

Actividad antimicrobiana contra biopelículas de *Streptococcus mutans* y efecto citotóxico sobre queratinocitos y fibroblastos, del aceite esencial de *Cymbopogon citratus*, y sus componentes citral y mirceno

Antimicrobial activity against *Streptococcus mutans* biofilms and cytotoxic effect on keratinocytes and fibroblasts, essential oil of *Cymbopogon citratus*, and its citral and myrcene components

Estudiante: Mailen Ortega Cuadros

Tutor: Maria Cecilia Martínez Pabón

Comité tutorial: Adriana Tofiño, David Galvis y Luciano Merini

Resumen

Antecedentes: la caries es una enfermedad relevante en salud pública; las estrategias preventivas tradicionales han mostrado efectos limitados y reacciones adversas. Así, vemos necesario ampliar las investigaciones sobre nuevas sustancias coadyuvantes. Los aceites esenciales obtenidos de *Cymbopogon citratus*, contienen componentes con efecto antimicrobiano como citral y mirceno, de posible uso clínico en el tratamiento de la caries. En este sentido, su efecto antimicrobiano sobre la microbiota de la cavidad bucal y citotoxicidad sobre células de la mucosa oral, deben ser evaluados.

Objetivo: evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* y los componentes citral y mirceno contra *Streptococcus mutans* ATCC UA159, así como su citotoxicidad sobre queratinocitos y fibroblastos humanos.

Metodología: el efecto de la viabilidad contra *Streptococcus mutans* en biopelículas se evaluó por exposición a las tres sustancias utilizando la técnica MBEC-high-throughput a concentraciones 1, 0,1, 0,01 µg/mL y clorhexidina como control positivo. La citotoxicidad de los compuestos se evaluó sobre queratinocitos y fibroblastos mediante la técnica de reducción de MTT.

Resultados: las tres sustancias evaluadas presentaron efecto sobre la viabilidad de *Streptococcus mutans* con mortalidad entre 74,53 % y 96,09 %, sin diferencia

significativa entre ellos ($p > 0,393$) ni frente a clorhexidina ($p = 0,06$), además no se evidencio citotoxicidad sobre queratinocitos y fibroblastos en un tratamiento de 24 h.

Conclusión: los compuestos evaluados presentaron un efecto microbiológico comparable al de clorhexidina, por tanto, se considera que deben seguir siendo estudiados como potenciales coadyuvantes para la prevención de caries dental que generen menores efectos adversos.

Palabras claves: caries dental, biopelículas, citotoxicidad, *Streptococcus mutans*, *Cymbopogon citratus*, citral, mirceno,

Summary

Background: the caries is a relevant disease in public health, traditional preventive strategies have shown limited effects and adverse reactions. Thus, we need to expand research on new adjuvants. The essential oils obtained from *Cymbopogon citratus* contain antimicrobial components such as citral and myrcene, which may be used clinically in the treatment of caries. In this sense, its antimicrobial effect on the specific microbiota of the oral cavity and cytotoxicity on cells of the oral mucosa, should be evaluated.

Objective: to evaluate the antimicrobial activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and the citral and myrcene components against *Streptococcus mutans* ATCC UA159, as well as its cytotoxicity on keratinocytes and human fibroblasts.

Methodology: the effect of viability against *Streptococcus mutans* on biofilms was evaluated by exposure to the three substances using MBEC-high-throughput at concentrations 1, 0,1, 0,01 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and chlorhexidine as positive control. The cytotoxicity of the compounds was evaluated on keratinocytes and fibroblasts by the MTT reduction technique.

Results: the three substances evaluated had an effect against the viability of *Streptococcus mutans* with mortality between 74,53 % and 96,09 %, without significant difference between them ($p > 0,393$) and against chlorhexidine ($p = 0,06$). In addition, there was no cytotoxicity on keratinocytes and fibroblasts in a 24 h.

Conclusion: the compounds evaluated had a microbiological effect comparable to that of chlorhexidine, therefore it is considered that they should continue to be studied as potential adjuvants for the prevention of dental caries that generate less adverse effects.

Key words: dental caries, biofilms, cytotoxicity, *S. mutans*, *Cymbopogon citratus*, citral, myrcene.

Introducción

La cavidad oral es un ambiente dinámico que alberga una amplia variedad de microorganismos, cuyo estilo de vida se caracteriza por la formación de biopelículas o placa bacteriana (Kolenbrander, 2000; Lemos et al., 2005). La biopelícula se desarrolla naturalmente sobre la superficie dental a partir de polímeros extracelulares, glicoproteínas salivales, fosfoproteínas, lípidos, células del sistema inmune, glucosiltransferasas, glucanos y consorcios microbianos (Costerton et al., 1994), los cuales interactúan mediante sistemas dinámicos de señalización o quorum sensing promoviendo la protección y resistencia de las especies microbianas frente a variaciones ambientales y agentes antimicrobianos (Marsh, 2005; Aquino et al., 2012; Jhajharia et al., 2015). La placa bacteriana previene la colonización de la cavidad bucal por especies exógenas, manteniendo de esta forma un equilibrio benéfico con el hospedador; sin embargo, cuando esta homeostasis se pierde, se altera el metabolismo de las comunidades microbianas, transformando la composición de la biopelícula hasta un estado potencialmente patógeno que permite la aparición de enfermedades dentro de las cuales destaca la caries dental (Marsh, 2005), la cual desde la perspectiva de la salud pública, representa un problema a nivel mundial (OMS, 2012; Giacaman et al, 2013), con antecedentes entre 33,27 y 98% en la población general de Latinoamérica y Colombia (Bönecker & Cleaton-Jones, 2003; MINSALUD, 2014). La caries se define entonces como una enfermedad compleja, de origen multifactorial, en la que interactúa un amplio grupo de determinantes biológicos, socio-económicos y culturales, caracterizada por la destrucción del esmalte dental (Fejerskov, 2004). Esto se debe principalmente a la acción de los ácidos producidos por las principales especies acidogénicas de la cavidad bucal, que incluyen *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* y *Lactobacillus spp* (Liébana, 2002; Maeda et al., 2013). Tanto por sus propiedades acidúricas y acidogénicas, crecimiento competitivo, capacidad de

adherencia y formación de biopelículas; como por su resiliencia frente a los cambios ambientales basada en el transporte y metabolismo de una amplia variedad de carbohidratos dietéticos, *S. mutans* es un excelente modelo cariogénico (Loesche, 1986; Banas, 2004; Lemos & Burne, 2008; Moye et al., 2014).

Entre los mecanismos de control de la placa bacteriana y prevención de la caries dental, se encuentra, el cepillado (Ghassemi et al., 2013), el uso de seda dental (Løe, 2000), enjuagues bucales, pastas y barnices a base de clorhexidina y flúor (Rodrigues et al., 2011; James et al., 2017), fenoles y derivados de amonio cuaternario (Twetman, 2004). Aunque varias de estas sustancias cuentan con suficiente evidencia sobre su efecto preventivo (Bascones & Morantes, 2006; Kalesinskas et al., 2014), se ha encontrado que pueden producir efectos adversos cuando se usan dosis superiores a las terapéuticas o en exposiciones prolongadas; induciendo fluorosis dental (fluoruros) (Jha et al., 2011), disgeusia y pigmentación dental (clorhexidina) (Varoni et al., 2012), sensación de quemazón y efectos erosivos en el esmalte (compuestos de amonio cuaternarios y fenoles) (Bascones & Morantes, 2006; de Araújo et al., 2015).

Por otro lado, existen grupos con necesidades especiales en cuanto a higiene bucal en quienes una opción química para prevención y terapéutica puede tener mayor utilidad. Algunos ejemplos son aquellos individuos con trastorno por déficit de atención con hiperactividad (Blomqvist et al., 2005), niños con trastorno del síndrome autista (Lowe & Lindemann, 1985), personas con síndrome de Sjögren (Mavragani & Moutsopoulos, 2010; Leung et al., 2004) y pacientes con cáncer de cabeza y cuello que como consecuencia de los tratamientos con radioterapia, cirugía y quimioterapia (Pfister et al., 2015) presentan alteración sobre las glándulas salivales desarrollando hipo salivación irreversible, haciendo más susceptible el desarrollo de caries (Jensen et al., 2010; Hong et al., 2010).

Un tema de creciente interés en la literatura está enfocado en los productos naturales y sus derivados (Lang & Buchbauer, 2012), entre los cuales destacan los aceites esenciales, cuyas propiedades proveen una amplia diversidad química (Cos et al., 2016) representada principalmente por compuestos de tipo terpenoides y fenilpropanoides (Calsamiglia et al., 2007) que han desempeñado un papel fundamental en terapias como antibacterianos, anticancerígenos y antifúngicos (Butler, 2008). *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf es una planta aromática perenne perteneciente a la familia *Poaceae* (Gramineae), nativa del sureste de Asia, cultivada a nivel mundial en regiones tropicales

y subtropicales (Gupta & Jain, 1978), popularmente conocida en diversos países como hierba luisa, citronela, lemongrass, te limón, caña santa (Negrelle & Gomes, 2007) y limoncillo en Colombia (Tofiño-Rivera et al., 2016a).

Los aceites esenciales de *C. citratus* y sus compuestos citral y mirceno han sido reportados como sustancias con propiedades antimicrobianas sobre cultivos planctónicos de *S. mutans* (Vargas et al., 2010; Chaudhari et al., 2012; Almeida et al., 2013; Fazeelath Banu & Geetha, 2015). Por su parte, tanto Almeida et al. (2013), como Tofiño-Rivera et al. (2016a), demostraron actividad antimicrobiana de un aceite esencial de *C. citratus* sobre biopelículas de *S. mutans* (Tofiño-Rivera et al., 2016a; Almeida et al., 2013). A su vez, Aiensaard et al. (2011) demostraron el efecto antimicrobiano de citral sobre cultivos planctónicos y biopelículas de *Staphylococcus aureus* (Aiensaard et al., 2011), mientras Bernardes et al. (2010) identificaron que el mirceno posee alguna actividad antimicrobiana sobre *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis* y *S. mutans* (Bernardes et al., 2010).

Por su parte, estudios previos en los que se evalúa el efecto del aceite esencial de *C. citratus* sobre células eucariotas, presentan resultados variables. Se ha identificado que el aceite no presenta citotoxicidad sobre células HaCaT (queratinocitos humanos) (Koba et al., 2009), células Vero ATCC CCL-81 (*Cercopithecus aethiops* African green monkey kidney cells) (Correa-Royero et al., 2010) ni células CHO (Chinese hamster ovary cells) (Tofiño-Rivera et al., 2016a), mientras que otros estudios reportan discreta citotoxicidad sobre las células odontoblastóides MDPC-23 (Vargas et al., 2010) y toxicidad sobre células CHO y fibroblastos humanos no cancerígenos (WI38 ATCC no. CCL-75) (Kpoviessi et al., 2014).

Considerando que la caries dental es producida por microorganismos organizados en biopelículas (Kolenbrander, 2000; Lemos et al., 2005); que la composición de los aceites esenciales puede presentar variaciones de acuerdo a factores geo-botánicos; el quimiotipo de la planta; los métodos de extracción (Durán et al., 2007; Lopes da Silva et al., 2010) y la técnica de evaluación del efecto antimicrobiano, el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *C. citratus* y los componentes citral y mirceno contra la viabilidad de biopelículas de *S. mutans* y, paralelamente su citotoxicidad sobre células HaCaT (queratinocitos) y fibroblastos humanos, con el fin de identificar su compatibilidad biológica con los tejidos.

Materiales y métodos

Diseño experimental

- ✓ Tipo de estudio: experimental *in vitro*
- ✓ Variables de respuesta (dependiente): % de mortalidad y % de viabilidad
- ✓ Factor (variable independiente): sustancias (aceite esencial de *C. citratus*, componentes citral y mircenol)
- ✓ Niveles de los factores: 1 µg/mL, 0.1 µg/mL y 0.01 µg/mL
- ✓ Muestra: no probabilística, por conveniencia
- ✓ Repeticiones de cada experimento: 3

1. Obtención de aceite esencial y análisis fitoquímico

La obtención de aceite esencial de *C. citratus* fue realizada por la Asociación de productores Agroecológicos indígenas Kankuamos de la Sierra Nevada de Santa Marta (ASOPROKAN), en el resguardo indígena Kankuamo en Atanquez, Cesar (1200 msnm), a partir de 1000 g de hojas de la planta (cosechada en octubre-noviembre, época lluviosa) mediante la técnica de destilación por arrastre con vapor. La obtención del aceite esencial de parte de ASOPROKAN no requirió el cumplimiento de los decretos 1320 de 1998 del Ministerio del Interior, decisión andina # 391 del 2 de julio de 1996 y 1375- 1376 del 2013 del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible dado, que esta asociación está legalmente constituida ante cámara y comercio de la ciudad de Valledupar para la venta comercial de café, cacao y aceites esenciales; por lo cual no se requiere consulta previa con el resguardo Kankuamo, ni de acceso al recurso biológico para adquirir los productos comerciales generados por dicha asociación en ese resguardo. Por otro lado, para comprobar la identidad genética del material vegetal del cual se obtuvo el aceite esencial, se tomaron especímenes completos del cultivo comercial de ASOPROKAN, el cual se clasificó en el Herbario José Cuatrecasas de la Universidad Nacional Sede Palmira; el análisis fitoquímico fue realizado mediante cromatografía de gases con detector selectivo de masas (GC-MS), en el laboratorio del Grupo de Investigación Química de los Productos Naturales de la Universidad de Córdoba, Montería; según se describe en un trabajo previo realizado por este mismo grupo de investigación (Tofiño-Rivera et al., 2016a). Al identificar como componentes mayoritarios del aceite esencial de *C. citratus* a los compuestos citral y mircenol, se

definió la utilización de estos en presentación comercial (cital cis+trans 95% de Alfa aesar. Karlsruhe Alemania) (mircono grado técnico Sigma-Aldrich Chemical. St Louis, MO, USA), con el fin de identificar de manera individual su posible participación en el efecto de la viabilidad contra *S. mutans* en biopelículas.

2. Curvas de crecimiento de *S. mutans* en cultivos planctónicos y biopelículas

La curva de crecimiento bacteriano se realizó mediante la medición de la densidad óptica (DO) a 600 y 625 nm y el recuento en placa de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL). La cepa *S. mutans* ATCC UA159, fue gentilmente donada por el Laboratorio de Microbiología e Histopatología bucal, facultad de Odontología, Universidad de Antioquia. El cultivo se realizó en agar y caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI; Merck KGaA. Darmstadt Alemania) con CO₂ 5 % durante 48 horas a 37°C para obtener un inóculo con turbidez equivalente a 1,0 o 0,5 del patrón de Mc Farland, según se tratará de cultivo planctónico o de biopelículas, siguiendo el protocolo descrito por Segura et al. (2014) y He et al. (2015) respectivamente, con mínimas modificaciones (Segura et al., 2014; He et al., 2015).

Las curvas de crecimiento de *S. mutans* en cultivos planctónicos fueron realizadas con el fin de conocer el mejor momento para obtener el inóculo correspondiente entre 1×10^7 - 1×10^{10} UFC/mL, se inició con un inóculo correspondiente al patrón 1,0 de Mc Farland (DO ~ 0,257) a 600 nm, se realizó una dilución 1:30 con caldo BHI suplementado con 0,2 U bacitracina. Esta dilución se alicuotó en 14 viales de 1,5 mL, que posteriormente se incubaron a 37°C con CO₂ al 5 %. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro (GENESYS 10s UV-Vis. Madison USA) cada hora durante 14 h y se realizaron diluciones seriadas 10^{-1} a 10^{-8} en caldo BHI, para posteriormente inocular estas diluciones mediante la técnica de spot en agar BHI suplementado con 0,2 U de bacitracina y realizar recuento de UFC/mL después de 48 h de incubación. Para estos ensayos se realizaron 4 repeticiones.

El ensayo MBECTM (Minimum Biofilm Eradication Concentration) es un ensayo de detección de alto rendimiento utilizado para determinar el efecto antimicrobiano frente a biopelículas de una variedad de microorganismos. El MBEC consiste en una tapa de plástico con 96 clavijas donde se establecen las biopelículas y una base correspondiente. Las biopelículas se transfieren a una nueva placa de 96 pozos para la prueba de

inhibición microbiana. El diseño del ensayo permite la prueba simultánea de múltiples sustancias en concentraciones múltiples con muestras repetidas (Innovotech, 2015).

Teniendo en cuenta las recomendaciones del proveedor del aditamento MBEC y las necesidades nutricionales de *S. mutans*, se realizó una evaluación preliminar con la adición de diferentes suplementos al caldo de cultivo de biopelículas, en busca de la combinación que permitiera el mayor crecimiento de las biopelículas con la menor adición de suplementos al caldo de cultivo. Se utilizó BHI, BHI suplementado con 0,2 U bacitracina, sacarosa al 5 % y al 10 %. La curva de crecimiento se inició con un inóculo correspondiente al patrón 0,5 de Mc Farland (DO ~ 0,08 – 1,0) a 625 nm, se realizaron diluciones 1:15 con cada sustrato, los cuales, posteriormente se distribuyeron por duplicado en una caja MBEC-high-throughput 19131 (MBEC-HTP) (Innovotech, Edmonton, Alberta, Canada) de 96 pozos (150 µL en cada pozo), esta caja se incubó posteriormente en una jarra de anaerobiosis con CO₂ 5 % y agitación por balanceo (Unimax 1010. Heidolph®) a 110 balanceos por min (bpm) y 37°C durante 144 h, reemplazando el medio de cultivo por medio fresco cada 24 h. Una vez incubadas las biopelículas, y con ayuda de una pinza mosquito, se fracturaron tres clavijas para realizar los siguientes procedimientos:

2.1. Recuento de células viables (UFC/mL)

La clavija se trató con un sonicador (MIDMARK Soniclean modelo M 150) a 42 kHz durante 30 min, luego de lo cual se realizaron diluciones seriadas de 10⁻¹ a 10⁻⁸, para su posterior siembra en agar BHI, mediante la técnica de spot y recuento de UFC/mL después de 48 h de incubación.

2.2. Tinción con cristal violeta

Se aplicó el procedimiento descrito por Fuentes-Garcia et al. (2009) (Fuentes-Garcia et al., 2009) con algunas modificaciones. La clavija se sumergió en 1 mL de cristal violeta al 0,5 % permitiendo su reacción durante 30 min. Se enjuagaron las clavijas con agua destilada estéril y se secaron a temperatura ambiente; posteriormente se visualizaron en el Estereoscopio a 6,5 aumentos (Zeiss stemi 2000-C) para verificar la formación de la biopelícula.

2.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se aplicaron los procedimientos descritos por Fuentes-García et al. (2009) (Fuentes-García et al., 2009) con algunas modificaciones. La clavija se sumergió en glutaraldehído 2,5 % durante toda la noche. Luego, se hicieron tres lavados con buffer fosfato salino (PBS) durante 5 min cada uno, posteriormente se lavaron con agua destilada y se deshidrataron durante 15 min en concentraciones crecientes de etanol al 50 %, 75 % y 95 %, seguido de una deshidratación final con etanol al 100 % durante 15 min con tres repeticiones. Posteriormente, la muestra se fijó con cinta de grafito y fue recubierta con oro en un pulverizador catódico (DENTON VACUUM Desk IV), hasta lograr un espesor de capa de ~20 nm. Para realizar la medición, la muestra se analizó en un Microscopio Electrónico de Barrido (JEOL JSM 6490 LV), en alto vacío. Se empleó el detector de electrones secundarios (SEI) para evaluar la morfología y topografía de la muestra.

3. Determinación del efecto sobre la viabilidad contra *S. mutans* en biopelículas

Para la obtención de las biopelículas, se realizaron cultivos monomicrobianos a partir de la cepa *S. mutans* ATCC UA159, usando el sistema comercial MBEC™ 19131, con algunas modificaciones, de acuerdo al protocolo descrito por Tofiño-Rivera et al. (2016) (Tofiño-Rivera et al., 2016a).

Inicialmente se reactivó la cepa mediante cultivo en placas de agar BHI a 37°C con CO₂ 5 % durante 48 horas, posteriormente se inocularon las colonias en 5 mL de caldo BHI durante 8 horas para tener un cultivo en fase exponencial con un recuento promedio de 1×10^{10} UFC/mL. Seguidamente, a partir de este cultivo, se realizó un inóculo correspondiente al patrón 1,0 de la escala McFarland, equivalente a 3×10^8 UFC por mL. Se tomó 1 mL de ésta y se diluyó en caldo BHI para obtener una dilución 1:30; se verificó el control del inóculo mediante diluciones seriales de 10^{-1} a 10^{-8} sembradas en placas de agar BHI para establecer el recuento inicial de UFC/mL. Posteriormente el sistema se inoculó con la dilución 1:30 y se cultivó en una mesa de agitación por balanceo a 110 bpm y 37°C por 48 h, en atmósfera controlada con 5 % de CO₂, reemplazando el medio de cultivo por medio fresco a las 24 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las biopelículas formadas en las clavijas de la tapa del aditamento MBEC™ se lavaron con solución salina al 0,9 % durante 2 min con el fin de remover aquellas células bacterianas débilmente adheridas; se realizó control de crecimiento de biopelículas removiendo las clavijas B12, C12 y E12 de la tapa del aditamento MBEC™ con ayuda de una pinza mosquito. Estas clavijas se sumergieron en 200 µL

de solución neutralizante en un plato de microtitulación y se ubicaron en un sonicador (MIDMARK Soniclean modelo M 150) a 42 kHz durante 30 minutos, luego de lo cual se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-8} que se sembraron en placas de agar BHI, para el recuento de UFC/mL. Para el control del cultivo planctónico se tomaron 20 μ L para la realización de diluciones seriadas, igual que en el control de biopelículas. Con ayuda de una pinza mosquito se removieron las clavijas A12, D12 y F12 y se les realizó tinción con cristal violeta al 0,5 % y microscopía electrónica de barrido mediante la metodología descrita el numeral 2.2 y 2.3 de la metodología para verificar el crecimiento de biopelículas.

Las pruebas de susceptibilidad se realizaron en un plato de microtitulación (rotulado como plato reto) (Nunc Delta Surface; Nunc, Roskilde, Denmark) que contenía las diferentes concentraciones de las sustancias objeto de evaluación y sus respectivos controles. Para el aceite esencial de *C. citratus* y los componentes citral y mirceno se evaluaron concentraciones de 1 μ g/mL; 0,1 μ g/mL y 0,01 μ g/mL diluidas en etanol al 1 % y se utilizó clorhexidina al 0,5 % como control positivo. Los controles de crecimiento, etanol 1 % y crecimiento en solución neutralizante se ubicaron en la columna 1 y el control de esterilidad en la columna 12. La tapa con las clavijas fue sumergida en el plato reto e incubada durante 5 minutos a 37°C con CO₂ y agitación por balanceo a 110 bpm, transcurrido este tiempo, las biopelículas se llevaron a otro plato de microtitulación (plato de recuperación), el cual contenía 180 μ L de solución neutralizante de acuerdo a las indicaciones del manual de Innovotech (Innovotech, 2015) en cada pozo. Allí, se dejó reposar durante 30 minutos y luego se llevó a sonicación durante 30 min a 42 kHz para desprender las biopelículas. Sobre los productos de la sonicación se evaluó la viabilidad celular mediante la técnica de siembra de spot.

3.1 Técnica en spot: 80 μ L tomados del plato de recuperación se depositaron en la columna A1-A12 de un plato de microtitulación para realizar diluciones seriadas de 10^{-0} a 10^{-7} con caldo BHI y sembradas alícuotas de 10 μ L en cajas de agar BHI. Los datos obtenidos del recuento de UFC/mL se analizaron en el programa Microsoft Excel® y paquete estadístico IBM SPSS® versión 22. Para calcular el porcentaje de células muertas mediante la técnica spot se aplicó la fórmula: $[1 - (\text{Mean CFU}_{\text{irrigant}} / \text{Mean CFU}_{\text{initial bacterial number}})] \times 100\%$ y el logaritmo de reducción se calculó mediante la fórmula: $\text{Log Reducción} = \text{Promedio Log Controles sin tratamiento} - \text{Promedio Log}$

Pegs con tratamiento. Para determinar si se presenta diferencia significativa entre las sustancias y con respecto a clorhexidina, se aplicó la prueba estadística Kruskal Wallis, considerando una diferencia estadísticamente significativa si $p < 0,05$. Todos los ensayos fueron realizados con 7 réplicas y 3 repeticiones.

4. Evaluación de la viabilidad de células eucariotas por reducción de bromuro de 3-(4.5-dimetiltiazol-2-ilo)-2.5-difeniltetrazol (MTT)

Se realizó el ensayo de acuerdo al método desarrollado por Mosmann, (1983) (Mosmann, 1983) modificado por Denizot & Lang (1986) (Denizot & Land, 1986) y las indicaciones de la norma ISO 10993-5-2009 (ISO, 2009) con células HaCaT (queratinocitos humanos no transformados) y fibroblastos humanos (piel de paciente sano). Los cultivos celulares fueron gentilmente donados por el grupo de ingeniería de tejidos y terapias celulares (GITTC)-Universidad de Antioquia.

4.1 Cultivos celulares

Las células HaCaT se cultivaron en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium. Sigma-Aldrich Chemical. St Louis, MO, USA) suplementado con suero bovino fetal (SBF. Gibco, Grand Island, NY, USA) al 5 %, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de penicilina y estreptomicina (Gibco, Grand Island, NY, USA), incubadas a 37°C en atmósfera húmeda y CO_2 al 5 %. Por su parte, los cultivos primarios de fibroblastos humanos (piel de paciente sano) se mantuvieron en DMEM suplementado con SBF al 10 %, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de penicilina y estreptomicina, incubadas a 37°C en atmósfera húmeda y CO_2 al 5 %.

4.2 Ensayo MTT

Las células fueron sembradas en platos de microtitulación, a una densidad de 1×10^4 células/pozo para HaCaT y 5×10^4 células/pozo para fibroblastos, y mantenidas bajo condiciones normales de cultivo. Después de permitir la adhesión, se realizaron tratamientos por triplicado con las soluciones 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de un aceite esencial de *C. citratus* y los componentes citral y mirceno, utilizando H_2O_2 0,5 mM como control de muerte celular (control negativo) y etanol 1% como control positivo (vehículo). Luego de 24 h de exposición, se adicionaron 10 μL de MTT (Sigma-Aldrich Chemical. St Louis, MO, USA) a 5 mg/mL (concentración final en el

pozo de 0,5 mg/mL), seguidos por 4 h de incubación en la oscuridad. Finalmente, para disolver los cristales de formazan, se añadieron 100 μ L de isopropanol-HCl 0,04 M (Merck KGaA. Darmstadt Alemania) y se midió la absorbancia a 571 nm en un lector de ELISA (Multiskan FC – Thermo Scientific). La viabilidad se expresó en porcentaje respecto al control negativo. El análisis estadístico se realizó en el programa estadístico IBM SPSS® versión 22, mediante el test ANOVA de una vía con una examinación post-hoc con la prueba Dunnet. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa si $p < 0,05$. Todos los ensayos fueron por triplicado.

Resumen de análisis estadístico

- ✓ Statistical Package for the Social Sciences IBM (SPSS®) versión 22.0
- ✓ Prueba de normalidad: Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk ($p > 0,05$)
- ✓ Prueba de homogeneidad de varianzas: Levene ($p > 0,05$)
- ✓ Comparación intra-grupo. Diferencia significativa ($p < 0,05$)
 - Prueba paramétrica: Anova de una vía
 - Prueba no paramétrica: Kruskal-Wallis
- ✓ Comparaciones múltiples de las medias contra un control (post hoc): Dunnet

Resultados

1. Análisis fitoquímico

Los principales componentes del aceite esencial de *C. citratus* fueron citral (58 %) y mircenol (15,6 %). Por lo tanto, estos fueron los componentes seleccionados para los análisis posteriores. El perfil químico completo del aceite esencial utilizado fue publicado con anterioridad por este mismo grupo de investigación (Tofiño-Rivera et al., 2016a).

2. Curvas de crecimiento de *S. mutans* en cultivos planctónicos y en biopelículas

Las células de *S. mutans* UA159 dispuestas en cultivos planctónicos iniciaron su fase exponencial de crecimiento luego de una fase de adaptación de 3 h (DO 0,046 nm y 3×10^7 UFC/mL), alcanzando la fase estacionaria a las 9 h (DO 1,006 y 4×10^{10} UFC/mL) de incubación (gráfica 1).

Mediante la tinción con cristal violeta se realizó un control visual del crecimiento de la biopelícula, identificando un relieve en la clavija a partir de las 24 h, que se fue engrosando a medida que transcurrió el tiempo de incubación. Luego, mediante SEM se

observó la morfología característica de *S. mutans* y la formación de polisacáridos típicos de la biopelícula, cuya disposición era más estructurada a partir de las 48 h (figura 1). Las biopelículas cultivadas en caldo BHI, presentaron mayor recuento de UFC/mL comparado con el uso de este mismo medio adicionado con 0,2 U de bacitracina y con sacarosa al 5 y 10 % (gráfica 2).

3. Determinación del efecto sobre la viabilidad contra *S. mutans* en biopelículas

Se verificó el crecimiento de la biopelícula mediante la técnica con cristal violeta y SEM. La clorhexidina (usada como control de muerte) inhibió el 100 % del crecimiento de las biopelículas; por el contrario, el control del vehículo (etanol al 1 %) no afectó el crecimiento microbiano, mientras que el control de crecimiento de la biopelícula con solución neutralizante presentó crecimiento con relación al inóculo inicial (8×10^6 UFC/mL).

El aceite esencial de *C. citratus* y los componentes citral y mirceno presentaron los mayores porcentajes de mortalidad a la concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ (93,52 %, 96,09 %, 91,24 % respectivamente). El efecto decreció a medida que se disminuye la concentración (tabla 1). De acuerdo al análisis estadístico con la prueba Kruskal – Wallis, los tratamientos no presentaron diferencias significativas entre ellos ($p = 0,393$) ni frente a clorhexidina ($p = 0,06$).

4. Viabilidad celular mediante ensayo MTT

La prueba de MTT en células HaCaT y en fibroblastos (gráfica 3) evidencia que ninguna de las concentraciones evaluadas para el aceite esencial de *C. citratus* y los componentes citral y mirceno presenta toxicidad sobre las células expuestas a tratamiento durante 24 h, con diferencias significativas en relación con el control de muerte H_2O_2 0,5 mM ($p < 0,0005$), que presenta citotoxicidad sobre las células evaluadas. Los tratamientos no presentan diferencias significativas con el control positivo (vehículo etanol 1 %, $p > 0,05$).

Discusión

Las plantas aromáticas y sus derivados, especialmente los aceites esenciales, constituyen objeto de interés para la comunidad científica debido a la amplia variedad química (Lang & Buchbauer, 2012; Cos et al., 2006) y las propiedades biológicas que

poseen (Butler, 2008). Actualmente, la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *C. citratus* ha sido confirmada sobre hongos (Almeida et al., 2013; Tofiño-Rivera et al., 2016b; Tofiño-Rivera et al., 2016c), bacterias (Aiemsaard et al., 2011) y parásitos (Kpoviessi et al., 2014). Además, con el creciente interés de introducir el uso de estos productos en el cuidado de la salud bucal, se ha demostrado su efecto antimicrobiano sobre células planctónicas de *S. mutans* (Vargas et al., 2010; Chaudhari et al., 2012; Almeida et al., 2013; Fazeelath Banu & Geetha, 2015). Sin embargo teniendo en cuenta que los microorganismos dentro de la cavidad bucal se establecen en forma de biopelículas (Kolenbrander, 2000; Lemos et al., 2005) y que entre estas estructuras y las células planctónicas se presentan características ambientales, propiedades fisiológicas y expresión genética diferentes (Lemos et al., 2005; Shemesh et al., 2007), ha sido necesario direccionar investigaciones para evaluar el efecto del aceite esencial de *C. citratus* sobre la viabilidad de biopelículas en modelos de microorganismos cariogénicos como *S. mutans*.

La composición química del aceite esencial de la planta *C. citratus* cultivada en el resguardo indígena Kankuamo en Ataquez, Cesar, caracterizado con anterioridad por este grupo de investigación presenta como principales componentes citral (58 %) y mirceno (15,6 %), clasificando esta planta dentro del quimiotipo citral (Tofiño-Rivera et al., 2016a). Resultados similares han sido obtenidos por otros grupos que han identificado los componentes citral (46,97 %) y mirceno (27,83 %) (Gbenou et al., 2013) o citral (75 %) y β -pineno (10,1 %) (Kpoviessi et al., 2014) utilizando el mismo método de extracción (destilación por vapor), pudiéndose atribuir esta divergencia al estado de madurez de las hojas colectadas y el tiempo de destilación aplicado para obtener la fitoquímica (Durán et al., 2007).

El ensayo de evaluación del efecto de la viabilidad celular en biopelículas mediante la técnica MBEC demostró que el aceite esencial de *C. citratus* y los componentes citral y mirceno a concentraciones de 1; 0,1 y 0,01 $\mu\text{g/mL}$ presentan efecto contra la viabilidad de *S. mutan* ATCC UA159 en biopelículas que fueron cultivadas durante 48 h (mortalidad entre 74,53 y 96,09 %) sin diferencias significativas frente a clorhexidina ($p = 0,06$), por lo cual interpretamos positivamente ya que la clorhexidina es un eficaz agente anti-placa y anti-gingivitis (Gunsolley, 2010); resultados similares a otros reportados previamente (Tofiño-Rivera et al., 2016a) para aceites esenciales de *C. citratus* a concentraciones de 0,1; 0,01 y 0,001 mg/100 mL, con las que se encontró

inhibición sobre biopelículas de 24 h (mortalidad entre 93,1 y 95,4 %). Por otro lado, Almeida et al., también identificaron el efecto de inhibición del aceite esencial de *C. citratus* a concentración 0,5 % sobre biopelículas de *S. mutans* ATCC 35688 cultivadas en discos de acrílico dentro de una placa de microtitulación de 24 pozos durante 120 h (Almeida et al., 2013). Estos resultados determinaron la viabilidad celular mediante el recuento de UFC/mL obtenido mediante el método de microdilución.

Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que los componentes citral y mirceno también presentan actividad de inhibición de biopelículas de *S. mutans* ya sea mezclados con los demás componentes del aceite esencial o aisladamente, esto es identificado y atribuido, en estudios previos, al efecto antimicrobiano de fitoquímicos que interactúan con estructuras celulares bacterianas afectando su función (Saad et al., 2013). Algunos mecanismos de acción de los fitoquímicos sobre células microbianas consisten en afectar la integridad de las membranas celulares ya sea alterando la composición de ácidos grasos (Di Pasqua et al., 2006), las propiedades fisicoquímicas de la superficie como hidrofobicidad, conductividad eléctrica, filtración de proteínas solubles y azúcares reductores (Lopez-Romero et al., 2015; Li & Yu, 2015) y modificación de la actividad de los canales iónicos de calcio y potasio (Saad et al., 2013). También pueden causar daños irreversibles a las membranas citoplasmáticas conduciendo a la muerte del microorganismo debido a que el mantenimiento de la homeostasis de los iones es parte integrante del mantenimiento del estado energético de la célula, así como del transporte de los solutos, la regulación del metabolismo, el control de la presión de turgencia y la motilidad (Li & Yu, 2015). Siendo el daño a nivel de membrana (induciendo la pérdida de material absorbente) el mecanismo identificado por Saad et al. (2013) para el aceite esencial de *C. citratus* sobre *Escherichia coli* (Saad et al., 2013).

Se verificó el efecto citotóxico sobre células eucariotas, debido a que los tejidos cumplen funciones biológicas que mantienen la integridad de las mucosas y que no deben ser afectadas por sustancias exógenas (Newman et al., 2003; Gómez & Campos, 2006; Chiego., 2007). Los resultados obtenidos permiten identificar que el aceite esencial de *C. citratus* y los componentes citral y mirceno, no evidencian citotoxicidad sobre las células HaCaT ni sobre fibroblastos humanos (gráfica 3) en un tratamiento de 24 h; resultados similares a los reportados por otros autores, usando células HaCaT y concentraciones entre 25 y 100 $\mu\text{L/mL}$ del aceite esencial (Koba et al., 2009). Correa-

Royero et al. (2010) tampoco identificaron citotoxicidad sobre células Vero a concentraciones inferiores a 200 µg/mL (Correa-Royero et al., 2010) y Tofiño-Rivera et al. (2016) usando células CHO a concentraciones de 0,001, 0,01 y 0,1 mg/100 mL (Tofiño-Rivera et al., 2016a), mientras que Vargas et al. (2010) evidenciaron una leve citotoxicidad sobre odontoblastoides a una concentración de 0,1 % durante 120 minutos, resultado que puede ser atribuido a la concentración utilizada ya que es superior a la de estudios anteriores (Vargas et al., 2010). Kpoviessi et al. (2014) identificaron toxicidad sobre células CHO y fibroblastos humanos no cancerígenos con un IC50 = 10,63 y 39,77 µg/mL respectivamente (Kpoviessi et al., 2014), posiblemente por la diferente composición química del aceite esencial utilizado (citral y β-pineno), ligado a su obtención en época de altas temperaturas. El material vegetal utilizado para la obtención del aceite esencial evaluado por Tofiño-Rivera et al. (2016a) fue colectado en época lluviosa (Tofiño-Rivera et al., 2016a) igual que el utilizado en el presente estudio, haciendo evidente que la composición química puede influir el efecto citotóxico de los fitoquímicos y estos a su vez están determinados por factores ambientales y estado fisiológico del material vegetal cosechado (Durán et al., 2007; Gbenou et al., 2013).

Es importante tener en cuenta que los resultados de citotoxicidad reportados en la presente investigación se obtuvieron a partir de células expuestas a los tratamientos durante 24 h para identificar efectos residuales de las sustancias evaluadas, debido a que la exposición prolongada puede generar efectos sub letales o letales sobre los tejidos. Sin embargo, en condiciones normales el tiempo recomendado para el uso de enjuagues bucales es de periodos inferiores a 2 min (Duckworth, 2013), razón por la cual, los resultados positivos sobre el control de biopelículas de *S. mutans* y la interacción amigable con células eucariotas del aceite esencial de *C. citratus* y los componentes citral y mircenol son un dato representativo que argumenta la seguridad de las sustancias y respalda la formulación de un producto que incluya en su formulación aceites esenciales de *C. citratus* para contribuir al control selectivo de poblaciones microbianas de la placa dental y procurando el mantenimiento de la microbiota bucal que desempeña funciones benéficas para el hospedador (Marsh & Martin, 2011).

Es deseable que un producto para uso en salud bucal sea de bajo costo debido a que datos epidemiológicos indican que la caries dental afecta a la población en general, pero impacta mayormente sobre los niveles socioeconómicos bajos y niños (Bagramian et al., 2009; Aida et al., 2017).

Se recomienda fortalecer los datos obtenidos en este estudio, mediante el uso de modelos experimentales que permitan un mayor acercamiento a su posible efecto terapéutico in vivo, según las condiciones de la cavidad bucal y regirse por el decreto número 2266 de 2004 de la normativa colombiana para la formulación de productos naturales (MPS, 2004) teniendo en cuenta que *C. citratus* se encuentra incluida en el listado de plantas medicinales aceptadas con fines terapéuticos de uso medicinal y su condición de venta es libre (Invima, 2016).

Conclusión

El aceite esencial *C. citratus* y los componentes citral y mirceno presentaron actividad de inhibición sobre biopelículas de *S. mutans* a las concentraciones 1, 0,1 y 0,01 µg/mL con mortalidad entre 74,53 % y 96,09 % y no evidenciaron citotoxicidad sobre células HaCaT y fibroblastos en un tratamiento de 24 h; aportes importantes que agregan valor a la expectativa de bioprospección de estos productos como agentes profilácticos en la cavidad bucal.

Perspectivas

- ✓ Se pretende continuar evaluando el efecto del aceite esencial de *C. citratus* en cuanto a su efecto inhibitorio sobre otros microorganismos relevantes en la ecología de la cavidad bucal.
- ✓ Iniciar la identificación de su mecanismo de acción.
- ✓ Generar prototipos de productos en los que sea utilizado el aceite esencial de *C. citratus* como agente activo.
- ✓ Evaluar clínicamente el efecto de estos prototipos en cuanto a su potencial efecto sobre la reducción de placa bacteriana.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Sandra Milena Morales Uchima (microbióloga) y al equipo de trabajo del Laboratorio de Microbiología e Histopatología Oral de la Facultad de Odontología, Universidad de Antioquia, por su apoyo durante el proceso experimental; a Jorge Humberto Botero Garcés, profesor departamento de Microbiología y

Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, por su apoyo con el análisis estadístico de los datos, al comité tutorial, la asociación Kankuamo ASOPROKAN, COLCIENCIAS proyecto: “Restauración de suelos degradados por la minería empleando estrategias de rizorremediación basadas en el uso de especies aromáticas nativas que promuevan el desarrollo de las microeconomías regionales”, Contrato 1852 COLCIENCIAS-CORPOICA convocatoria 563 2014, capítulo Argentina; CORPOICA proyecto agenda interna: “Plantas Aromáticas Medicinales y Condimentarias una alternativa productiva para Colombia” convenio MADR-CORPOICA convenio TV15 resolución 000023 del 2015; al Dr Mario Zapata, director de Corpioica C.I Motilonia, Cesar y a los evaluadores.

Consideraciones éticas y conflictos de interés

El cumplimiento ético no se aplica para este estudio

Bibliografía

Aida, J., Matsuyama, Y., Takahiro, T., Komazaki, Y., Tsuboya, T., Kato, T., Osaka, K., & Fujiwara, T. (2017). Trajectory of social inequalities in the treatment of dental caries among preschool children in Japan. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 1-6.

Aiemsraad, J., Aiumlamai, S., Aromdee, C., Taweechaisupapong, S., & Khunkitti, W. (2011). The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745. *Research in Veterinary Science*, 91(3), e31-e37.

Almeida, R. B., Akisue, G., Cardoso, L. M. L., Junqueira, J. C., & Jorge, A. O. C. (2013). Antimicrobial activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. on *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus mutans* and *Candida spp.* *Revista Brasileira de Plantas Medicinai.*, 15(4), 474-482.

Aquino, C. F., Sales, N. de L. P., Soares, E. P. S., & Martins, E. R. (2012). Chemical characterization and action of essential oils in the management of anthracnose on passion fruits. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 34(4), 1059-1067.

- Bagramian, R. A., Garcia-Godoy, F., & Volpe, A. R. (2009). The global increase in dental caries. A pending public health crisis. *American Journal of Dentistry*, 21(1), 3-8.
- Banas, J. A. (2004). Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 9, 1267-1277.
- Bascones, A. S., & Morantes, S. (2006). Antisépticos orales. Revisión de la literatura y perspectiva actual. *Avances En Periodoncia*, 18(1), 31-59.
- Bernardes, W. A., Lucarini, R., Tozatti, M. G., Flauzino, L. G. B., Souza, M. G. M., Turatti, I. C. C., et al. (2010). Antibacterial activity of the essential oil from *Rosmarinus officinalis* and its major components against oral pathogens. *Zeitschrift Für Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, 65(9-10), 588-93.
- Blomqvist, M., Augustsson, M., Bertlin, C., Holmberg, K., Fernell, E., Dahllöf, G., & Ek, U. (2005). How do children with attention deficit hyperactivity disorder interact in a clinical dental examination? A video analysis. *Journal of Oral Science*, 113(3), 203-209.
- Bönecker, M., & Cleaton-Jones, P. (2003). Trends in dental caries in Latin American and Caribbean 5-6- and 11-13-year-old children: a systematic review. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 31(2), 152-157.
- Butler, M. S. (2008). Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. *Natural Product Reports*, 25(3), 475-516.
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P. W., Castillejos, L., & Ferret, A. (2007). Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 90, 2580-2595.
- Chiego., D. (2007). *Principios De Histología Y Hembriología Bucal Con Orientación Clínica*. (4ta ed.). España: Elsevier.
- Correa-Royero, J., Tangarife, V., Durán, C., Stashenko, E., & Mesa-Arango, A. (2010). In vitro antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(5), 734-741.
- Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. Vanden, & Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology*, 106(3), 290-302.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., & James, G. (1994). Biofilms, the customized microniche. *Journal of Bacteriology*, 176(8), 2137-2142.
- Chaudhari, L. K., Jawale, B. A., Sharma, S., Sharma, H., Kumar, C. M., & Kulkarni, P. A. (2012). Antimicrobial Activity of Commercially Available Essential Oils Against *Streptococcus mutans*. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 13, 71-74.
- de Araújo, D. B., Gonçalves, E. M. B., Martins, G. B., Lima, M. J. P., & Araújo, M. T. B. (2015). Saúde bucal: a importância dos enxaguatórios com antissépticos. *Revista de Ciências Médicas E Biológicas*, 14(1), 88-93.

- Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *Journal of Immunological Methods*, 89(2), 271-277.
- Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G., & Mauriello, G. (2006). Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(7), 2745-2749.
- Durán, D.C., Monsalve, L.A., Martínez, J.R., & Stashenko, E.E. (2007). Estudio comparativo de la composición química de aceites esenciales de *lippia alba* provenientes de diferentes regiones de Colombia, y efecto del tiempo de destilación sobre la composición del aceite. *Scientia et Technica Año XIII*, (33), 435—438.
- Duckworth, R. M. (2013). Pharmacokinetics in the Oral Cavity: Fluoride and Other Active Ingredients. In *Monographs in oral science*. Vol 23, 125-139.
- Fazeelath Banu, M. A., & Geetha, R. V. (2015). Evaluation of antimicrobial efficacy of essential oils on *Streptococcus mutans*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 33(1), 119-121.
- Fejerskov, O. (2004). Changing Paradigms in Concepts on Dental Caries: Consequences for Oral Health Care. *Caries Research*, 38(3), 182-191.
- Fuentes-Garcia, G., Cedillo-Ramírez, L., & Rivera-Tapia, J. (2009). Formación de biopelículas por micoplasmas de importancia médica. *Universitas Médica*, 50(1), 12-19.
- Gbenou, J. D., Ahounou, J. F., Akakpo, H. B., Laleye, A., Yayi, E., Gbaguidi, F., et al. (2013). Phytochemical composition of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils and their anti-inflammatory and analgesic properties on Wistar rats. *Molecular Biology Reports*, 40(2), 1127-1134.
- Ghassemi, A., Vorwerk, L., Hooper, W., Patel, V., Sharma, N., & Qaqish, J. (2013). Comparative plaque removal efficacy of a new children's powered toothbrush and a manual toothbrush. *Journal of Clinical Dentistry*, 24(1), 1-4.
- Giacaman, R. A., Muñoz-Sandoval, C., Bravo González, E., & Farfán-Cerda, P. (2013). Cuantificación de bacterias relacionadas con la caries dental en saliva de adultos y adultos mayores. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología Y Rehabilitación Oral*, 6(2), 71-74.
- Gift, H. C., Reisine, S. T., & Larach, D. C. (1992). The Social Effects of Dental Problems. *American Journal of Public Health*, 82(12), 1663-1668.
- Gómez, M., & Campos, A. (2006). *Histología, Embriología E Ingeniería Tisular Bucodental*. (3a ed.). México: Panamerica.
- Gunsolley, J. C. (2010). Clinical efficacy of antimicrobial mouthrinses. *Journal of Dentistry*, 38 Suppl 1:S6-10.
- Gupta, B., & Jain, N. (1978). Cultivation and utilization of Genus *Cymbopogon* in Indian. *Indian Perfumer*. 22(2):55-68

He, J., Zhu, X., Qi, Z., Wang, C., Mao, X., Zhu, C., et al. (2015). Killing dental pathogens using antibacterial graphene oxide. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(9), 5605-5611.

Hong, C. H. L., Napeñas, J. J., Hodgson, B. D., Stokman, M. A., Mathers-Stauffer, V., Elting, L. S., et al. (2010). A systematic review of dental disease in patients undergoing cancer therapy. *Supportive Care in Cancer*, 18(8), 1007-1021.

Innovotech. (2015). MBEC™ Assay For High-Throughput Antimicrobial Susceptibility Testing of Biofilms. <http://www.innovotech.ca/documents/MBEC-Procedural-Manual-v1.1.pdf> Acceso: julio/12/2016.

International Organization for Standardization. (2009). ISO 10993-5 Third edition. 2009-06-01. www.iso.org Acceso: julio/30/2016

Invima. (2016). Listado de Plantas Medicinales Aceptadas con Fines Terapéuticos 21-12-2016.

https://www.invima.gov.co/index.php?option=com_content&view=article&id=3259%3Adocumentos-tecnicos&catid=242%3Asala-especializada-de-productos-naturales&Itemid=587 Acceso: agosto/02/2017

Jackson, S. L., Vann, W. F., Kotch, J. B., Pahel, B. T., & Lee, J. Y. (2011). Impact of poor oral health on children's school attendance and performance. *American Journal of Public Health*, 101(10), 1900-1906.

James, P., Worthington, H. V., Parnell, C., Harding, M., Lamont, T., Cheung, A., et al. (2017). Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 3. Art. No.: CD008676.

Jensen, S. B., Pedersen, A. M. L., Vissink, A., Andersen, E., Brown, C. G., Davies, A. N., et al. (2010). A systematic review of salivary gland hypofunction and xerostomia induced by cancer therapies: Prevalence, severity and impact on quality of life. *Supportive Care in Cancer*, 18(8), 1039-1060.

Jha, S. K., Mishra, V. K., Sharma, D. K., & Damodaran, T. (2011). Fluoride in the environment and its metabolism in humans. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 211:121-142

Jhajharia, K., Parolia, A., Shetty, V. K., Mehta, L. K. (2015). Biofilm in endodontics : A review. *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry*, 5(1), 1-12.

Kalesinskas, P., Kačergius, T., Ambrozaitis, A., Pečiulienė, V., & Ericson, D. (2014). Reducing dental plaque formation and caries development. A review of current methods and implications for novel pharmaceuticals. *Stomatologija Baltic Dental and Maxillofacial Journal*, 16(2), 44-52.

Koba, K., Sanda, K., Guyon, C., Raynaud, C., Chaumont, J-P., & Nicod, L. (2009). In vitro cytotoxic activity of *Cymbopogon citratus* L. and *Cymbopogon nardus* L. essential oils from Togo. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 4(1), 29-34.

- Kolenbrander, P. E. (2000). Oral Microbial Communities: Biofilms, Interactions, and Genetic Systems. *Annual Review of Microbiology*, 54, 413-437.
- Kpoviessi, S., Bero, J., Agbani, P., Gbaguidi, F., Kpadonou-Kpoviessi, B., Sinsin, B., et al. (2014). Chemical composition, cytotoxicity and in vitro antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(1), 652-659.
- Lang, G., & Buchbauer, G. (2012). A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 27(1), 13-39.
- Lemos, J. A., Abranches, J., & Burne, R. A. (2005). Responses of Cariogenic Streptococci to Environmental Stresses. *Current Issues in Molecular Biology*, 7(1), 95-108.
- Lemos, J. A., & Burne, R. A. (2008). A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiology*, 154(Pt 11), 3247-3255.
- Leung, K. C., McMillan, A. S., Leung, W. K., Wong, M. C., Lau, C. S., & Mok, T. M. (2004). Oral health condition and saliva flow in southern Chinese with Sjögren's syndrome. *International Dental Journal*, 54(3), 159-165.
- Li, C-M., & Yu, J-P. (2015). Chemical Composition, Antimicrobial Activity and Mechanism of Action of Essential Oil from the Leaves of *Macleaya Cordata* (Willd.) R. Br. *Journal of Food Safety*, 35(2), 227-236.
- Liébana, J. (2002). *Microbiología oral*. (2a ed.). Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- Löe, H. (2000). Oral hygiene in the prevention of caries and periodontal disease. *International Dental Journal*, 50(3), 129-139.
- Loesche, W. J. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiological Reviews*, 50(4), 353-380.
- Lopez-Romero, J. C., González-Ríos, H., Borges, A., & Simões, M. (2015). Antibacterial Effects and Mode of Action of Selected Essential Oils Components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2015, Article ID 795435, 9 pages.
- Lowe, O., & Lindemann, R. (1985). Assessment of the autistic patient's dental needs and ability to undergo dental examination. *Journal of Dentistry for Children*, 52(1), 29-35.
- Maeda, H., Hirai, K., Mineshiba, J., Yamamoto, T., Kokeyuchi, S., & Takashiba, S. (2013). Medical microbiological approach to Archaea in oral infectious diseases. *Japanese Dental Science Review*, 49(2), 72-78.
- Marsh, P. D. (2005). Dental plaque: Biological significance of a biofilm and community life-style. *Journal of Clinical Periodontology*, 32 Suppl 6:7-15.
- Marsh, P. D., Head, D. A., & Devine, D. A. (2015). Ecological approaches to oral biofilms: Control without killing. *Caries Research*, 49 suppl 1, 46-54.

Mavragani, C. P., & Moutsopoulos, H. M. (2010). The geoepidemiology of Sjögren's syndrome. *Autoimmunity Reviews*, 9(5), A305-A310.

Ministerio de la protección social. (2004). Decreto número 2266 de 2004. http://biblioteca.saludcapital.gov.co/img_upload/03d591f205ab80e521292987c313699c/decreto_2266_2004.pdf Acceso: agosto/02/2017.

Ministerio Nacional de Salud y Protección Social. (2014). IV estudio nacional de salud bucal (ENSAB). Bogotá. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ENSAB-IV-Situacion-Bucal-Actual.pdf> Acceso: mayo/24/2016

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.

Moye, Z. D., Zeng, L., & Burne, R. A. (2014). Fueling the caries process: Carbohydrate metabolism and gene regulation by *Streptococcus mutans*. *Journal of Oral Microbiology*, 6: 10.3402/jom.v6.24878.

Negrelle RRB & Gomes EC. (2007). *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: chemical composition and biological activities. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 9(1), 80-92.

Newman, M., Takei, H., Klokkevold, P., & Carranza, F. (2003). *Periodontología Clínica*. (10a ed.). México: McGraw-Hill.

Organización mundial de la salud (OMS). (2012). Salud bucodental: Nota informativa N°318. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/> Acceso: mayo/24/2016.

Petersen, P. E., Bourgeois, D., Ogawa, H., Estupinan-Day, S., & Ndiaye, C. (2005). Policy and Practice The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bulletin of the World Health Organization*, 83(9), 661-669.

Pfister, D. G., Spencer, S., Brizel, D. M., Burtness, B., Busse, P. M., Caudell, J. J., et al. (2015). Head and Neck Cancers, Version 1.2015. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 13(7), 847-55.

Rodrigues, J. A., Lussi, A., Seemann, R., & Neuhaus, K. W. (2011). Prevention of crown and root caries in adults. *Periodontology 2000*, 55(1), 231-249.

Saad, N. Y., Muller, C. D., & Lobstein, A. (2013). Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal*, 28(5), 269-279.

Segura, L. B., Cevallos, J. C., & Montes, C. E. (2014). Crecimiento bacteriano de *Streptococcus mutans* frente a la cetirizina y prednisona con y sin sacarosa: estudio in vitro. *Revista Estomatológica Herediana*, 24(2), 82-90.

Shemesh, M., Tam, A., & Steinberg, D. (2007). Expression of biofilm-associated genes of *Streptococcus mutans* in response to glucose and sucrose. *Journal of Medical Microbiology*, 56(pt11), 1528-1535.

Lopes da Silva, M. A., Marques, G. S., dos Santos, T. M. F., Xavier, H. S., Higinio, J. S., & de Melo, A. F. M (2010). Avaliação da composição química de *Cymbopogon citratus* Stapf cultivado em ambientes com diferentes níveis de poluição e a influência na composição do chá. *Acta Scientiarum. Health Science*, 32(1), 67-72.

Tofiño-Rivera, A; Ortega-Cuadros, M; Galvis-Pareja, D., Jimenez-Rios, H; Merini, L. J., & Martínez-Pabón, M. C. (2016a). Effect of *Lippia alba* and *Cymbopogon citratus* essential oils on biofilms of *Streptococcus mutans* and cytotoxicity in CHO cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 194, 749-754.

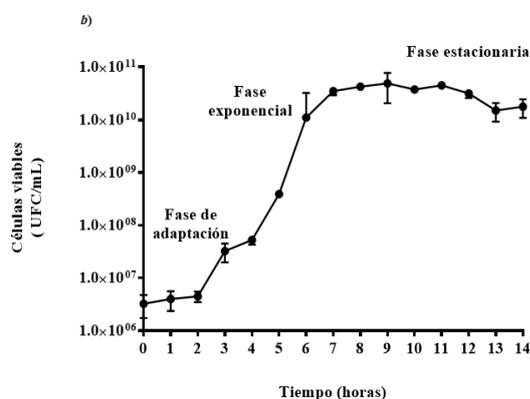
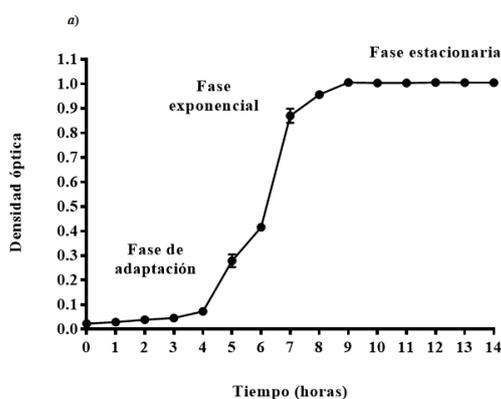
Tofiño-Rivera, A., Chinchilla-Sánchez, K., & Ortega-Cuadros, M. (2016b). Evaluación in vitro de compatibilidad de agroquímicos, bioinsumos y aceite esencial sobre el control de *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de ají. *Vitae*, 23, 478-482.

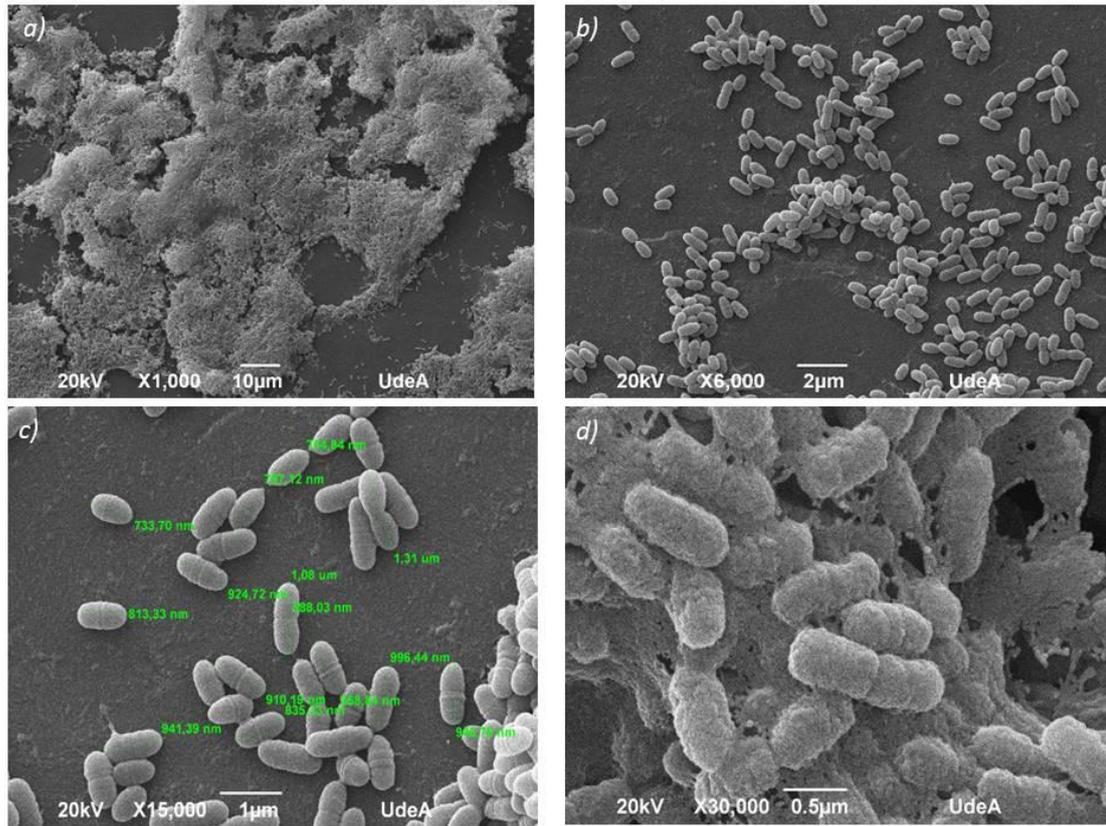
Tofiño-Rivera, A., Royero-López, L., & Ortega-Cuadros, M. (2016c). Bioinsumos y aceite esencial en el control de *Macrophomina phaseolina* aislado de fríjol. *Vitae*, 23, 473-477.

Twetman, S. (2004). Antimicrobials in future caries control? A review with special reference to chlorhexidine treatment. *Caries Research*, 38(3), 223-229.

Vargas, F. S., Oliveira, C. F., Giro, E. M. A., Sacramento, L. V. S., Spolidorio, D. M. P., & Costa, C. A. S. (2010). Efeito antimicrobiano e citotóxico do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* sobre células odontoblastóides. *Revista Odontológica Do Brasil Central*, 19(49), 101-107.

Varoni, E, Tarce, M, Lodi, G, & Carrassi, A. (2012). Chlorhexidine (CHX) in dentistry: state of the art. *Minerva Stomatologica*, 61(9), 399-419.



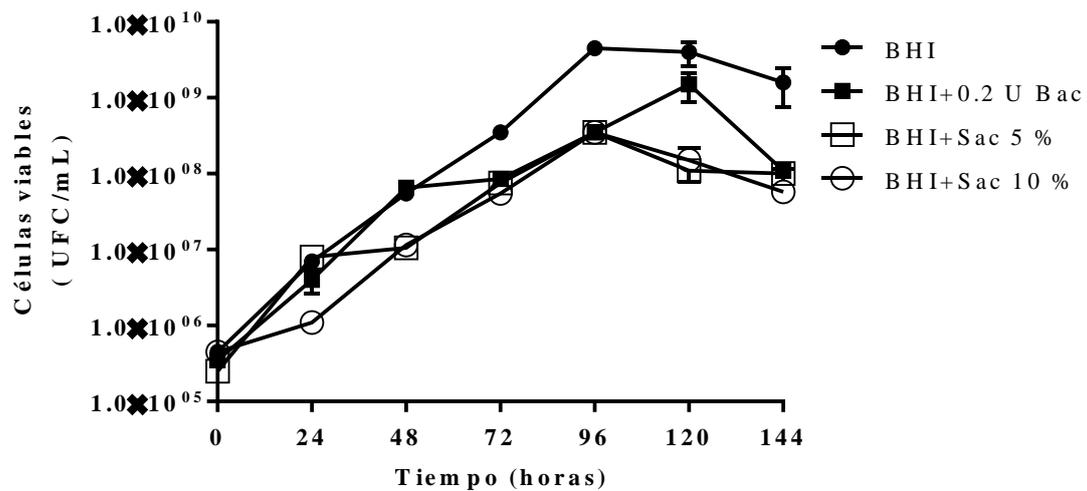


Gráfica 1. Curva de crecimiento de *S. mutans* UA159 en cultivos planctónicos

El panel a) muestra las DO correspondientes a la curva de crecimiento de *S. mutans* UA159. El panel b) presenta los recuentos de UFC/mL de la curva de crecimiento de *S. mutans*. Datos expresados como media \pm DS de 14 puntos de lectura y $n = 4$.

Figura 1. Aspecto microscópico de biopelículas de *S. mutans* con 48 h de formación sobre clavijas del aditamento MBEC con agar BHI como sustrato.

Panel a) x1.000. Se observa la biopelícula cubriendo parte de la superficie de la clavija; panel b) x6.000. Se observa morfología típica de *S. mutans*; panel c) x15.000. Se observan las medidas de las células y la morfología típica de *S. mutans*; panel d) x30.000 se aprecia la presencia de abundante material extracelular que ayuda a estructurar la biopelícula.

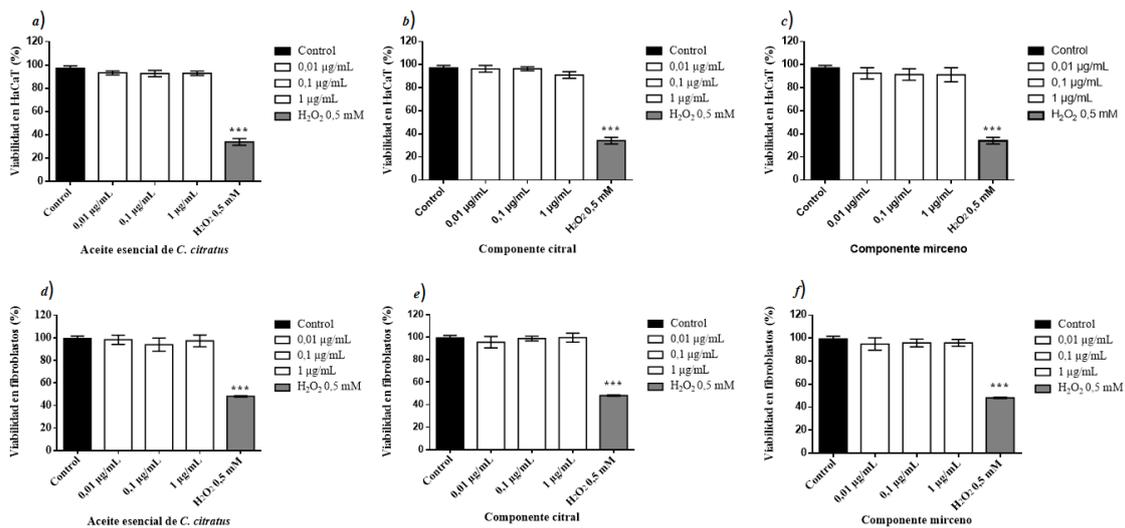


Gráfica 2. Curvas de crecimiento de biopelículas de *S. mutans* UA159

BHI: caldo infusión cerebro corazón; Bac: bacitracina; Sac: sacarosa. Se observa que las biopelículas de *S. mutans* crecidas con caldo BHI presentan mayor recuento en comparación con las biopelículas cultivadas en caldo BHI suplementado con 0,2 U bacitracina, sacarosa al 5 y 10%. Datos expresados como media \pm DS, n=2.

Tabla 1: Evaluación de la inhibición de biopelículas de *S. mutans* de *C. citratus*, citral y mirceno mediante la técnica en spot

Sustancias evaluadas	Concentración	Recuento UFC/mL	% Mortalidad	Log de Mortalidad
<i>C. citratus</i>	1 µg/mL	5x10 ⁵	93,52	1,19
	0,1 µg/mL	1x10 ⁶	87,27	0,90
	0,01 µg/mL	2x10 ⁶	74,53	0,59
Citral	1 µg/mL	3x10 ⁵	96,09	1,41
	0,1 µg/mL	7x10 ⁵	90,28	1,01
	0,01 µg/mL	8x10 ⁵	89,12	0,96
Mirceno	1 µg/mL	7x10 ⁵	91,24	1,06
	0,1 µg/mL	8x10 ⁵	88,98	0,96
	0,01 µg/mL	9x10 ⁵	88,52	0,94
Clorhexidina	0,5 %	0x10 ⁰	100	--
Control neutralizante	--	2x10 ⁷	0	--
Control de vehículo (Etanol)	1%	4x10 ⁷	0	--



Gráfica 3. Citotoxicidad en células HaCaT y fibroblastos del aceite esencial de *C. citratus* y sus componentes citral y mirceno.

Efecto citotóxico de las tres concentraciones evaluadas de cada tratamiento en relación al control positivo (H₂O₂). Panel a) Aceite esencial *C. citratus* sobre células HaCaT. Panel b) Componente citral sobre células HaCaT. Panel c) Componente mirceno sobre células HaCaT. Panel d) Aceite esencial *C. citratus* sobre fibroblastos. Panel e) Componente citral sobre fibroblastos f) Componente mirceno sobre fibroblastos. Datos expresados como media ± DS, n = 3. *** = p < 0,0005.