

Trabajo científico

Neolignanos de *Krameria ramosissima* (A. Gray) S. Watson con actividad contra *Porphyromonas gingivalis*, evaluación citotóxica y mutagénica

Neolignans from *Krameria ramosissima* (A. Gray) S. Watson with activity against *Porphyromonas gingivalis*, cytotoxic and mutagenic evaluations

Laura E. Villarreal-García,¹ Azucena Oranday-Cárdenas,¹ Myriam A. de la Garza-Ramos,² Catalina Rivas-Morales,¹ M. Julia Verde-Star,¹ J. Alberto Gómez-Treviño,³ Víctor Torres-de la Cruz⁴

¹Departamento de Química, Laboratorio de Fitoquímica y Química Analítica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México

²Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, Laboratorio de Investigación Odontología Integral y Especialidades, Universidad Autónoma de Nuevo León, México

³Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México

⁴Laboratorio de Proteómica, Departamento de Genética Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México

Resumen

Porphyromonas gingivalis, es una de las bacterias asociadas a la enfermedad periodontal, y ha sido relacionada con lesiones coronarias, neumonía y preeclampsia. El propósito de este estudio fue evaluar el extracto metanólico de raíces de *Krameria ramosissima* contra *P. gingivalis* (ATCC 53978), determinar su actividad citotóxica en fibroblastos humanos (ATCC CRL-7222 Hs 274.T) y su potencial mutagénico mediante la prueba de Ames. Las concentraciones a evaluar fueron 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75 y 50 µg/mL, siendo la concentración mínima inhibitoria de 300 µg/mL. Mediante cromatografía en columna se obtuvieron 14 fracciones, de las cuales la 7 y la 9 presentaron mayor actividad ($P < 0.05$). Se identificaron por espectrometría de masas dos neolignanos en las fracciones 7 y 9 con pesos moleculares de 314 y 296 respectivamente. El extracto y las fracciones activas evaluadas a la concentración de 300 µg/mL fueron negativas en las pruebas de citotoxicidad y mutagenecidad.

Abstract

Porphyromonas gingivalis, is one of the bacteria associated with periodontal disease that has been related to coronary artery disease, pneumonia, and preeclampsia. The purpose of this study was to evaluate the methanol extract of roots of *Krameria ramosissima* against *P. gingivalis* (ATCC 53978), its cytotoxic activity in human fibroblasts (ATCC CRL-7222 274.T Hs) and its mutagenic potential using the Ames test. Assessed concentrations were 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75 and 50 µg/mL, with the minimum inhibitory concentration being of 300 µg/mL. By column chromatography were obtained 14 fractions of which the fractions 7 and 9 showed higher inhibitory activity ($P < 0.05$). By means of mass spectrometry we identified two neolignans in the fractions 7 and 9 with molecular weights of 314 and 296 respectively. The extract and the active fractions evaluated at the concentration of 300 µg/mL were negative in the mutagenicity and cytotoxicity tests.

Palabras clave: *Krameria ramosissima*, neolignanos, *Porphyromonas gingivalis*, citotoxicidad, mutagenecidad

Key words: *Krameria ramosissima*, neolignans, *Porphyromonas gingivalis*, cytotoxic, mutagenes

Correspondencia:

CD Laura Elena Villarreal García MSP
Laboratorio de Fitoquímica y Química Analítica
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Autónoma de Nuevo León
Pedro de Alba S/n Ciudad Universitaria, CP. 66450
San Nicolás de los Garza, Nuevo León
Tel (81)83294000 ext. 3161
e-mail: villarrealgarcia@gmail.com

Fecha de recepción: 20 de enero de 2014

Fecha de recepción modificaciones: 31 de julio de 2014

Fecha de aceptación: 8 de septiembre de 2014

Introducción

En las últimas décadas se ha incrementado el interés de la comunidad científica en el estudio de plantas medicinales debido a que son una fuente importante de principios activos, se calcula que el 30% de los fármacos empleados en los países industrializados se han sintetizado a partir de productos vegetales.^{1,2}

El término etnofarmacología se registra por primera vez en 1967 en el título del libro: "Ethnopharmacologic Search for Psychoactive Drugs", donde se mencionan los usos en la medicina tradicional de sustancias naturales con propiedades alucinógenas y explica cómo los productos naturales han sido el origen de fármacos con estas aplicaciones.³ Actualmente se considera que el concepto de etnofarmacología incluye la observación, identificación, descripción e investigación experimental de forma interdisciplinaria de los agentes biológicamente activos que han sido tradicionalmente empleados u observados por el hombre.⁴

Se reconoce que las raíces de *Krameria ramosissima* han sido utilizadas tradicionalmente como astringente y antibacteriano en enfermedades de la cavidad oral, especialmente en gingivitis y periodontitis,⁵ sin embargo la actividad antibacteriana de esta especie no ha sido documentada de manera específica. En Sudamérica se han utilizado para la elaboración de dentífricos especialmente las especies *K. lappacea* y *K. triandra*,⁶ comercialmente éste género ha sido utilizado para teñir lana y pieles con tonos rojo y café rojizo, así como para la manufactura de tintas y colorantes en vinos.⁷

La especie *Krameria ramosissima* (A. Gray) S. Watson, también conocida como calderona o ratania, es un arbusto generalmente menor a 60 cm, difusamente ramificado y rígido, algunas veces casi postrado, las flores aparecen de abril a mayo, solitarias, en pedúnculos axilares, de marrón a púrpura, alrededor de 1.2 cm de ancho o menos; con cinco sépalos, cinco pétalos desiguales, los tres superiores largos y de forma de garras, los inferiores más cortos, sésiles y carnosos; estambres: cuatro libres y 2 anteras. Su fruto pedunculado de 1.2 cm de longitud con pelillos densos, globoso u ovoide, densamente pubescente, rojo, con espinas no barbadadas, una semilla. Hojas alternas o fasciculadas en las axilas, simples, lineales o lanceoladas, agudas o acuminadas, de 0.2 a 0.6 cm de longitud, margen entero, densamente tormentoso, gris.^{5,6} Geográficamente se distribuye en el sur y oeste de Texas en EUA y en los estados de Tamaulipas, Coahuila y Nuevo León en México.^{6,7}

Algunos estudios reportan actividad de algunas variedades de éste género vegetal en tratamientos para vulvovaginitis (*K. triandra*),⁹ colitis (*K. triandra*),¹⁰ cáncer en intestino, estómago

y lengua (*K. cystisoides*, *K. ramosissima*)¹¹, actividad antioxidant y antiproliferativa (*K. erecta*)¹², y actividad antiinflamatoria (*K. pauciflora*)¹³. La actividad antibacteriana reportada ha sido para *K. lappacea*, con bacterias como *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.¹⁴

En el presente estudio, es de especial interés la evaluación antibacteriana sobre la bacteria anaerobia *Porphyromonas gingivalis* reconocida como una de las principales bacterias que lesionan los tejidos periodontales,^{15,16} además de ser relacionada con enfermedades sistémicas tales como inductora de lesiones coronarias,¹⁷ en neumonía,¹⁸ y preeclampsia.¹⁹

En cuanto a la identificación de compuestos dentro de los extractos del género *Krameria*, se han documentado neolignanos, los cuales son de interés biológico ya que algunos lignanos se asocian con actividad bactericida, fungicida y antitumoral.²⁰⁻²³

En cuanto a la viabilidad celular, se consideró importante complementar el perfil biológico de las sustancias a analizar ya que actualmente el agente antiséptico que mas se utiliza para el manejo y prevención de la enfermedad periodontal es la clorhexidina al 0.12% la cual ha sido reportada recientemente con actividad citotóxica²⁴⁻²⁶, lo cual nos obliga a considerar nuevas sustancias para este uso terapéutico, considerando así mismo su inocuidad en células. Los resultados encontrados hasta este momento respecto a *K. ramosissima* es análisis del extracto hidroalcohólico de la parte aérea de esta planta con línea celular de hepatoma humano (Huh7) donde se reporta como no citotóxico frente a las células.²⁷

El efecto mutagénico de *K. ramosissima* mediante la prueba de Ames no fue encontrado en la búsqueda bibliográfica como referente específico. Se reporta un trabajo de la evaluación de 20 plantas entre ellas *K. lappacea*, para la cual realizaron la prueba de mutagenecidad mediante el ensayo con *Escherichia coli* WP2 encontrando que no hay actividad mutagénica.²⁸

El reconocer la actividad *in vitro* con la bacteria de interés, así como el fraccionamiento del extracto de la raíz de *K. ramosissima* mediante cromatografía en columna para su evaluación específica e identificación de presencia de compuestos químicos, además de su análisis citotóxico y mutagénico, permitirán contribuir con el conocimiento de esta especie vegetal, considerando su viabilidad como agente antiinfeccioso de la cavidad oral.

Material y métodos

Material biológico

Se utilizó la cepa *P. gingivalis* (ATCC 53978) para la evaluación antibacteriana y la cepa *Salmonella typhimurium* TA100 requerida

para la prueba de mutagenecidad, ambas fueron proporcionadas por el cepario del Laboratorio de Investigación en Odontología Integral y Especialidades del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Nuevo León. La línea celular utilizada en la evaluación de citotoxicidad fue la ATCC CRL-7222 Hs 274.T correspondiente a fibroblastos humanos, la cual fue provista por el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas, de la misma Universidad.

Material vegetal

Las raíces de *K. ramosissima* se obtuvieron en el municipio de Cadereyta, Nuevo León, México en febrero de 2010. Una muestra de esta planta fue identificada, y se ha resguardado en el Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con el número de registro: 25525.

Preparación del material vegetal y obtención del extracto

El material vegetal fue lavado con agua destilada, las raíces cortadas en tramos pequeños de 1 a 2 cm de largo, y posteriormente sometidos a un horno a 40°C durante 48 h (Felisa® modelo FE-295V). Una vez secas, las muestras fueron trituradas por separado en un molino manual marca Victoria® y almacenadas en un recipiente seco.

Para la elaboración del extracto, se pesaron 300 g de raíces, se colocaron en un Soxhlet, por 18 h con 500 ml de metanol (CTR Scientific®). El extracto se concentró en un evaporador rotatorio a baja temperatura (40-45 °C) y presión reducida (Yamato®, modelo BM 100).²⁹ El extracto resultante fue pesado y envasado en viales de vidrio color ámbar y refrigerados a 4°C hasta su uso. Para calcular el rendimiento se dividió el peso del extracto obtenido entre el peso inicial del material vegetal y el resultado se multiplica por 100, obteniendo así el porcentaje de rendimiento.³⁰

Obtención de fracciones a través de cromatografía en columna

Del extracto metanólico resultante se utilizaron 4 g para incorporarse en una columna cromatográfica con 24.5 g de sílica gel G tipo 60. Se pasaron a través de la columna diferentes eluentes, el sistema inicial fue cloroformo, los subsecuentes consistieron en: cloroformo-metanol 9.5:0.5, cloro-formo-metanol 9:1, cloroformo-metanol 8.5:1.5, cloroformo-metanol 8:2, cloroformo-metanol 7:3, cloroformo-metanol 6:4, cloroformo-metanol 5:5, cloroformo-metanol 4:6, cloroformo-metanol 3:7 y finalmente metanol.

Las fracciones obtenidas fueron sometidas a un evaporador rotatorio a baja temperatura (45 °C) y presión reducida (Yamato®,

modelo BM 100) y agrupadas de acuerdo a su perfil cromatográfico en capa fina.³¹

Actividad antimicrobiana

Se utilizó el método de difusión en disco para evaluar la actividad antimicrobiana del extracto metanólico y las fracciones obtenidas a través de la columna cromatográfica (Tabla1).³² Para ello se utilizó la cepa de *P. gingivalis* ATCC 53978, la cual fue ajustada al tubo 5 de la escala de McFarland en (15 x 108 UFC/mL), se tomaron 100 µL de cada tubo con el crecimiento bacteriano y se depositó en cajas Petri con agar Mueller Hinton con 5% de sangre (BBL®), posteriormente se toman 10µL del extracto y las fracciones a probar, para impregnarse en papel filtro estéril de Whatman No.1 (Whatman® International LTD England). Se realizó por triplicado con las concentraciones 1000, 500 y 250 µg/mL, utilizando como solvente dimetil sulfóxido (DMSO, marca CTR® Scientific) al 5% con agua bidestilada estéril; como controles se utilizaron agua bidestilada estéril con DMSO al 5% como control negativo y Clorhexidina al 0.12% (Consepsis-Ultradent®) como control positivo.³³ El procedimiento fue realizado dentro de una cámara de anaerobiosis marca Plas Labs® modelo 830-ABC, como una mezcla anaerobia compuesta por 10/13 cmol/mol bióxido de carbono, 20/13 cmol/mol hidrógeno y balance con nitrógeno, por Praxair®.³⁴ Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h. La actividad antimicrobiana se determinó midiendo el diámetro de la zona de inhibición expresado en mm mediante un calibrador vernier (Che Cientific®).

Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se utilizó la técnica de microdilución en placa de 96 pozos.³⁵ Las concentraciones a evaluar fueron 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75, 50 µg/mL, también fueron incluidos muestras blanco con medio tiogliolato enriquecido con vitamina k y hemina (BD®), medio con inóculo y medio con controles antes mencionados (DMSO al 5% como control negativo y Clorhexidina al 0.12% como control positivo). Nuevamente mediante cámara de anaerobiosis fue depositado el inóculo ajustado a la escala 0.5 de McFarland (1.5 x 10⁸ UFC/mL). Los ensayos fueron realizados por triplicado. La placa fue incubada a 37°C durante 48 h. Después de este tiempo se midió la absorbancia OD600 mediante el espectrofotómetro modelo SmartSpec Plus® marca Bio-Rad®. La menor absorbancia entre las concentraciones probadas, después de restar la reconocida turbidez misma del extracto por su concentración evaluada se considera que es la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Citotoxicidad mediante la técnica de rojo neutro con fibroblastos

La línea celular de fibroblastos humanos ATCC CRL-7222 Hs

274.T fue cultivada a una temperatura de 37 °C, en una incubadora de humedad controlada con una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ (SHE L LAB® modelo TC2323).

Las células fueron cultivadas en el medio DMEM High Glucosa 1X (Gibco®) y se realizaron lavados con suero salino tamponado en fostatos (PBS, Gibco®); cada lavado fue realizado en una campana de flujo laminar clase II (marca LABCONCO®). manteniéndolas en incubación durante 24h antes del periodo de tratamiento, se tomaron 5 x 10⁵ células para cada prueba y fueron depositadas en placa de 24 pozos para leer su absorbancia a una longitud de onda de 560 nm utilizando un lector de placas marca Biorad® Modelo 550.

Se expusieron las sustancias a evaluar en este caso las fracciones resultantes con mayor actividad y el extracto metanólico en la concentración de 300 µg/mL por 24 h, los controles fueron DMSO al 5% (CTR Scientific®) y Clorhexidina al 0.12% (Consepsis-Ultradent®) luego se agregaron 100 µL de rojo neutro, se elimina mediante lavado con PBS el colorante no incorporado y luego se midió la absorbancia nuevamente en el lector de placas.³⁶

Mutagenecidad mediante la prueba de Ames

Se activó la cepa de referencia *Salmonella typhimurium* TA100 contenida en el Kit Muta-Chromo Plate® con el medio de crecimiento incluido en el sistema del kit; se incubó a 37°C por 18 h. Las fracciones resultantes con mayor actividad antibacteriana y el extracto metanólico se evaluaron en una concentración de 300 µg/mL, se utilizó una cantidad de 100mL la cual fue disuelta con 0.5 mL de DMSO y agua destilada estéril hasta llegar a un volumen de 17.5 mL; posteriormente se filtraron por una membrana de 0.22 µm para su esterilización en frío. El mutágeno estándar contenido en el sistema fue el NaN₃ a una concentración de 0.5µg /100 µL. Se utilizaron placas de 96 pozos considerando una placa blanco (prueba de esterilidad), una placa como control negativo, una para control positivo donde se utilizó azida de sodio (NaN₃), una placa para cada una las fracciones con mayor actividad antibacteriana y otra para el extracto metanólico de *K. ramosissima*. Se contabilizaron los pozos positivos (con coloración amarilla) en las ocho placas evaluadas en los días 3, 4, 5, 6 y 7.^{37,38}

Análisis espectrométricos

Se analizaron las fracciones con mayor actividad utilizando un sistema ESI cuadrupolo tiempo de vuelo operado a una resolución de 10,000. El sistema fue calibrado a un rango de masas de 100 a 2000 usando Glufip a una concentración de 100 femtomoles y ajustado diariamente con la relación m/z 785.8426 para asegurar que las condiciones de operación durante el análisis fueran entre 1 a 5 ppm de exactitud de masas.

Para la preparación de la muestra se tomaron 10 mg de muestra

pura, la cual fue disuelta en una mezcla 50/50 metanol agua. Se disolvió asistiéndola con ultrasonido por 5 minutos a temperatura ambiente, se tomaron 200 uL de la muestra con una jeringa Hamilton de 250 uL e inyectados como infusión directa a un velocidad de 5uL/min en la interface ESI del sistema qTOF premier para la realización de detección en modalidad MS y en modalidad MS/MS.

Los resultados obtenidos fueron comparados con los descritos para las especies de *Krameria* reportadas.²⁰⁻²³

Análisis estadístico

En la evaluación antimicrobiana de difusión en disco, los datos fueron expresados con media ± desviación estándar (DE) de ensayos independientes con 3 repeticiones. Las comparaciones de las medias del efecto de inhibición de la concentración del extracto sobre *P. gingivalis* se hicieron mediante la prueba de *t-Student*, considerando el antiséptico de referencia la Clorhexidina al 0.12%. En los ensayos de inhibición de crecimiento se utilizó un modelo bivariado de regresión lineal para el extracto y la bacteria de estudio, considerando la dosis inhibitoria. Se utilizó el paquete estadístico Mega Stat® 2007, considerando como diferencia estadísticamente significativa p<0.05. Para la evaluación de mutagenecidad, se utilizó el software provisto por el fabricante, el cual consiste en un macro a través del programa Excel® donde emite una gráfica y dictamen a partir de la captura de los pozos positivos en los días de evaluación.

Resultados y discusión

La planta utilizada en este estudio fue seleccionada por su uso en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades gingivales, asumiendo actividades antibacterianas. Los resultados obtenidos aportan evidencia que la bacteria *P. gingivalis* es sensible para el extracto metanólico de *K. ramosissima*, de manera similar los estudios reportados para la molécula aislada dihidroxibenzofurano (DHBF) obtenida de *K. lappacea*, por lo que se comprueba este solvente como adecuado para la extracción de sustancias con actividad antimicrobiana.¹⁴

Se obtuvo un rendimiento del extracto metanólico de raíz de *K. ramosissima* de 32%; en la evaluación de difusión en disco, los halos de inhibición obtenidos sobre *P. gingivalis* fueron significativos en relación con los controles observados (P<0.05). Las fracciones que resultaron con mayor inhibición fueron la 7 y 9, para los cuales los sistemas utilizados fueron: cloroformo-metanol 7:3 y cloroformo-metanol 6:4 respectivamente. En la Tabla 1 se detalla el sistema de extracción con el que se obtuvo cada fracción y los halos de inhibición.

bición obtenidos para cada una de ellas. En todas las fracciones se presentó actividad inhibitoria (inhibición > 8 mm).³² Al comparar las medias del efecto de inhibición con el control positivo empleando la prueba *t-Student* se obtuvo un resultado $P<0.05$, lo cual se considera significativo.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) requerida para inhibir el crecimiento de *P. gingivalis* fue de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en las fracciones de mayor actividad. No se registró crecimiento microbiano en las muestras control, de acuerdo a los resultados de las lecturas de la absorbancia a OD600 en el espectrofotómetro.

Las fracciones 7 y 9, fueron analizadas con métodos espectrométricos, obteniendo de la fracción 7 un compuesto cuyo espectro ESI-MS muestra una señal del ion molecular m/z a 315 [M+H]⁺ y el pico base a m/z 163 [Glucosa + H]⁺, en estudios anteriores del género *Krameria*, se encontró en *K. cystisoides* entre otros neolignanos, el compuesto 5-(4-hidroxifenil-3-metoxifenil)-3,4-dimetil-tetrahidrofurano,² con peso molecular 314, en el presente estudio se localizó este compuesto solo que el pico base a m/z 163 nos sugiere que está glicosilado por lo que una identificación presuntiva que su fórmula puede corresponder a la presentada en la figura 1.

De la fracción 9 se obtuvo un compuesto cuyo pico en el espectro ESI-MS fue m/z 297 [M+H]⁺ por lo que su peso molecular es 296, en los estudios sobre neolignanos de Krameraceas, reportaron el neolignano de *K. tomentosa*,²⁰ 2-(2',4'-dihidroxifenil)-5-(E)-propenilbenzofurano) con estructura parecida a la obtenida en este trabajo y en *K. ramosissima*²³ se encontraron varios neolignanos entre ellos un compuesto con peso molecular 296 2-(2,6-dihidroxí-4-metoxifenil-5-propenilbenzofurano) que concuerda con el encontrado en este estudio y cuya identificación podría ser la asociada a la ilustrada en la figura 2.

La viabilidad celular de los fibroblastos mediante el método de rojo neutro dio los siguientes resultados: el extracto metanólico y las fracciones 7 y 9 a la dosis de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no mostraron daño celular según la lectura de la placa (Figura 3). En la prueba de Ames, los resultados de acuerdo a las lecturas de los días 3 al 7 mostraron que las fracciones 7, 9 y el extracto metanólico de *K. ramosissima* están por debajo del control positivo (Figura 4). La citotoxicidad de *K. ramosissima* fue reportada con línea de celular de hepatoma humano (Huh7) utilizando el extracto hidroalcohólico de la parte aérea de la planta; sin embargo en el caso del presente estudio se utilizaron raíces para la elaboración del extracto, y las células expuestas fueron fibroblastos humanos, en ambos casos el resultado no fue citotóxico frente a las células.²⁷ Como se mencionó anteriormente, al igual que lo referido por diferentes estudios consultados la clorhexidina que

fue la sustancia utilizada como control positivo antibacteriano, mostró daño celular sobre fibroblastos humanos, no así las fracciones y extracto analizado.²⁴⁻²⁶

En relación al efecto mutagénica el referente es con la especie *K. lappacea*, para la cual realizaron la prueba de mutagenecidad con el ensayo de *E. coli* WP2 encontrando que no hay actividad mutagénica.²⁸ En ambos casos, el resultado es que no es mutagénico.

Tabla 1: Actividad *in vitro* del extracto metanólico y fracciones obtenidas de *Krameria ramosissima* contra *Porphyromonas gingivalis*

Compuestos	Diámetro de inhibición (mm)*		
	1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Extracto metanólico	11.50±0.58	10.75±0.96	11.00±1.00
Fracción 1	5.88±1.08	9.67±0.61	9.45±0.51
Fracción 2	11.63±0.75	11.78±1.27	10.29±0.91
Fracción 3	10.68±1.04	10.55±0.68	10.66±0.78
Fracción 4	10.61±1.11	9.91±1.34	9.48±1.25
Fracción 5	12.88±0.85	10.83±1.04	11.18±0.95
Fracción 6	21.50±1.29	14.11±0.78	14.14±0.95
Fracción 7	22.00±1.41	19.70±1.52	20.41±0.65
Fracción 8	12.75±1.50	10.85±1.80	11.47±1.59
Fracción 9	18.38±1.38	16.64±1.31	17.15±1.00
Fracción 10	12.75±0.96	12.70±1.31	12.52±1.55
Fracción 11	12.08±0.83	13.00±1.41	13.67±0.58
Fracción 12	11.25±1.50	14.25±0.96	14.00±1.00
Fracción 13	17.65±0.47	17.75±0.50	17.67±0.58
Fracción 14	13.00±0.82	11.25±0.96	11.67±0.58
Control positivo (Clorhexidina 0.12%)	17.50±1.29	17.90±1.21	17.53±1.03
Control negativo (DMSO 5%)	7.81±1.29	5.25±0.30	5.15±0.20

*Valores expresados en promedio ± DE (Desviación estándar) (n=3)

Sistemas utilizados por fracciones: Fracción 1= cloroformo, Fracción 2= cloroformo-metanol 9.5:0.5, Fracción 3= cloroformo-metanol 9.5:0.5 y cloroformo-metanol 8:2, Fracción 4= cloroformo-metanol 9.5:0.5, Fracción 5= cloroformo-metanol 8.5:1.5, Fracción 6= cloroformo-metanol 8:2, Fracción 7= cloroformo-metanol 7:3, Fracción 8= cloroformo-metanol 7:3 y cloroformo-metanol 6:4, Fracción 9= cloroformo-metanol 6:4, Fracción 10= cloroformo-metanol 1:1, Fracción 11= cloroformo-metanol 4:6, Fracción 12= cloroformo-metanol 4:6, Fracción 13= cloroformo-metanol 3:7, Fracción 14= metanol.

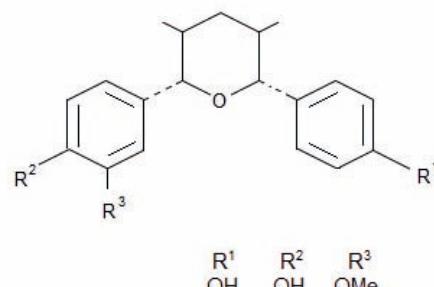


Figura 1: Fórmula asociada al compuesto 5-(4-hidroxifenil-3-metoxifenil)-3,4-dimetil-tetrahidrofurano (glicosilado) presente posiblemente en la Fracción 7 (del extracto metanólico de *K. ramosissima*).

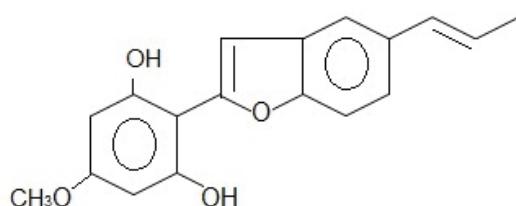


Figura 2: Fórmula asociada al compuesto 2-(2,6-dihidroxi-4-metoxifenil)-5-propenilbenzofurano probablemente presente en la Fracción 9 del extracto metanólico de *K. ramosissima*.

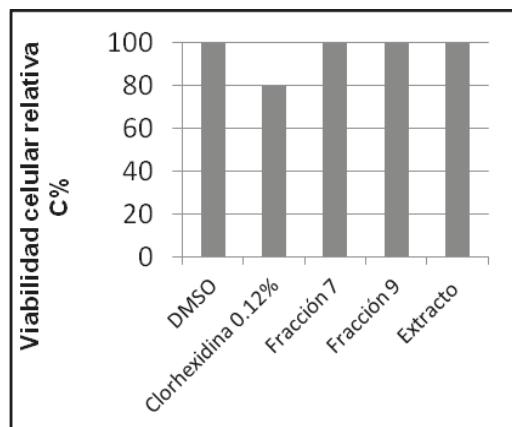


Figura 3: Viabilidad celular en fibroblastos mediante la exposición del extracto y fracciones de *Krameria ramosissima*.

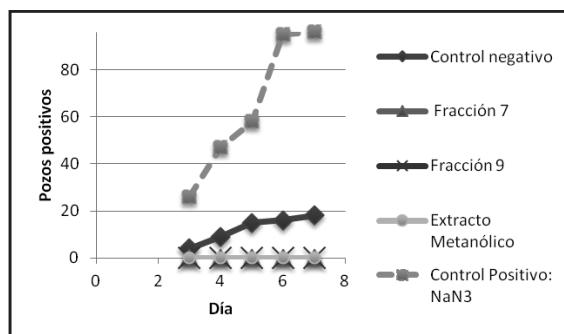


Figura 4: Mutagenecidad para el extracto metanólico y fracciones de *Krameria ramosissima*.

Conclusiones

En base a los resultados obtenidos se considera que el extracto metanólico de *Krameria ramosissima* tiene actividad antibacteriana contra *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 53978), así como las fracciones 7 y 9, las cuales mostraron mayor actividad que el extracto. Estos datos infieren que es congruente el uso de esta planta que tiene la comunidad del norte

de México para el manejo de la enfermedad periodontal. Los neolignanos presentes en las fracciones evaluadas, tienen por tanto participación dentro la actividad reportada, sin embargo aunque ya han sido reportados en esta y otras especies de *Krameria* se requieren más estudios para determinar su identificación completa. La información obtenida de los ensayos de citotoxicidad y mutagenecidad permiten configurar las sustancias evaluadas como seguras para la realización de mas estudios, colocándolas en ventaja sobre la clorhexidina, que ha presentado reportes de citotoxicidad y es actualmente la principal sustancia de uso local para el manejo de bacterias periodontopatógenas.

Agradecimientos

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT, por la beca otorgada No.33819 y el apoyo proporcionado a través del proyecto SEP-PROMEP 103.5/13/9254 de la Red Tuberculosis.

Referencias

- World Health Organization. Quality control methods for medicinal plants. 2011. <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/h1791e/h1791e.pdf>. Acceso 14 Junio 2013.
- Wadud A, Prasad P, Rao M, Narayama A. Evolution of drug: a historical perspective. Bull Indian Inst Med Hyderebad. 2007; 37 (1): 69-80.
- Efron D, Farber S M, Holmstedt B, Kline N L, Wilson R H L. Ethnopharmacologic Search for Psychoactive Drugs. Government Printing Office. Public Health Service Publications. No. 1645. 1970. (orig. 1967) Reimpresión, Washington, D.C. EUA.
- Heinrich M, Gibbons S. Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. J Pharm Pharmacol. 2001; 53: 425-432.
- Verde Star MJ. Estudio químico de *Krameria cytisoides*, *K.ramosissima*, *K. sonorae*, *K. grayi*, *Tiquilia canescens*, *Petalonyx crenatus* y *Kallstroemia maxima*. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias. División de Ciencias y Humanidades. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. 1987. México.
- Jagan N, Subash KR, Sandeep K. Role of phytotherapy in gingivitis: A review. Int. J. Pharmacol. 2012; 8:1-5.
- Simpson BB. The past and present use of rhatany (*Krameria*, Krameriaceae). Econ Bot. 1991; 3:397-409.
- Simpson BB. Flora Neotropica. Krameriacea. In: Organization for Flora Neotropica. New York Botanical Garden Press. 1989; 49: 1-108.

9. Di Pierro F, Catacchio V, Candidi C, Zerbinati N, Alfonso R. Rhatany-based preparation in vulvovaginitis and vaginosis. *Arch Med Sci*, 2009;168:339-346.
10. Clinton C. Plant tannins: A novel approach to the Treatment of ulcerative colitis. *Nat. Med. J.* 2009; 3:1-4.
11. Pil-ja S, Hong-Dae Ch-Wha Byeng H, Total Synthesis of Norneolignans from Krameria Species. *Arch Pharm Res*. 2004; 27: 1189-1193.
12. Jiménez-Estrada M, Velázquez-Contreras C, Garibay-Escobar A, Sierras-Canchola D, Lapizco-Vazquez R y Ortiz-Sandoval C. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of plants of the ethnopharmacopeia from northwest of Mexico. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2013; 12-21.
13. Ramírez-Cisneros M A, Rios M Y, Déciga-Campos M y Aguilar-Guadarrama B. Phytochemical study and anti-inflammatory, antidiabetic and free radical scavenger evaluations of *Krameria pauciflora* methanol extract. *Molecules* 2012, 17, 861-872.
14. Artini M, Papa R, Barbato G, Scoarugh L, Cellini A, Morazzoni P, Bombardelli E, Selan L. Bacterial biofilm formation inhibitory activity revealed for plant derived natural compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2012, 20:920-926.
15. Medina M L, Medina M G, Merino L A. Identificación de bacterias periodontopatógenas mediante métodos diagnósticos moleculares. *Enf Inf Microbiol*. 2010; 30: 83-90.
16. Liébana J, Castillo A M, Álvarez M. Enfermedades periodontales: consideraciones microbiológicas. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2004; 9:75-91.
17. Brodala N, Merricks E P, Bellinger D A, Damronsgri D, Offenbacher S, Beck J, Madianos P, Sotres D, et al. Porphyromonas gingivalis Bacteremia Induces Coronary and Aortic Atherosclerosis in Normocholesterolemic and Hypercholesterolemic Pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25:1446-1451.
18. Okuda K, Kimizuka R, Abe S, Kato T, Ishihara K. Involvement of periodontopathic anaerobes in aspiration pneumonia. *J Periodontol*. 2005; 6: 2154-2160.
19. Contreras A, Herrera J A, Soto J E, Arce R M, Jaramillo A, Botero J E. Periodontitis is associated with preeclampsia in pregnant women. *J Periodontol*. 2006; 77: 182-188.
20. Madeiro S A, de Lucena, H, Siqueira A, Duarte M. C, Braz-Filho R, Barbosa-Filho M, da Silva M A, Tavares J. F. New Neolignans from *Krameria tomentosa* A. St.-Hil. *J. Braz. Chem. Soc.* 2012; 23(11): 2021-2026.
21. Achenbach H, Grob J, Dominguez X A, Cano G, Star J V, Brussolo L C, Muñoz G, Salgado F. Lignans neolignans and norneolignans from *Krameria cystisoides*; *Phytochemistry* 1987; 26: 1159-1166.
22. Baumgartner L , S Sosa , Atanasov AG , Bodensieck A , Fakhrudin N , J Bauer , Favero GD , Ponti C , Heiss EH , Schwaiger S , A Ladurner , Widowitz U , Loggia RD , Rollinger JM , Werz O , R Bauer , Dirsch VM , Tubaro A , Stuppner H . Lignan derivatives from *Krameria lappacea* roots inhibit acute inflammation in vivo and pro-inflammatory mediators in vitro. *J Nat Prod*. 2011; 74(8):1779-1786.
23. Achenbach H, Grob J, Dominguez X A, Verde-Star J, Salgado F. Ramosissin and other methoxylated nor-neolignans from *Krameria ramosissima*. *Phytochemistry*. 1987; 26 (7):2041-2043.
24. Torres-Capetillo E, Carrillo-Fuentevilla R, De la Garza-Ramos MA, Mercado Hernández R, Torre-Martínez HHH , Segoviano-Ramirez JC. Antimicrobial efficacy of neutral super-oxidized electrolyzed gel versus chlorhexidine digluconate 0.12% in biofilm formation on orthodontic miniimplants: An in vitro study. *J. Pharmacognosy Phytother*. 2013; 5: 64-71.
25. Yi-Ching L, Yu-Hsiang K, Shiuan-Shinn L, Fu-Mei H, y Yu-Chao Ch. Cytotoxicity and genotoxicity of chlorhexidine on macrophages in vitro. *Environmental Toxicology*.2012. 29 (4):452-458.
26. Gianelli M, Chellini F, Margheri M, Tonelli P, Tani A. Effect of Chlorhexidine digluconate on different cell types: A molecular and ultrastructural investigation. *Toxicol In Vitro*.2008; 22:308-317.
27. Torres-González L, Muñoz-Espinosa L E, Rivas-Estilla A M, Trujillo-Murillo K, Salazar-Aranda R, Waksman N, Cordero-Pérez P. Protective effect of four Mexican plants against CCl4-induced damage on the Huh7 human hepatoma cell line. *Ann Hepatol*. 2011; 10(1):73-79.
28. Vattuone M A, Jaime G S, Soberón, J R, Martínez-Arriazu M E, Sampietro D A., Sgariglia M A, Sgroi N, Selis A N, et al. Evaluación de especies vegetales como fuentes naturales de antimicrobianos y antioxidantes. *Memorias de la XXI Jornadas Científicas de la Asociación de Biología de Tucumán*, Argentina. 2005 octubre 25 a 29. *Biocell*, 2006, 30(1): 163-230.
29. Díaz C, Heinzen H. Variaciones en el Perfil de Flavonoides y en la cantidad de Quercetina libre en Diferentes Extractos de Achyrocline satureoides. *Acta Farm. Bonaer*. 2006; 25 (4): 574
30. Vega-Menchaca MC, Verde-Star J, Oranday-Cárdenas A, Morales-Rubio ME, Núñez-González MA, Rivera-Guillén MA, Serrano-Gallardo LB, Rivas-Morales C. Actividad antibacteriana y citotóxica de *Leucophyllum frutescens* (Berl) I.M. Johnst el Norte de México contra *Staphylococcus aureus* de aislados clínicos. *Rev Mex Cienc Farm*.2013; 44 (2):24-30.

31. Monroy-Vázquez M, Soto-Hernández M, Cadena-Iñiguez J, Santiago-Osorio E. Mar Ruiz-Posadas L, Rosas-Acevedo H. Estudio biodirigido de un extracto alcohólico de frutos de Sechium edule (Jacq.) Swartz. Agrociencia. 2009; 43(8):77-790 .
32. Bauer A W, Kirby W M, Sherries JC, Tuck M. Antibiotic susceptibility testing by disk diffusion method standard. Am J Clin Pathol. 1966; 45: 493 - 496.
33. Southern E N, McCombs G B, Tolle S L, Marinak K. Comparative Effects of 0.12% chlorhexidine and Herbal Rinse on Dental Plaque-Induced Gingivitis. J Dent Hyg. 2006; 80:1-9.
34. Hall G S. Anaerobic Bacteriology. En García L S: Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2007. 2º Edición. Ed. ASM Press. EUA.
35. Andrews J M. Determination of minimum inhibitory concentrations. J Antimic Chemotherapy. 2001; 48: 5 -16.
36. Borenfreund E, Puerner J A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD / NR-90). J Tiss Cul Meth. 1984; 9: 7-9.
37. Ames B N, McCann J , Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutat. Res.1975; 31:347-364.
38. Resende F, Vilegas W, dos Santos L., y Varanda E. Mutagenicity of flavonoids assayed by bacterial reverse mutation (Ames) Test. Molecules. 2012. 17(5):5255-5268.