde presenta el máximo contenido de fluido retenido en el interior de su matriz polimérica (Gráfico 1).

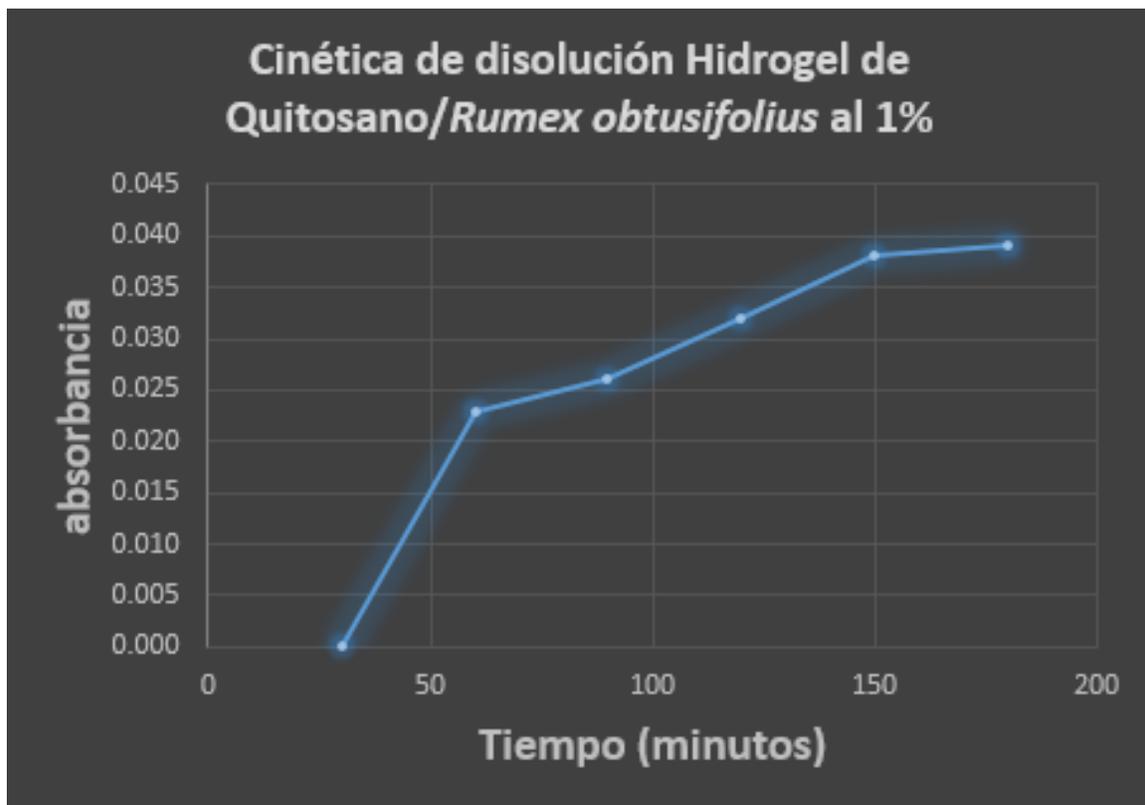


Gráfico 1 Fuente propia

## 10.2 Evaluación de la actividad antiadhesiva

En el cuadro I, se observa el promedio y desviación estándar del **efecto antiadhesivo** de cada sustancia empleada en medio Mitis Salivarius y Sacarosa y Fosfatos a los 20 minutos, en donde el Hidrogel de quitosano (G2) muestra un mayor efecto antiadhesivo comparado con las otras sustancias, con un promedio de  $2020.20 \pm 4285.50$  en medio MS y un promedio de  $2693.60 \pm 6144.20$  en medio SYP.

<b>Cuadro I. Promedio <math>\pm</math> DS del Efecto antiadhesivo (UFM/ mL) en medio MS y SYP a los 20 MIN</b>		
<b>Grupo</b>	<b>MS</b>	<b>SYP</b>
<b>G1</b>	$4040.40 \pm 8570.99$	$3367 \pm 10101.01$
<b>G2</b>	$2020.20 \pm 4285.50$	$2693.60 \pm 6144.20$
<b>G3</b>	$7407.41 \pm 20049.93$	$79461.28 \pm 220639.45$
<b>G4</b>	$876094.29 \pm 2183604.30$	$35016.84 \pm 43994.51$

Cuadro 1 Fuente propia. G1: Hidrogel de quitosano/Rumex obtusifolius; G2: Hidrogel de quitosano; G3: Gel de clorhexidina; G4: Control (agua destilada).

En el cuadro II, se observa el promedio y desviación estándar del **efecto antiadhesivo** de cada sustancia empleada en medio Mitis Salivarius y Sacarosa y Fosfatos a los 60 minutos, en donde el Hidrogel de quitosano (G2) muestra un mayor efecto comparado con las otras sustancias con un promedio de  $0 \pm 0$  en ambos medios.

<b>Cuadro II. Promedio <math>\pm</math> DS del Efecto antiadhesivo (UFM/ mL) en medio MS y SYP a los 60 MIN</b>		
<b>Grupo</b>	<b>MS</b>	<b>SYP</b>
<b>G1</b>	2693.60 $\pm$ 8080.80	0 $\pm$ 0
<b>G2</b>	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
<b>G3</b>	43771.04 $\pm$ 67131.83	57912.45 $\pm$ 59312.80
<b>G4</b>	38383.83 $\pm$ 26417.57	92255.89 $\pm$ 194147.09

Cuadro 2 Fuente propia. G1: Hidrogel de quitosano/Rumex obtusifolius; G2: Hidrogel de quitosano; G3: Gel de clorhexidina; G4: Control (agua destilada).

Se realizó la prueba estadística de Kruskal Wallis para comparar los grupos de estudio a los 20 minutos y a los 60 minutos respectivamente en ambos medios de cultivo (Cuadro 3).

<b>Cuadro III. Comparación entre los grupos de estudio según el tiempo y el medio de cultivo</b>						
<b>Medio</b>	<b>Tiempo</b>	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>	<b>Sig.</b>
<b>MS</b>	20	4040.40 ±	2020.20 ±	7407.41±	876094.29 ±	0.029*
		8570.99	4285.50	20049.93	2183604.30	
	60	2693.60 ±	0 ± 0	43771.04 ±	38383.83 ±	0.000*
		8080.80		67131.83	26417.57	
<b>SYP</b>	20	3367 ±	2693.60 ±	72727.27 ±	35016.83 ±	0.141
		10101.01	6144.20	200481.51	43994.50	
	60	0 ± 0	0 ± 0	57912.45 ±	92255.89 ±	0.000*
				59312.80	194147.09	

Cuadro 3 Fuente propia. Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Kruskal-Wallis  $p < 0.05$ ). MS: medio *Mitis Salivarius*; SYP: medio sacarosa y fosfatos; G1: Hidrogel de quitosano/*Rumex obtusifolius*; G2: Hidrogel de quitosano; G3: Gel de clorhexidina; G4: Control (agua destilada).

En el cuadro III, se observa las diferencias estadísticas entre los grupos a los diferentes tiempos en los medios de cultivo MS y SYP. Se encontró que existen diferencias significativas entre los grupos en ambos tiempos de trabajo en medio *Mitis Salivarius* con una significancia de  $p < 0.029$  y  $p < 0.000$  respectivamente y a los 60 minutos en el medio Sacarosa y Fosfatos con una significancia de  $p < 0.000$ .

Para determinar en qué grupos existen diferencias estadísticamente significativas se realizó la comparación por parejas (Cuadro IV).

<b>Cuadro IV. Grupos en los que hubo diferencia estadísticamente significativa</b>			
<b>Medio</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Muestra 1- Muestra 2</b>	<b>Sig.</b>
<b>MS</b>	20	Hidrogel de quitosano- Control	0.011
	20	Hidrogel de quitosano/ <i>Rumex obtusifolius</i> - Control	0.015
	20	Clorhexidina- Control	0.016
	60	Hidrogel de quitosano- Control	0.000
	60	Hidrogel de quitosano/ <i>Rumex obtusifolius</i> - Control	0.003
<b>SYP</b>	60	Hidrogel de quitosano/ <i>Rumex obtusifolius</i> - Clorhexidina	0.006
	60	Hidrogel de quitosano/ <i>Rumex obtusifolius</i> - Control	0.001
	60	Hidrogel de quitosano- Clorhexidina	0.006
	60	Hidrogel de quitosano- Control	0.001

Cuadro 4 Fuente propia MS: medio *Mitis Salivarius*; SYP: medio sacarosa y fosfatos.

Se realizó la prueba estadística de U de Mann-Whitney para comparar los tiempos de trabajo (20 minutos y 60 minutos) en ambos medios de cultivo (Cuadro V).

<b>Cuadro V. Comparación entre los tiempos de trabajo</b>				
<b>Medio</b>	<b>Grupo</b>	<b>20 minutos</b>	<b>60 minutos</b>	<b>Sig. Estadística</b>
MS	<b>G1</b>	4040.40 ± 8570.99	2693.60 ± 8080.80	0.73
	<b>G2</b>	2020.20 ± 4285.50	0 ± 0	0.43
	<b>G3</b>	7407.41 ± 20049.93	43771.04 ± 67131.83	0.19
	<b>G4</b>	876094.29 ± 2183604.30	38383.83 ± 26417.57	0.86
SYP	<b>G1</b>	3367 ± 10101.01	0 ± 0	0.73
	<b>G2</b>	2693.60 ± 6144.20	0 ± 0	0.43
	<b>G3</b>	72727.27 ± 200481.51	57912.45 ± 59312.80	0.11
	<b>G4</b>	35016.83 ± 43994.50	92255.89 ± 194147.09	0.34

*Cuadro 5. Fuente propia. MS: medio Mitis Salivarius; SYP: medio sacarosa y fosfatos; G1: Hidrogel de quitosano/Rumex obtusifolius; G2: Hidrogel de quitosano; G3: Gel de clorhexidina; G4: Control (agua destilada).*

En el cuadro V, se observa las diferencias estadísticas entre los 20 minutos y 60 minutos en los diferentes grupos de estudio y medios de cultivo. Se encontró que no existen diferencias significativas entre los tiempos de trabajo en ambos medios.

## 11. DISCUSIÓN

La caries dental es uno de los problemas más importantes de salud bucal que afecta a bebés, niños y adultos (34,35), se considera una enfermedad dinámica, multifactorial, mediada por la presencia de biofilm (36,37).

La adherencia bacteriana tiene un papel central en la patogénesis de la caries dental y enfermedad periodontal, también conocidas como enfermedades inducidas por placa. Se reconoce que el principal agente etiológico de la CD es el *Streptococcus mutans* (38), ya que es capaz de formar una biopelícula en la superficie de los dientes que consiste en glucanos insolubles y solubles en agua sintetizados a partir de sacarosa por varias isoformas de la enzima glucosiltransferasa (GTF) presentes en el microorganismo. *S. mutans* y otros estreptococos presentes en la placa dental, también tienen la capacidad de metabolizar carbohidratos de la dieta (sacarosa, galactosa, fructuosa, almidón, etc.) lo que conduce a la liberación de ácidos orgánicos como el ácido láctico, ácido acético, ácido propiónico y ácido fórmico como subproductos. Los ácidos orgánicos liberados reducen el pH de la placa dental y generan desmineralización del esmalte dental (39).

En este contexto, a pesar de los avances que existen en la prevención de la CD como la aparición del fluoruro de sodio, pastas dentales con fluoruro, fluoración del agua, selladores dentales, programas educativos de salud bucal y varios enjuagues bucales con antisépticos, los estudios epidemiológicos muestran claramente una tendencia al aumento global de la caries dental (40).

Un método de control actual, es el uso de agentes antiadhesivos que limitan el crecimiento de microorganismos cariogénicos como *S. mutans* en la cavidad bucal. En la práctica odontológica, los enjuagues bucales con agentes antisépticos como la clorhexidina han demostrado su eficacia; la clorhexidina es una sustancia química con excelente acción antimicrobiana. Sin embargo, estudios previos mostraron que a una concentración de más del 0.05% inhibe completamente la síntesis de proteínas en las células del ligamento periodontal humano. Asimismo, puede causar efectos perjudiciales en los tejidos vitales. Además, se ha reportado que la clorhexidina causa alteración en la sensación del sabor, erosión de la mucosa bucal, pigmentación en los tejidos y puede causar resistencia bacteriana (16,41,42). Por lo anterior, muchos estudios se han dirigido a investigar los extractos orgánicos a partir de plantas medicinales para modular la actividad cariogénica de las bacterias, prevenir y usarlas como una alternativa en el manejo de la caries dental.

Por lo tanto, es importante diseñar nuevos productos farmacéuticos para inhibir la formación de biopelículas dentales, ya que la inhibición de la adherencia bacteriana a la película adquirida puede desempeñar un papel en la prevención de enfermedades bucales. Actualmente, a medida que el enfoque se dirige hacia alternativas mucho más seguras, los productos naturales o sus componentes representan una importante fuente de moléculas potencialmente activas.

En el presente estudio se evaluó la actividad antiadhesiva del Hidrogel de quitosano/*Rumex obtusifolius* y el Hidrogel de quitosano comparado con el agente más utilizado como la clorhexidina contra *Streptococcus mutans* (CDBB-B-1455) en dos medios de cultivo, Mitis Salivarius y Sacarosa y Fosfatos a los 20 y 60 minutos en cada medio.

Los resultados de la presente investigación evidenciaron que el Hidrogel de quitosano (G2) tuvo mayor actividad antiadhesiva contra *Streptococcus mutans* a los 20 y 60 minutos en los dos medios de cultivo como se observa en el Gráfico 2.

Estos resultados coinciden con el trabajo de Costa y cols, quienes mostraron que enjuagues con quitosano durante 30 o 90 segundos, presentaron altos porcentajes de inhibición de la adhesión de *S. mutans* (19). Esto es debido a las propiedades del quitosano, que es un polisacárido adquirido naturalmente que se prepara mediante la desacetilación de la quitina, que se obtiene principalmente de las conchas de cangrejo y camarones; se considera un material no tóxico, biocompatible, biodegradable y es de naturaleza intrínsecamente antibacteriana. En el campo dental, la literatura menciona que se ha utilizado en estudios para la prevención de caries dental ya que proporciona características bactericidas y/o bacteriostáticas. Además, el quitosano se ha sugerido como polímero bioadhesivo que proporciona un tiempo de retención prolongado (43). El análisis estadístico en la presente investigación muestra que no hay diferencias significativas entre los tiempos de exposición 20 y 60 minutos en términos de inhibición de la adhesión.

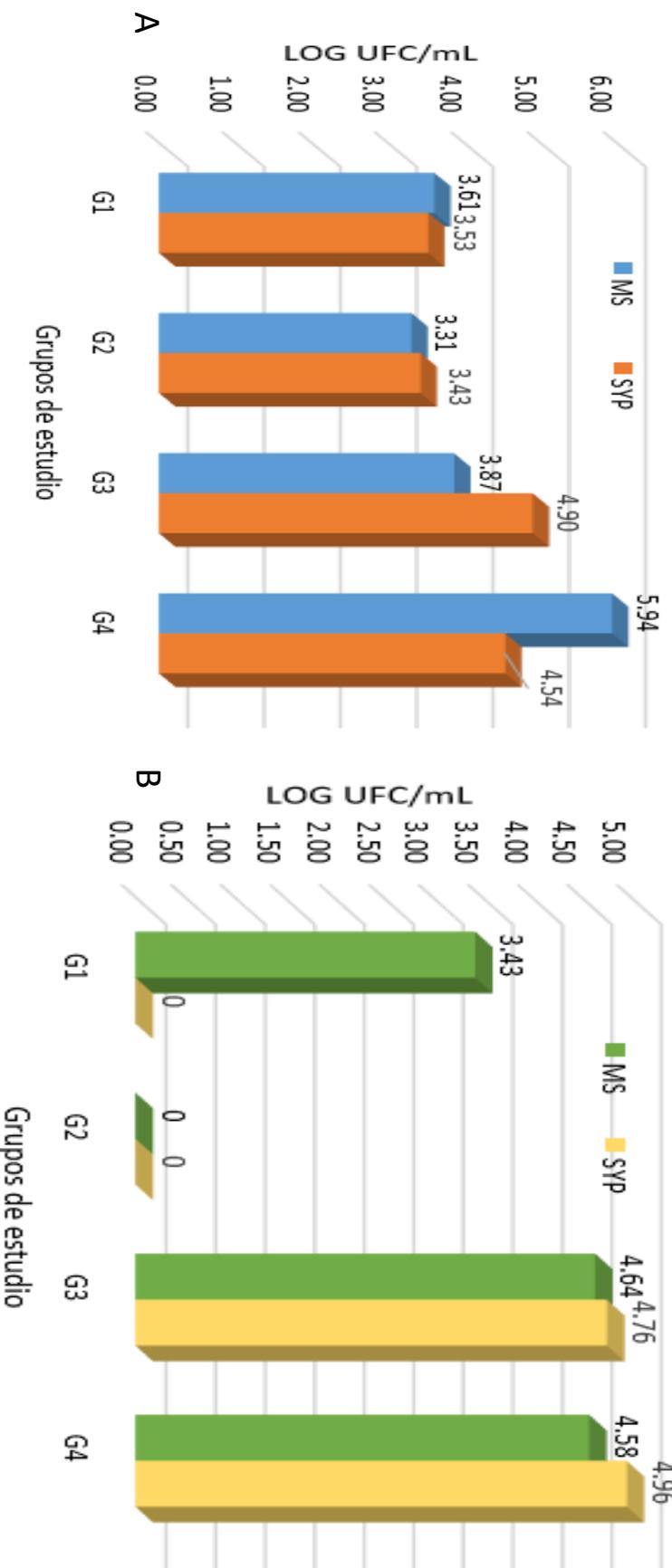


Gráfico 2 Fuente propia. Actividad antiadhesiva del Hidrogel de quitosano/Rumex obtusifolius (G1), Hidrogel de quitosano (G2), Gel de clorhexidina (G3) y control (agua destilada) (G4) contra *Streptococcus mutans* (CDBB-B-1455) A) a los 20 minutos; B) a los 60 minutos. El número de bacterianas adheridas presentes en la biopelícula se expresó como LOG UFC/mL.

Asimismo, se observó que el Hidrogel de quitosano/*Rumex obtusifolius* presentó mejor actividad antiadhesiva que el gel de clorhexidina (perioxidin) (Gráfico 1). Estos resultados sugieren que los metabolitos activos (polifenoles, flavonoides, antraquinonas, estilbenoides) presentes en la planta *Rumex obtusifolius* podrían tener propiedades antiadhesivas y/o alterar la estructura de *S. mutans* (29,31,8,17,18,5,44). Sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencias estadísticamente significativas entre el Hidrogel de quitosano/*Rumex obtusifolius*, Hidrogel de quitosano y gel de clorhexidina a los 20 minutos ni a los 60 minutos en el medio Mitis Salivarius, lo cual determina que todos los agentes presentan la misma actividad antiadhesiva pero en el medio Sacarosa y Fosfatos a los 60 minutos existen diferencias entre el Hidrogel de quitosano/*Rumex obtusifolius* y el gel de clorhexidina y el Hidrogel de quitosano y el gel de clorhexidina. Aunque en estudios previos realizados por Pasquantonio y cols, reportan que en una prueba antiadhesiva la viabilidad de *S. mutans* fue menor (16.9%) utilizando clorhexidina (23). La diferencia podría explicarse debido a que en la presente investigación se utilizó la clorhexidina en una presentación de gel bioadhesivo (Digluconato de clorhexidina 0.2%) mientras que en el trabajo mencionado se utilizó en una presentación de enjuague (Digluconato de Clorhexidina 0.12%), además el medio de cultivo utilizado fue distinto, por lo que se sugiere que la presentación del producto favorece el crecimiento de *S. mutans* a los 20 y 60 minutos en medio Fosfato y Sacarosa.

Los resultados de la presente investigación sugieren que el Hidrogel de quitosano/*Rumex obtusifolius* y el Hidrogel de quitosano inhiben las propiedades de adhesión de *S. mutans*.

Los esfuerzos dirigidos a inhibir los factores de adhesión de los agentes etiológicos en la formación de biopelículas, con extractos ricos en metabolitos activos como polifenoles, naftalenos, estilbenoides y flavonoides, podrían facilitar la acción de los agentes remineralizantes en la saliva y dar como resultado un mejor control sobre la incidencia de caries dental. Dichas medidas están en relación con las revisiones actuales que han subrayado la necesidad de estrategias terapéuticas para desorganizar el nicho patogénico al enfocarse en el microambiente complejo de las biopelículas.

## 12. CONCLUSIONES

En el presente estudio se demostró que el Hidrogel de quitosano/ extracto etanólico *Rumex obtusifolius* posee actividad antiadhesiva contra *S. Mutans* CDBB-B-1455 a los 20 y 60 minutos en medio de cultivo Mitis Salivarius y Sacarosa y Fosfato.

Se sugieren más estudios para determinar la biocompatibilidad de los metabolitos activos del *Rumex obtusifolius* y comprender su mecanismo de acción antiadherente sobre *S. mutans*.

Además, para determinar la influencia del *Rumex obtusifolius* en la expresión génica se recomienda realizar estudios de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Asimismo, para determinar el efecto en la viabilidad celular del *Rumex obtusifolius* contra el *S. mutans*, realizar ensayos de vivo/muerto.

El Hidrogel de quitosano/extracto etanólico *Rumex obtusifolius* puede ser una alternativa antiadhesiva utilizada como agente preventivo para disminuir la incidencia y prevalencia de caries dental.

### 13. BIBLIOGRAFÍA

1. Daglia M, Stauder M, Papetti A, Signoretto C, Giusto G, Canepari P, et al. Isolation of red wine components with anti-adhesion and anti-biofilm activity against *Streptococcus mutans*. *Food Chemistry*. 2010; 119: p. 1182-1188.
2. Rai K, Joshi R. Evaluation of antimicrobial properties of fruit extracts of *Terminalia chebula* against dental caries pathogens. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2009; 2(3): p. 105-111.
3. Babpour E, Abdolhamid S, Mahdi S. Antimicrobial effects of four medicinal plants on dental Plaque. *J Med Plants Research*. 2009; 3(3): p. 132-137.
4. Selwitz R, Ismail AI, Pitts NB. Dental Caries. *Lancet*. 2007; 369: p. 51-59.
5. Sato M, Fujiwara S, Tsuchiya H, Fujii T, Linuma M, Tosa H, et al. Flavones with antibacterial activity against cariogenic bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*. 1996; 54: p. 171-176.
6. Gonçalves J, Salustiano S, Silva A, De Cássia R, Bombarda F, Cardoso R, et al. Hydroalcoholic extracts of *Myracrodruon urundeuva* All. and *Qualea grandiflora* Mart. leaves on *Streptococcus mutans* biofilm and tooth demineralization. *Archives of Oral Biology*. 2018; 91: p. 17-22.
7. Vieira DR, Amaral FM, Maciel MC, Nascimento FR, Libério SA, Rodrigues VP. Plant species used in dental diseases: Ethnopharmacology aspects and Antimicrobial activity evaluation. *Journal of Ethnopharmacology*. 2014; 155: p. 1441-1449.
8. Jerezano AV, Pazos DC, Ríos SA, Tepançal E, Salas E, Villanueva L, et al. Some Traditional Medicinal Plants of North Region from Puebla, Mexico: Uses and Potential Pharmacological Activity of *Rumex* spp. *Nat Prod Chem Res*. 2016; 4(4): p. 1-7.
9. Pérez M, Alvarado E, Magaña M, Sánchez R, Velasquillo C, Gonzalez C, et al. Anti-biofilm activity of chitosan gels formulated with silver nanoparticles and their cytotoxic effect on human fibroblasts. *Materials Science and Engineering C*. 2016; 60: p. 317-323.
10. Marsh P. Dental Plaque as a Microbial Biofilms. *Caries Research*. 2004; 38: p. 204-211.
11. Larsen T, Fiehn N. Dental biofilm infections – an update. *APMIS*. 2017; 125: p. 376-384.
12. Ferrazano GF, Amato I, Ingenito A, Zarrelli A, Pinto G, Pollio , et al. Plant Polyphenols and Their Anti-Cariogenic Properties: A Review. *Molecules*. ; 16: p. 1486-1507.

13. Romero A, Romero A. Adherencia del *Streptococcus mutans* en dientes permanentes humanos sometidos a dos agentes blanqueadores. *Kiru*. 2009; 6(1): p. 39-45.
14. Kim YR, Nam SH. Caries prevention effect of *Scutellaria radix* mouthwash. *Biomedical Research*. 2017; 28(13): p. 6090-6094.
15. Smullen J, Koutsou GA, Foster HA, Zumbé A, Storey DM. The Antibacterial Activity of Plant Extracts Containing Polyphenols against *Streptococcus mutans*. *Caries Res*. 2007; 41: p. 342-349.
16. Chaiya A, Saraya S, Chuakul W, Temsiririrkkul R. Screening for Dental Caries: Preventive activities of Medicinal Plants against *Streptococcus mutans*. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013; 40(1): p. 9-17.
17. Ramirez L, Diaz H. Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibarbo (*Rumex conglomeratus*). *Scientia et Technica*. 2007; 13(33): p. 397-400.
18. Vasas A, Orbán-Gyapai O, Hoffman J. The Genus *Rumex*: Review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015; 175: p. 198-228.
19. Costa E, Silva S, Madureira A, Cardelle A, Tavaría F, Pintado M. A comprehensive study into the impact of a chitosan mouthwash upon oral microorganism's biofilm formation in vitro. *Carbohydr Polym*. 2014; 101: p. 1081-1086.
20. Akman A, Tiğli R, Gümüşderelioğlu M, Nohutcu R. bFGF-loaded HA-chitosan: a promising scaffold for periodontal tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2010; 92(3): p. 953-962.
21. Qian R, Zhongcheng L, Longjiang D, Xiuqing W, Yumei N, Xi Q, et al. Antibiofilm and remineralization effects of chitosan hydrogel containing amelogenin-derived peptide on initial caries lesions. *Regen Biomater*. 2018; 5(2): p. 69-76.
22. Bae K, Jun E, Lee S, Paik D, Kim J. Effect of water-soluble reduced chitosan on *Streptococcus mutans*, plaque regrowth and biofilm vitality. *Clin Oral Invest*. 2006; 10: p. 102-107.
23. Pasquantonio G, Greco C, Prenna M, Ripa C, Vitali L, Pretelli D, et al. Antibacterial Activity and Anti-Biofilm Effect of Chitosan Against Strains of *Streptococcus Mutans* Isolated in Dental Plaque. *International journal of immunopathology and pharmacology*. 2008; 21(4): p. 993-997.
24. Segal R, Pisanty S, Wormser R, Azaz E, Sela M. Anticariogenic Activity of Licorice and Glycyrrhizine I: Inhibition of In Vitro Plaque Formation by *Streptococcus mutans*. *Journal of Pharmaceutical Science*. 1985; 74(1): p. 79-81.

25. Al-Sohaibani S, Murugan K. Anti-biofilm activity of *Salvadora persica* on cariogenic isolates of *Streptococcus mutans*: in vitro and molecular docking studies. *Biofouling*. 2012; 28(1): p. 29-38.
26. Decker E, von Ohle C, Weiger R, Wiech I, Brex M. A synergistic chlorhexidine/chitosan combination for improved antiplaque strategies. *J Periodontal Res*. 2005; 40(5): p. 373-377.
27. Costa E, Silva S, Tavaría F, Pintado M. Study of the effects of chitosan upon *Streptococcus mutans* adherence and biofilm formation. *Anaerobe*. 2013; 20: p. 27-31.
28. Orbán O, Liktó E, Kúsz N, Stefkó D, Urbán E, Hohmann J, et al. Antibacterial screening of *Rumex* species native to the Carpathian Basin and bioactivity-guided isolation of compounds from *Rumex aquaticus*. *Fitoterapia*. 2017 Abril.
29. Wegiera M, Kosikowska U, Malm A, Smolarz H. Antimicrobial activity of the extracts from fruits of *Rumex L.* species. *Central European Journal of Biology*. 2011; 6(6): p. 1036-1043.
30. Yadav S, Kumar S, Jain P, Pundir R, Jadon S, Sharma A, et al. Antimicrobial activity of different extracts of roots of *Rumex nepalensis* Spreng. *Indian J. Nat. Prod. Resour*. 2011; 2: p. 65-69.
31. Korkorian N, Mohammadi M. Anti-Quorum Sensing and Antibacterial Activity of *Rumex alveolatus*. *Zahedan J Res Med Sci*. 2017; 19(11): p. e56009.
32. Corral A, Morales Y, Pazos L, Ramírez A, Martínez R, Muñoz J. Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de "Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo". *Rev. Colomb. Biotecnol*. 2012 Diciembre; 14(2): p. 147-156.
33. González L, Usuga M, Torres C, Delgado E. Biobanco de dientes humanos para investigación en Odontología. *Acta Odontológica de Colombia*. 2014; 4(1): p. 9-21.
34. Kayalvizhi G, Suganya G, Balaji R. A cuppa for caries free teeth ? *Int J Cont Med Res*. 2014; 1(1): p. 19-27.
35. Aliasghari A, Khorasgani M, Khoroushi M. The Effect of Vinegar, Rose Water and Ethanolic Extract Green Tea Against Oral Streptococci, an In Vitro Study. *J Prob Health*. 2017; 5(4).
36. Tinanoff N, Baez R, Diaz C, Donly K, Feldens C, McGrath C, et al. Early childhood caries epidemiology, aetiology, risk assessment, societal burden, management, education, and policy: Global perspective. *Int J Paediatr Dent*. 2019; 29(3): p. 238-248.

37. Pérez M, Boegli L, James G, Velasquillo C, Sánchez R, Martínez R, et al. Silver nanoparticles with antimicrobial activities against *Streptococcus mutans* and their cytotoxic effect. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015; 55: p. 360-366.
38. Shafiei Z, Haji A, Philip K, Thurairajah N. Antibacterial and anti-adherence effects of a plant extract mixture (PEM) and its individual constituent extracts (*Psidium* sp., *Mangifera* sp., and *Mentha* sp.) on single- and dual-species biofilms. *PeerJ*. 2016; 4: p. e2519.
39. Bog-Im P, Beom-Su K, Kang-Ju K, Yong-Ouk Y. Sabinene suppresses growth, biofilm formation, and adhesion of *Streptococcus mutans* by inhibiting cariogenic virulence factors. *Journal of Oral Microbiology*. 2019; 11(1): p. 1-9.
40. Kalesinskas P, Kačergius T, Ambrozaitis A, Jimbo R, Ericson D. *Streptococcus mutans* biofilm inhibition using antisense oligonucleotide to glucosyltransferases B and C. *Acta Médica Lituanica*. 2015; 22(2): p. 85-92.
41. Sulistyani H, Fujita M, Miyakawa H, Nakazawa F. Effect of roselle calyx extract on in vitro viability and biofilm formation ability of oral pathogenic bacteria. *Asian Pac J Trop Med*. 2016; 9(2): p. 119-24.
42. Sámano C, Martínez G, Martínez F, Ruiz F, Toro J, Morales J, et al. Characterization and Biocompatibility of Chitosan Gels with Silver and Gold Nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*. 2014; 2014: p. 11.
43. Kim J, Shin D. Inhibitory effect on *Streptococcus mutans* and mechanical properties of the chitosan containing composite resin. *Restor Dent Endod*. 2013; 38(1): p. 36-42.
44. Diane H, Nahar L, Vadla B, Saif-E-Naser G, Sarker S. Bioactivity of *Rumex obtusifolius* (Polygonaceae). *Archives of Biological Sciences*. 2010; 62(2): p. 387-392.

## 14. ANEXOS

### 14.1 Anexo 1 Clasificación etnobotánica



**DR. ALBERTO JEREZANO DOMINGUEZ**  
**FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA BUAP**  
**PRESENTE**

Por medio de este conducto reciba un cordial saludo así mismo aprovecho la presente para entregarle la identificación de la planta solicitada, misma que realizó el Botánico Allen J. Coombes, siendo la siguiente:

ID	NOMBRE	FAMILIA	No. Colecta
74859	<i>Rumex obtusifolius</i>	Polygonaceae	1

Sin más por el momento me despido de usted,

ATENTAMENTE

PENSAR BIEN PARA VIVIR MEJOR  
Puebla Pue. a 7 de Febrero de 2018

  
Dra. Maricela Rodríguez Acosta  
Directora del Herbario y Jardín Botánico BUAP

c.c.p. Archivo

Jardín Botánico  
Universitario

Prolongación 24 Sur y Av. San Claudio,  
Edif. HJB1, Ciudad Universitaria,  
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570  
01 (222) 229 55 00 Ext. 7030 y 7031

## 14.2 Anexo 2 Consentimiento informado

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo \_\_\_\_\_  
Como padre o tutor del niño(a): \_\_\_\_\_ declaro  
que de manera clara se nos ha explicado el objetivo de la investigación por lo que AUTORIZO  
CONSCIENTEMENTE donar los dientes que estén en condiciones de exfoliación a corto plazo,  
mismo que me fue demostrado radiográficamente con la pérdida de la raíz y clínicamente con la  
movilidad que presentan los dientes, para ser utilizados con fines de estudio e investigación por los  
especialistas de la Maestría en Estomatología con terminal en Pediatría de la Benemérita  
Universidad Autónoma de Puebla.  
Por ultimo declaro que no tengo ninguna duda y reitero mi consentimiento para la participación de  
mi hijo.

\_\_\_\_\_  
Firma del padre o tutor

\_\_\_\_\_  
Firma L.E Mariana Ruiz Herrera

\_\_\_\_\_  
Firma de testigo

## 14.3 Anexo 3 Asentimiento informado

### ASENTIMIENTO INFORMADO

Hola mi nombre es Mariana y estudio en la clínica de Niños para cuidar los dientes. Actualmente  
estoy realizando un estudio para conocer acerca de cómo quitar bichos de las boquitas de los niños  
fácilmente y para ello queremos pedirte que nos apoyes regalándonos tus dientes que se mueven.  
Tu participación en el estudio consistiría en intercambiar tu diente por un certificado y un premio que  
podrás darle al ratón de los dientes. Tu donativo es voluntario, es decir, aun cuando tu papá o mamá  
hayan dicho que sí, si tú no quieres hacerlo puedes decir que no. Si nos ayudas muchos niños podrán  
sonreír.

Si aceptas donar tus dienteitos, te pido que por favor pongas una ( ✓ ) en el cuadrado de abajo que  
dice "Sí quiero donar" y escribe tu nombre.

Si no quieres donar, no pongas ninguna ( ✓ ), ni escribas tu nombre.

Sí quiero donar

Nombre: \_\_\_\_\_

Nombre y firma de la persona que obtiene el asentimiento:  
\_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

## 14.4 Anexo 4 Compra de Cloramina T



**MASTER LEAV SA DE CV**  
 RIO PAPAGAYO  
 4031053

Página 1  
 Adaflex®

Pedido **005727**  
 Fecha 8 octubre 2018

Ciiente No 11093

Atención  
 MARIANA RUIZ  
 Transporte

Comentario

**Condiciones**

VENTA A 30 DIAS

Flete :N Ocorre : N Seguro : N Moneda : MN

**Vendedor**

001 LISSETTE PONCE

OC/Folio 2013

Clave	Descripcion	Al	Ubic	Pedido	Surtido	Precio %Des	Subtotal
23270-50G	CHLORAMINE T TRIHYDRATE		01		1	800.00	800.00

NOVECIENTOS VEINTIOCHO PESOS 00/100 M.N.

Partidas 1 Unidades 1.00 Disponibles

Descuento :  
 Subtotal : 800.00

Surtio : \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Empaco: \_\_\_\_\_  
 09/10/2018 02:03:27 p. m.

IVA : 128.00  
 TOTAL : 928.00

## 14.5 Anexo 5 Compra de la cepa *S. Mutans* CDBB-B-1455 en el CINVESTAV



### 14.6 Anexo 6 Formato de recolección de datos

Muestra	Dilución	No de Colonias	UFC /200 microL	UFC/1000 microL	UFC/ml original	LOG
<b>Grupo 1: Hidrogel de Quitosano/Rumex Obtusifolius</b>						
<b>Mitis Salivarius (MS)</b>						
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
		Promedio total				

## 15. Productos de la investigación

### 15.1 Participación en el XI Encuentro Internacional de Cuerpos Académicos y Grupos de Investigación Odontológica. CONSEJO NACIONAL DE CUERPOS ACADÉMICOS EN ODONTOLOGÍA



#### XI Encuentro Internacional de Cuerpos Académicos y Grupos de Investigación Odontológica

CONSEJO NACIONAL DE CUERPOS ACADÉMICOS EN ODONTOLOGÍA  
UNIVERSIDAD VERACRUZANA  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Estimados Participantes:

Pazos-Guarneros, Diana del Carmen<sup>1</sup>; Jerezano-Dominguez, Alberto Vinicio<sup>2</sup>, Juarez-Diaz, Ismael,<sup>3</sup> Flores-Tochihuitl, Julia<sup>4</sup>, Castillo-Silva, Brenda<sup>5</sup>, Ruiz-Herrera, Mariana<sup>6</sup>.

Nos complace comunicarle que el trabajo titulado:

#### PLANTAS MEDICINALES Y FITOMOLÉCULAS EN ODONTOLOGÍA

Ha sido **ACEPTADO con la CLAVE: CIBP-6**

Por el Comité Científico del XI Encuentro Internacional de Cuerpos Académicos y Grupos de Investigación Odontológica, el cual considera que el mismo reúne las condiciones requeridas para ser **presentado en el Concurso de Investigación del evento**.

Es urgente envíe usted su participación en extenso con la versión seleccionada, publicación de Artículo en la Revista Mexicana de Medicina Forense de la Universidad Veracruzana, con ISSN e indexada o como un Capítulo de Libro con ISBN, **para la Revisión y Aceptación del Comité Editorial**. Para ello es indispensable envíe su trabajo en los formatos especificados para cada uno en la página de [conacaomx.org](http://conacaomx.org), a más tardar el día 10 de febrero de 2019. **Los resúmenes NO pueden ser publicados.**

Para que su trabajo en extenso pueda participar en el evento y ser incluido en el suplemento de la revista, o como Capítulo de Libro deberá **entregar en el tiempo requerido y en el formato establecido**, cubrir el pago de inscripción, y enviar su comprobante de pago escaneado, anotando la **clave asignada** en la carta de aceptación y **nombre completo del autor, antes del 15 de febrero del 2019** a la siguiente dirección electrónica: [conacao.uv@gmail.com](mailto:conacao.uv@gmail.com)

Debe confirmar sus datos de participación en el registro de la página y efectuar su pago correspondiente en el Banco SANTANDER Cuenta: 20-00575950-2 CLABE: 014849200057595023 a CONACAO y enviar su ficha de pago escaneada con el nombre completo escrito, al correo electrónico

Será un placer recibirles y compartir con ustedes estos días de intercambio de experiencias donde pretendemos promover el rescate de las investigaciones, mostrando la calidad de las mismas, realizadas por egresados y estudiantes.

  
Boca del Río, Ver a 31 de Enero del 2019  
COMITÉ CIENTÍFICO Veracruz

## 15.2 Participación en el XXVII Encuentro Nacional y XVIII Iberoamericano de Investigación en Odontología



La Universidad Autónoma de Guadalajara  
a través de la  
Facultad de Odontología  
otorga el presente

# Reconocimiento

a  
Mariana Ruiz Herrera, Alberto Vinicio Jerezano Domínguez, Diana del Carmen Pazos Guarneros, Miguel Ángel Casillas Santana, Yolanda Elizabeth Morales García, Erick Reyes Cervantes,  
por su **presentación cartel** del tema:  
SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES DE QUITOSANO CON EXTRACTO RUMEX OBTUSIFOLIUS  
durante el marco del XXVII Encuentro Nacional y XVIII Iberoamericano de Investigación en Odontología.

Zapopan, Jalisco, 6, 7 y 8 de noviembre de 2019.

  
C.D.E.E. Alberto Rafael Arriola Valdés  
Director de la Facultad de Odontología

  
Dr. Amoury de Jesús Pozos Guillén  
Presidente de la Sociedad Nacional de Investigadores en Odontología