

# Actividad antibacteriana *in vitro* de *Maytenus ilicifolia* Martius sobre *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*

## In vitro antibacterial activity of *Maytenus ilicifolia* Martius on *Streptococcus mutans* and *Staphylococcus aureus*

Verónica María González Ramírez<sup>1</sup>, Cindy María Auxiliadora González Santacruz<sup>1</sup>, Daiva María Méndez González<sup>1</sup>, Héctor David Nakayama<sup>2</sup>, Francisco Ferreira<sup>2</sup>, Griselda Franco<sup>2</sup>, Liz Keim<sup>1</sup> , Heriberto Núñez\*<sup>1</sup> , <sup>1</sup>Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Odontología. Asunción, Paraguay. <sup>2</sup>Universidad Nacional de Asunción. Centro Multidisciplinario de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. San Lorenzo, Paraguay. \*Autor de correspondencia: drherin@gmail.com.

Recibido: julio 2019

Aceptado: diciembre 2019

Recibido en versión modificada: junio 2020

González Ramírez, V.M., González Santacruz, C.M.A., Méndez González, D.M., Nakayama, H. D., Ferreira, F., Franco, G...Núñez, H. (2020). Actividad antibacteriana *in vitro* de *Maytenus ilicifolia* Martius sobre *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*. *Investigaciones y Estudios-UNA*, 11(1), 34-46. <https://doi.org/10.47133/IEUNA5>

**Resumen.** *Maytenus ilicifolia* es un arbusto empleado como medicación natural en Paraguay, Brasil, Argentina y Uruguay. Entre sus propiedades se cita la actividad antimicrobiana. El objetivo del estudio experimental *in vitro* fue evaluar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Maytenus ilicifolia* Martius frente a *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*. Se determinó el efecto de tres concentraciones C<sub>1</sub> 47,76 mg/mL, C<sub>2</sub> 24,4 mg/mL y C<sub>3</sub> 12,8 mg/mL, frente a cepas bacterianas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, mediante el método de difusión en pozo en agar Mueller Hinton. Se realizó un ensayo por triplicado para cada cepa con las diferentes concentraciones del extracto, incluyendo un control positivo de Gluconato de Clorhexidina 0,12% y un control negativo de solución fisiológica 0,9%. La C<sub>1</sub> 47,76 mg/mL tuvo efecto antibacteriano sobre ambas cepas. La media de halo de inhibición

para *Streptococcus mutans* fue de 11,68 mm correspondiendo al 67,2% de efecto inhibitorio y la media de halo de inhibición para *Staphylococcus aureus* fue de 9,39 mm, correspondiendo al 51,82% de efecto inhibitorio en relación con el Gluconato de Clorhexidina 0,12%. Se concluyó que el extracto etanólico de *Maytenus ilicifolia* Martius posee efecto antibacteriano para *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*.

**Palabras clave:** antibacteriano, plantas medicinales, *Maytenus ilicifolia* Martius, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*.

**Abstract.** *Maytenus ilicifolia* is a shrub used as a natural medication in Paraguay, Brazil, Argentina and Uruguay. Among its properties, antimicrobial activity is cited. The aim of the *in vitro* experimental study was to evaluate the antibacterial effect of the ethanolic extract of *Maytenus ilicifolia* Martius against *Streptococcus mutans* and *Staphylococcus aureus*. The effect of three concentrations, C<sub>1</sub> 47.76 mg/mL, C<sub>2</sub> 24.4 mg/mL and C<sub>3</sub> 12.8 mg/mL, was determined against bacterial strains of *Streptococcus mutans* ATCC 25175 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, using the Mueller Hinton agar well-diffusion method

a triplicate assay was performed for each strain with the different concentrations of the extract, including a positive control of Chlorhexidine Gluconate 0.12% and a negative control of physiological solution 0.9%. C1 47.76 mg/mL had an antibacterial effect on both strains. The mean halo inhibition for *Streptococcus mutans* was 11.68 mm, corresponding to 67.2% inhibitory effect and the mean halo inhibition for *Staphylococcus aureus* was 9.39 mm, corresponding to 51.82% inhibitory effect, both in relation to 0.12% Chlorhexidine Gluconate. It was concluded that the ethanolic extract of *Maytenus ilicifolia* Martius has antibacterial effect for *Streptococcus mutans* and *Staphylococcus aureus*.

**Keywords:** antibacterial, medicinal plants, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Maytenus ilicifolia* Martius.

## INTRODUCCIÓN

En determinados tratamientos odontológicos se produce una bacteriemia transitoria, el número de hemocultivos positivos a bacterias del género *Streptococcus* es del 30% en sujetos con salud gingivodental y hasta el 75% en individuos con caries, gingivitis y periodontitis (Gutiérrez, Bagán, et al., 2006).

El género bacteriano *Streptococcus* se ha reportado como el más preponderante a nivel de la cavidad oral y se han diferenciado más de 16 especies, siendo las más frecuentemente aisladas *S. mutans*, *S. intermedius*, *S. oralis* y *S. sanguinis* (Serrano-Coll et al., 2015).

*Streptococcus mutans* fue aislado e identificado por Clarke, en 1924, a partir de lesiones cariosas en humanos. Lo denominó *S. mutans* por las formas mutantes en que puede presentarse, cocobacilo en medio ácido y coco en medio alcalino. Son grampositivos, dispuestos en cadenas cortas de 4 a 6 cocos, miden de 0.5 a 0.8  $\mu\text{m}$  de diámetro, anaerobios facultativos e integran la flora microbiana

residente de la cavidad bucal y vías respiratorias altas. Son patógenos oportunistas en patologías como la caries dental, bacteriemias y endocarditis infecciosa (Gamboa, 2014; Ojeda-Garcés, Oviedo García & Salas, 2013).

*Staphylococcus aureus* es un microorganismo patógeno, capaz de causar múltiples infecciones con un amplio rango de gravedad, desde infecciones localizadas en piel hasta infecciones invasoras y potencialmente mortales como neumonía necrosante, osteomielitis y sepsis. Las especies reportadas con más frecuencias de muestras de la cavidad oral son *S. epidermidis* y *S. aureus*. Algunas infecciones en la región de la cavidad oral causadas por especies de *Staphylococcus* incluyen queilitis angular, infecciones endodónticas, osteomielitis del maxilar, parotiditis y una forma de mucositis en pacientes mayores con nutrición parenteral (Boyle-Vavra & Daum, 2007; Smith, Jackson & Bagg, 2001).

Cataldo et al., 2014, en un estudio observacional descriptivo, en el que incluyeron a 112 niños de 2 a 15 años, con el objetivo de detectar presencia de *S. aureus* colonizantes en cavidad bucal, concluyeron que 33% de los niños que asistieron a la clínica odontológica eran portadores de *S. aureus*, y el 94,6% de los aislados eran resistentes a al menos un antibiótico testeado.

El Gluconato de Clorhexidina es un agente químico antibacteriano de eficacia comprobada en el ámbito odontológico. Se utiliza en distintas concentraciones y en diferentes presentaciones como enjuagues bucales, pastas dentales, gel y sprays. La concentración al 0,12% es la más empleada en colutorios dentales, como prevención de enfermedades del periodonto y caries dental (Rivadeneira-Cajas & Álvarez-Velasco, 2015).

También es aplicado, a otras concentraciones, como antiséptico para piel y mucosas, y en heridas leves. En cuanto a su espectro de acción, tiene un efecto bactericida intermedio, ampliamente activo contra bacterias grampositivas. Es el agente antimicrobiano

bucal, más usado, efectivo y documentado, para eliminar o disminuir la presencia de *Streptococcus mutans*. Las ventajas que justifican ampliamente su empleo son el buen índice terapéutico, rápida acción germicida y duración prolongada o efecto residual. Algunos efectos adversos reportados son las de naturaleza alérgica o irritativas de la piel o mucosas y fotosensibilidad, pero todas de escasa prevalencia. En relación con el uso odontológico, los enjuagues de Clorhexidina pueden ocasionar tinción de los dientes por precipitación o unión a los cromógenos aniónicos de la dieta, cuando se administran en forma continua puede ocasionar alteración del gusto de forma temporal, en algunos casos, se ha descrito descamación de la mucosa bucal y tumefacción de la glándula parótida (Diomedí, Chacón, Delpiano, Hervé, Jemenao, Medel...Cifuentes, M., 2017; Yevenes, Reyes, Campos & Saragoni, 2003).

La aparición de bacterias multirresistentes en los últimos años ha dificultado el tratamiento de infecciones. En busca de nuevas opciones terapéuticas el estudio de plantas medicinales permite comprender el uso medicamentoso de algunas especies vegetales y el descubrimiento de nuevas drogas. Aunque la mayor parte de las investigaciones se centren en antibióticos y quimioterápicos “industriales”, son cada vez más numerosos los estudios de laboratorio con productos fitoterápicos (Acosta-Pérez et. al., 2012; Colacite, 2015; Salinas, García & Velásquez, 2016).

La etnomedicina ha permitido un método eficaz para la identificación de plantas medicinales, extractos y principios bioactivos, reduciendo el empirismo e intentando mejorar el desarrollo de medicamentos, a partir de la correlación entre los medicamentos tradicionales y las pruebas científicas que corrobora su acción farmacológica (Pabón, Rodríguez & Hernández-Rodríguez, 2017).

*Maytenus ilicifolia*, conocida como Cangorosa en español y *Espinheira Santa* en portugués, es un arbusto silvestre que crece en países sudamericanos, principalmente en el sur

de Brasil, Mata Atlántica, este de Argentina, centro y este de Uruguay y sur de Paraguay *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek (*Maytenus muelleri* Schwacke) perteneciente a la familia de las Celastraceae. Es un arbusto o árbol pequeño, de hasta 5 metros de altura, dioico, con hojas alternas, coriáceas a subcoriáceas, glabras, con peciolo corto, presentan estípulas pequeñas; sus flores son pentámeras, actinomorfas, blancas o amarillentas, muy pequeñas y generalmente están agrupadas en inflorescencias axilares; el fruto es una pequeña capsula ovoide o elipsoidal, con 1 a 4 semillas; florece en primavera y fructifica en verano. El género *Maytenus* comprende unas 200 especies americanas. *Maytenus ilicifolia* Martius está incluida en el Primer Suplemento del Formulario de Fitoterápicos Farmacopea Brasileira, 1ª edición (Campos, Arrais, Medeiros, Pereira & Gondim, 2015; Sharapin, et al., 2006).

Santos-Oliveira, Coulaud-Cunha & Colaço (2009) citan entre las propiedades de *Maytenus ilicifolia* la actividad gástrica, la actividad antineoplásica, la actividad antimicrobiana, la actividad sobre el sistema nervioso central, la actividad sobre la espermatogénesis y la actividad antioxidante.

En cuanto a sus actividades farmacológicas son atribuidas a los compuestos encontrados en su estructura como: triterpenos, quinonametídeos (friedelanol y friedelina); flavonoides; terpenos (maitenina, tringenona, isotenginona II, congorosinas A y B, ácido maitenónico); aceites esenciales (friedenelo); alcaloides (maitenina, maitanprina y maitensina); taninos, principalmente los gálicos (epicatequina, epigalocatequina y galato de epigalocatequina); glicolípidos (monogalactosildiacilglicerol, digalactosildiacilglicerol, trigalactosildiacilglicerol, tetragalactosildiacilglicerol y sulfaquinovosildiacilglicerol. (Ferreira H, 2019).

En líneas generales la administración de infusiones de Cangorosa a humanos en dosis usuales es muy bien tolerada (Tabach, Duarte-Almeida & Carlini, 2017), en el estudio

Farmacológico y toxicológico de extracto de hojas de *Maytenus ilicifolia* en 24 voluntarios (12 hombres y 12 mujeres), entre 20 y 40 años, administraron dosis de 100 mg hasta una final de 2000 mg. Las reacciones adversas más citadas fueron xerostomía (16,7%) y poliuria (20,8%), con reversión de estos síntomas sin ninguna intervención durante el estudio. Concluyeron que la administración de hasta 2000 mg fue bien tolerada con pocos cambios en parámetros de función bioquímica, hematológica o psicomotora. Se desaconseja el empleo de infusiones o extractos de cangorosa durante el embarazo y lactancia (Montanari & Bevilacqua, 2002; Sharapin et al., 2006).

En cuanto a la comercialización de la planta en Paraguay, en el estudio realizado por (Degen & González, 2014), sobre las plantas utilizadas en la medicina popular paraguaya como antiinflamatorias, reportaron que el uso común de los consumidores para *Maytenus ilicifolia* fue para infecciones, lavado de heridas, eczemas, para la higiene íntima, uso como antiespasmódico y para la inflamación de la próstata. Se presenta en forma de productos secos o frescos, las partes empleadas son la corteza de raíz y plántula. En cuanto a la forma de preparación se realiza por decocción, se bebe como té, mate y para lavados.

En Paraguay, la Política Nacional de Medicamentos de 2001 menciona que los medicamentos derivados de plantas medicinales (fitoterapéuticos) forman parte de la terapéutica en nuestro país, y que deben ser objeto de investigación, promoción y regulación (Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, 2001). Y en la publicada en el 2015 se hace referencia a fomentar la capacitación de los RRHH para el desarrollo de la investigación tecnológica de plantas medicinales y así promover el progreso sustentable de la cadena productiva de plantas medicinales, fitoterapéuticos y el fortalecimiento de la industria farmacéutica en este rubro (Dirección Nacional de Vigilancia Sanitaria, 2016). Debido a la vasta composición de especies medicinales en Paraguay y al uso popular como

parte de la cultura, la disponibilidad y accesibilidad en términos económicos para diferentes sectores de la población, y a la composición química natural de sus constituyentes. Este trabajo se aboca al estudio del efecto del extracto vegetal de *Maytenus ilicifolia* Martius frente a dos microorganismos de potencial patógeno constituyentes de la microbiota oral.

Se puede mencionar, por lo tanto, la implicancia de este estudio en la proyección hacia nuevas opciones preventivas y terapéuticas en el ámbito odontológico utilizando un componente de la rica flora que existe en Paraguay, combinando los conocimientos culturales con el desarrollo de la ciencia.

El objetivo de la investigación fue evaluar el efecto antibacteriano de extracto etanólico de *Maytenus ilicifolia* Martius sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En la presente investigación se evaluó la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Maytenus ilicifolia* Martius frente a cepas bacterianas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) mediante un estudio experimental *in vitro* que se desarrolló en dos etapas sucesivas, la primera consistió en la obtención del extracto etanólico vegetal y la segunda en la aplicación de las pruebas microbiológicas correspondientes.

Para la obtención de las hojas de las plantas de *Maytenus ilicifolia* Martius con identificación certificada del Huerto de Plantas Medicinales y Aromáticas de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción, se presentó una nota dirigida a la autoridad correspondiente, con el objeto de solicitar autorización para la cosecha de material representativo, en cantidad suficiente para el desarrollo de la investigación

Se obtuvo una muestra de 520,21 gramos, rendimiento final de hojas secas a partir de 645 gramos de hojas frescas que fueron seleccionadas, en el mes de mayo del año 2019, luego de deshojar las ramas y excluir hojas enfermas o contaminadas con malezas.

Las muestras fueron secadas de forma artificial en estufa a una temperatura de 35°C durante 48 horas en 7 sobres de papel diario con un peso promedio de hojas verdes de 92 gramos cada uno. Se obtuvo una pérdida de humedad de 23% aproximadamente. Para la elaboración del extracto etanólico de hojas de *Maytenus ilicifolia* Martius se optó por el método de maceración exhaustiva, el proceso inició pesando el material seco (Fig. 1), exactamente 205 gramos.



Figura 1. Pesaje de las muestras en estado seco.

Seguidamente se incorporó a una licuadora laboratorial con 2 litros de alcohol rectificado 96% accionando la misma por pulsaciones cortas para evitar el aumento de temperatura (Fig. 2).



Figura 2. Proceso de licuado de la muestra con etanol 96%.

Posteriormente se vertió el contenido a un embudo de decantación para la maceración con

agitación continua, llevando durante el proceso el sobrenadante a un balón pasando por un filtro de algodón para así colocarlo en un rotavapor a una temperatura de 50°C hasta eliminar totalmente el solvente (Fig. 3). Este proceso fue repetido varias veces con alcohol recuperado de la destilación hasta que el macerado llegó a un punto claro durante un periodo de 6 días, obteniéndose de esta manera el extracto crudo con un rendimiento de 32,43 mg. (solución madre) que corresponde al 15,8% (Carrión & García, 2010; González, 2004).



Figura 3.a. Carga de la solución en embudo de decantación.  
b. Proceso de destilación por rotavapor.

Luego, se procedió a la dilución en tres concentraciones (alta, media y baja) teniendo en cuenta el protocolo estándar del laboratorio del CEMIT cuando no se conoce la  $DL_{50}$ . Se disolvió el extracto crudo con Tween 80 a 0.1% que fue preparado pesando 10 mg de Tween 80 al 10% en un matraz de 100 mL llenándolo posteriormente con agua destilada estéril al ras y agitándolo enérgicamente hasta obtener una mezcla homogénea, para que la misma alcance una concentración de 0.1%. Se diluyó 10 mL en un vaso de precipitado con 100 mL de agua destilada estéril. Las tres diluciones del extracto fueron preparadas en tres Tubos Falcón estériles (Fig. 4). En una balanza analítica se pesó alícuotas necesarias de extracto crudo para cada concentración. Se preparó 5 mL de cada una. Las dosis establecidas fueron, una dosis alta (50mg/mL), una dosis media (25 mg/mL) y una dosis baja (12,5 mg/mL).

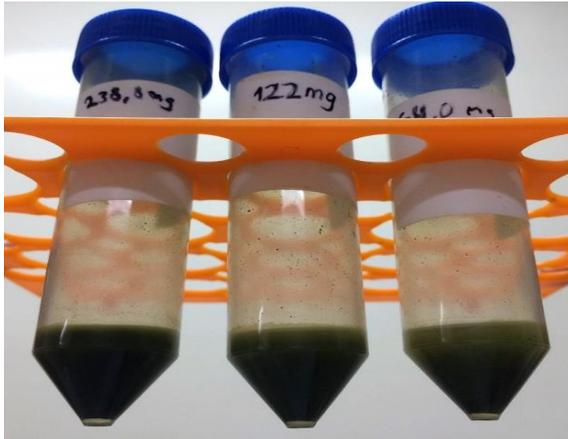


Figura 4. Extracto etanólico en las diferentes concentraciones.

En el pesaje de las alícuotas del extracto crudo se encontraron dificultades de precisión logrando las siguientes dosis (Tabla 1).

Tabla 1. Dosis establecidas de acuerdo con el protocolo del CEMIT.

	Dosis sugerida	Dilución	Dosis utilizada
Concentración 1 (C <sub>1</sub> )	50 mg/ml	238 mg/5mL	47,76 mg/mL
Concentración 2 (C <sub>2</sub> )	25 mg/mL	122,0 mg/5mL	24,4 mg/mL
Concentración 3 (C <sub>3</sub> )	12,5 mg/mL	64,0 mg/5mL	12,8 mg/mL

Concentraciones utilizadas y las diluciones correspondientes en base a las sugeridas por el Laboratorio de Química y Toxicología de Alimentos del CEMIT.

Cada Tubo Falcón conteniendo el peso correspondiente a cada concentración junto con Tween 80 al 0.1% fue agitado con Vortex Thermolyne hasta disolver totalmente el extracto crudo. Todo el proceso de obtención del extracto fue realizado en el Laboratorio de Química y Toxicología del Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT).

Las diluciones correspondientes fueron congeladas durante 7 días.

La población bacteriana estuvo compuesta por cepa pura de *Streptococcus mutans* ATCC (American Type Culture Collection) 25175 y cepa pura de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 reconstituidas. Se realizó el repique en Agar de Soya Trípico (TSA) pico de flauta y Caldo Trípico de Soya (TSB) durante 24 horas, dando inicio así a la segunda etapa del estudio (Fig. 5).



Figura 5. Repique de las cepas en TSA y TSB.

El medio de cultivo Agar Mueller Hinton (AMH), se preparó con 11,4mg de polvo de AMH en 300 mL de agua destilada estéril, según las recomendaciones del fabricante; esto se dispuso en 6 placas estériles y se llevó a estufa durante 24 Hs. (Servicios antimicrobianos Dr. Carlos G. Malbrán, 2012).

Concluido el tiempo de incubación, con ayuda de un asa bacteriológica estéril, fueron tomadas colonias y suspendidas en solución fisiológica 0.9% hasta alcanzar una turbidez comparable con el patrón 0.5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Se tomaron cinco a seis colonias, se estrió la placa en la totalidad de la superficie del agar. De acuerdo con la variante de difusión, se realizaron pocillos en el gel de agar (Ramírez & Marin, 2009), en cada placa de Petri con una punta de pipeta estéril de una medida de 6,60 mm (Fig. 6). Los mismos fueron correctamente identificados al dorso de la placa.



Figura 6. Diámetro de puntera de micropipeta utilizada para la preparación de los pocillos en agar Mueller Hinton.

Cada pocillo fue llenado con 20  $\mu$ L de:  
 Concentración 1 (238.8 mg/5mL),  
 Concentración 2 (122.0 mg/5mL),  
 Concentración 3 (64.0 mg/5mL), Control Positivo (Gluconato de Clorhexidina 0.12% marca comercial

Positivo (Gluconato de Clorhexidina 0.12% marca comercial Prodent Plac Laboratorios Lasca. Paraguay) y Control Negativo (solución fisiológica 0.9%) (Fig. 7).



Figura 7. Vertido del extracto en los pocillos.

También se probó la susceptibilidad bacteriana frente al extracto crudo. En cada placa de Petri se hizo 3 pocillos con 20  $\mu$ L de control positivo (clorhexidina 0.12%), 20  $\mu$ L control negativo (solución fisiológica 0.9%) y una muestra de extracto crudo respectivamente.

El ensayo fue realizado por triplicado ocupando un total de 6 placas. Se incubó a 37°C, por 24 horas (Fig. 8).

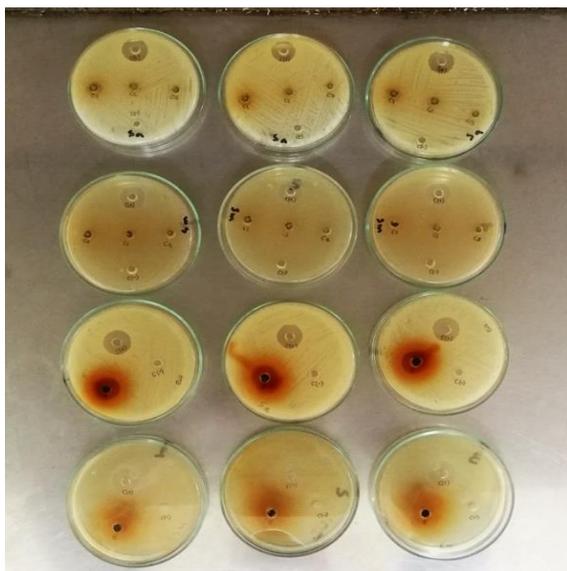


Figura 8. Ensayo por triplicado con extractos etanólicos y extracto puro frente a *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans*.

Para el análisis del efecto antibacteriano se midió el halo resultante mediante un Calibre de Vernier sobre el respaldo de la caja de Petri sin remover la tapa (Fig. 9) (Ramírez & Marin, 2009).



Figura 9. Medición de los halos de inhibición con el calibrador Vernier.

## RESULTADOS

Se obtuvo el extracto etanólico puro de *Maytenus ilicifolia* Martius de 32,43 mg correspondiente a un rendimiento de 15,8%.

Se observó actividad antibacteriana sobre la cepa *Streptococcus mutans* ATCC 25175 con una media de halo de inhibición de 11,67 mm a una concentración de 47,76 mg/mL ( $C_1$ ). El control positivo, Gluconato de Clorhexidina 0,12%, presentó una media de 17,38 mm de halo de inhibición. Se observó un efecto inhibitorio del 67,2% en relación con el Gluconato de Clorhexidina 0,12%.

Para la determinación de diferencias significativas se utilizó la prueba t para muestras independientes a un nivel de significancia de 0,05, para la comparación de las medias de los halos obtenidos por la concentración de *Maytenus ilicifolia* Martius que presentó un efecto inhibitorio con el control positivo, obteniéndose un valor de  $p < 0,02$ , observándose una diferencia estadísticamente significativa entre el efecto antibacteriano del *Maytenus ilicifolia* Martius y el Gluconato de Clorhexidina 0,12%.

Se observó actividad antibacteriana sobre la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 con

**Tabla 2. Resultados del ensayo con *Streptococcus mutans*.**

VARIABLE	PLACA 1 mm	PLACA 2 mm	PLACA 3 mm	MEDIA mm	% Efecto Inhibitorio
C <sub>1</sub> 47,76 mg/mL	11,7	10,92	12,96	11,68	67,2%
C <sub>2</sub> 24,4 mg/mL	0	0	0	0	0
C <sub>3</sub> 12,8 mg/mL	0	0	0	0	0
<b>Control positivo</b> Gluconato de Clorhexidina 0,12%	18,10	16,45	17,60	17,38	100
<b>Control negativo</b> Solución Fisiológica 0,9%	0	0	0	0	0

Medidas obtenidas del halo inhibitorio, expresadas en mm con sus r positivo.

una media de halos de inhibición de 9,39 mm a una concentración de 47,76 mg/mL (Concentración 1).

El control negativo, Solución Fisiológica 0,9%, no influyó en el crecimiento bacteriano.

El control positivo, Clorhexidina 0,12%, presentó una media de 18,12 mm de halos de inhibición.

Se observó un efecto inhibitorio del 51,82% en relación con la Clorhexidina al 0,12%.

## DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos en las condiciones experimentales establecidas se evidencia el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de la especie *Maytenus ilicifolia* Martius sobre *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans*.

Las técnicas de difusión han sido ampliamente usadas para evaluar extractos de

**Tabla 3. Resultados del ensayo con *Streptococcus aureus*.**

VARIABLE	PLACA 1 mm	PLACA 2 mm	PLACA 3 mm	MEDIA mm	% Efecto Inhibitorio
C <sub>1</sub> 47,76 mg/mL	11,7	10,92	12,96	11,68	67,2%
C <sub>2</sub> 24,4 mg/mL	0	0	0	0	0
C <sub>3</sub> 12,8 mg/mL	0	0	0	0	0
<b>Control positivo</b> Gluconato de Clorhexidina 0,12%	18,10	16,45	17,60	17,38	100
<b>Control negativo</b> Solución Fisiológica 0,9%	0	0	0	0	0

Medidas obtenidas del halo inhibitorio, expresadas en mm con sus respectivas medias y el porcentaje inhibitorio con respecto al control positivo.

Para la determinación de diferencias significativas se utilizó la prueba t para muestras independientes a un nivel de significancia de 0,05, para la comparación de las medias de los halos obtenidos por la concentración de *Maytenus ilicifolia* Martius que presentó un efecto inhibitorio con el control positivo, obteniéndose un valor de  $p < 0,003$  observándose una diferencia estadísticamente significativa entre el efecto antibacteriano del *Maytenus ilicifolia* Martius y el Gluconato de Clorhexidina 0,12%.

plantas con actividad antimicrobiana, habiéndose demostrado que la variante de difusión en pozo presenta más alta sensibilidad en relación con los discos de papel de filtro Whatman debido a la presencia de grupos hidroxilo libres de la celulosa que impiden la difusión de compuestos catiónicos de los productos naturales en el agar (Ramírez & Marin, 2009). Por tanto y coincidiendo con los procedimientos empleados por Ducat et al., (2011) optamos por el método de difusión en pozo en agar Mueller Hinton para efectuar las

pruebas de susceptibilidad.

Para que los resultados sean comparables, se optó por el empleo de cepas de referencia ATCC, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, (Del Castillo, Molinares, Campo & Bettin et al., 2017), evaluaron el efecto antibacteriano de extractos frente a cepas ATCC y aislamientos clínicos reportando que el extracto evaluado demostró mayor poder de inhibición frente a las cepas clínicas, evidenciando una diferencia en el comportamiento de las cepas ATCC con respecto a las cepas clínicas. Por lo que consideramos desarrollar una investigación incluyendo a cepas clínicas para comparar los efectos obtenidos.

Al igual que Cerqueira et al., (2013), la metodología adoptada para la preparación del extracto fue el método de maceración exhaustiva utilizando como solvente el etanol. González (2004), en su estudio sobre obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos reportó que el solvente etanólico es preferible sobre el acuoso puesto que, a largo periodo de extracción, el agua puede propiciar la fermentación o la formación de mohos.

Como agente diluyente para obtener las concentraciones respectivas optamos por el Tween 80 al 0,1%, trabajos como el de Ojeda Pereda & Beltrán Orbegoso (2019), utilizaron el mismo diluyente para la preparación de las distintas concentraciones de extracto vegetal de *Allium sativum* y *Zingiber officinale*.

El extracto se obtuvo de hojas secas de *Maytenus ilicifolia* Martius. Alves, Oliveira, Weiss, Bonadiman & Cruz, (2016), utilizaron hojas secas reportando efectividad frente a *Streptococcus sp.* (Aislado clínico) meticilina resistente, *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (aislado clínico) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 00039); y hojas frescas, que no fueron efectivas frente a *Staphylococcus aureus*.

Se prepararon tres concentraciones en base al protocolo estándar del Laboratorio de Química y Toxicología de Alimentos del

CEMIT cuando se desconoce la  $DL_{50}$ , disponiendo una concentración alta (50 mg/mL), media (25 mg/mL) y baja (12,5 mg/mL) para establecer un gradiente. En cuanto a la  $DL_{50}$  (Dosis Letal 50) de *Maytenus ilicifolia* Martius, Cabral, Akisue, Andrade, Moreira, Ymayo & Ciocler (1989), en su investigación sobre los efectos farmacológicos de la planta establecen una dosis no menor que 80 mg/kg. Por el contrario, en estudios como el de Santos-Oliveira et al. (2009), refieren que no es posible determinarla ya que, en el análisis de toxicología aguda administrando por vía oral a ratones y ratas, dosis hasta 1.600 veces mayores que la utilizada por el hombre, no se presentaron efectos tóxicos en cuanto a la administración de forma aguda y no posee efecto depresor del Sistema Nervioso Central. Sin embargo, existen datos sobre la  $DL_{50}$  de uno de los componentes con actividad antibacteriana, maitenina, siendo ésta 19,39 mg/kg por vía intraperitoneal. El primer suplemento de Formulario de Fitoterápicos Farmacopea Brasileira, sugiere una dosis de consumo que corresponde a 500 mg. de extracto acuoso seco de hojas, en excipiente c.s.p. cantidad suficiente para una cápsula (Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria, 2018).

Como control positivo se utilizó Gluconato de Clorhexidina 0,12%, siendo uno de los agentes químicos de reconocida efectividad y amplio uso para el control de las afecciones que involucran formación de la biopelícula dental.

Campos et al. (2015), reportaron halos de inhibición de 16 mm frente a *Streptococcus mutans*. Siendo este diámetro similar a los resultados observados en el presente estudio donde se obtuvo una media de 17,38 mm frente a *Streptococcus mutans* y una media de 18,12 mm frente a *Staphylococcus aureus*.

Nuestras pruebas fueron realizadas teniendo como control negativo una solución fisiológica 0,9% al igual que Ojeda Pereda & Beltrán Orbegoso (2019), sin embargo, Ducat et al., (2011), al evaluar la actividad antibacteriana de

*Maytenus ilicifolia* Martius utilizó como control negativo Etanol 70 y 90%, siendo estos los mismos solventes utilizados para la preparación del extracto.

En cuanto al efecto del extracto etanólico de *Maytenus ilicifolia* Martius sobre *Staphylococcus aureus*, en relación al estándar considerado se obtuvo un porcentaje de efecto inhibitorio del 51,82% a una concentración de 47,76 mg/mL, siendo ésta una concentración más alta con respecto a la sugerida efectiva por Ducat et al.(2011), quienes en un estudio, obtuvieron extractos etanólicos de *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reissek en concentraciones de 70% (ES70) y 95% (ES95) v/v etanol para determinar la actividad antimicrobiana, encontrándose que el ES70 presentó una zona de inhibición frente al *S. aureus*. Se observó que el ES70 inhibió el desarrollo del *S. aureus* en concentraciones de 25; 2,5 y 0,25 mg/mL, obteniéndose como CIM del extracto 0,25 mg/mL y el CBM de 25 mg/mL.

Constatamos una mayor diferencia en las concentraciones utilizadas por Colacite (2015), quien realizó un estudio para determinar la actividad antimicrobiana de extractos hidroalcohólicos de, *Maytenus ilicifolia* Reissek, utilizando concentraciones de 4.000 µg/mL, 2.000 µg/mL y 1.000 µg/mL, encontrando actividad inhibitoria frente a los microorganismos testeados. Se determinó que la CIM fue de 500 µg/mL, y la CBM fue de 1.000 µg/mL para *S. aureus*.

Cerqueira et al. (2013), en un estudio sobre evaluación antimicrobiana de extractos etanólicos de *Maytenus* sp ramas y hojas, sobre *Streptococcus* del grupo *mutans*, probaron la Concentración Inhibitoria Mínima, Concentración Bactericida Mínima e Inhibición de la Adherencia Celular de los extractos. En el estudio sobre CIM, tanto la cáscara como las ramas fueron capaces de inhibir el crecimiento bacteriano *S. mutans* UA159 con la menor concentración probada, 31,25 µg/mL, siendo necesaria mayor concentración, 125 µg/mL del extracto de cáscara que de rama 31.25 µg/mL para una actividad bactericida. El *S. mutans*

*Ingbritt* 1600 se mostró resistente a todas las concentraciones de extractos de ramas utilizados en los estudios de CIM y CBM, por su parte la cáscara presentó resultado Inhibitorio, CIM 125 µg/mL y CBM 250 µg/mL. *S. sobrinus* 6715 se mostró resistente a todas las concentraciones de extractos, tanto de la cascara como de la rama. En cuanto a la prueba de Adherencia Celular se obtuvo resultado apenas para el extracto etanólico de cáscara; ADH 3.90 µg/mL para *S. mutans* UA 159.

Toran, Martinon, Farinati & Doloisio, (2013), estudiaron la actividad de extracto etanólico de *M. ilicifolia* sobre microorganismos planctónicos de *Staphylococcus aureus*. Se determinó la CIM 90 (Concentración inhibitoria mínima frente al 90% de las cepas) mediante dilución del extracto, *S. aureus* presentó un resultado de 0.004 y de 0.02 µL/mL.

Campos et al. (2015), evaluaron la actividad antibacteriana de tinturas hidroalcohólicas de *Rosmarinus officinalis* L. y *Maytenus ilicifolia* Mart. Sobre las siguientes bacterias orales planctónicas; *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus oralis* (ATCC 10557), *Streptococcus salivarius* (ATCC 9758), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y *Eikenella corrodens* (ATCC 23834), utilizando diluciones de tintura en forma pura 1:1 hasta 1:64, en alcohol 70% que está presente en la fórmula de las tinturas fitoterápicas. *Maytenus ilicifolia* Mart. Obtuvo una actividad más discreta con respecto a *Rosmarinus officinalis*, impidiendo el crecimiento bacteriano en concentraciones de hasta 112,5 mg/mL con una media de tamaño del halo de 7,5 mm para *E. fecalis*. Para *S. oralis* y *salivarius*, se encontró actividad en concentraciones de 225 mg/mL, promoviendo la formación de una media de halo inhibitorio de 7 mm de diámetro. No presentó efecto antibacteriano sobre *S. mutans*.

Ciertos factores como, el lugar de origen de la especie, ambiente y condiciones agronómicas, periodo de colecta, estadio de desenvolvimiento de la planta y el método de extracción podrían influenciar en la eficacia de

las propiedades, con lo que se podría explicar la diferencia en las concentraciones utilizadas para el presente trabajo y las investigaciones posteriores.

En cuanto al efecto antimicrobiano, existen estudios fitoquímicos que atribuyen la participación de ciertos componentes químicos de la planta, como la maitenina, los taninos gálicos y la friedelina o friedelan 3- $\beta$ -ol (Santos-Oliveira et al., 2009).

Diferentes son las metodologías utilizadas en determinación del efecto antibacteriano, lo que dificulta la comparación entre los resultados obtenidos.

Aunque la diferencia estadísticamente significativa observada fue a favor del Gluconato de Clorhexidina, solución utilizada como referencia, se evidenció un efecto antibacteriano del extracto etanólico, lo que nos permite posicionar al presente trabajo como inicio en la formulación de proyectos que continúen el estudio de *Maytenus ilicifolia* Martius evaluando distintas variables *in vitro* y posteriormente *in vivo*, para su potencial uso como antiséptico en la cavidad oral.

## CONCLUSIONES

El extracto etanólico de *Maytenus ilicifolia* Martius presentó efecto inhibitorio *in vitro* a una concentración de 47,7 mg/mL, sobre el crecimiento bacteriano de *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*.

El porcentaje de efecto inhibitorio en relación con el control positivo frente a *Streptococcus mutans* fue de 67,2% y frente a *Staphylococcus aureus*, de 51,82%. El efecto antibacteriano entre Gluconato de Clorhexidina 0,12% y extracto etanólico de *Maytenus ilicifolia* Martius presenta diferencia estadísticamente significativa frente a ambas cepas a favor del control positivo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta-Pérez, G., Rodríguez-Ábrego, G., Longoria-Revilla, E. & Castro-Mussot, M. E. (2012). Evaluación de cuatro métodos para la detección de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente de muestras clínicas en un hospital regional. *Salud Pública de México*, 54(1), 6.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2018). *Formulário de Fitoterápicos. Farmacopeia Brasileira. Primeiro Suplemento*. (1.ª ed.). <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/259456/Suplemento+FFFB.pdf/478d1f83-7a0d-48aa-9815-37dbc6b29f9a>
- Alves, A. O., Oliveira, R. M., Weiss, G. C., Bonadiman, B. S. & Cruz, I. B. (2016). *Análise fitoquímica e avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana de Maytenus ilicifolia*. 7. <https://pdfs.semanticscholar.org/f84c/2d13861d333161f1c0bab994124405ab150a.pdf>
- Boyle-Vavra, S. & Daum, R. (2007). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: The role of Pantone-Valentine leukocidin. *Laboratory Investigation*, 87(1), 3-9. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700501>
- Cabral, M., Akisue, M., Andrade, M., Moreira, R. de C., Ymago, M. R. & Ciocler, E. (1989). Contribuição ao estudo dos efeitos farmacológicos da *Maytenus ilicifolia*, Martius (Espinheira Santa). *Arquivos médicos do ABC*, 12(1-2), 30-33. <https://www.portalnepas.org.br/amabc/article/view/494>
- Campos, J. C., Arrais, I. L., Medeiros, J., Pereira, L. & Gondim, A. M. (2015). Ação antibacteriana de *Rosmarinus officinalis* L. e *Maytenus ilicifolia* Mart. Sobre bactérias orais. *Revista da Faculdade de Odontologia - UPF*, 20(3), 313-318. <https://doi.org/10.5335/rfo.v20i3.5387>
- Carrión, A. V. & García, C. R. (2010). Preparación de extractos vegetales: Determinación de eficiencia de metódica [de Cuenca]. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2483/1/tq1005.pdf>
- Cataldo, K., Jacquett, N., Fariña, N., Pereira, A., Rodríguez, F., Guillén, R. & Russomando, G. (2014). Portación de *Staphylococcus aureus* multiresistentes a antimicrobianos en cavidad bucal de niños que concurren para un tratamiento en una clínica odontológica, Paraguay. *Pediatr.(Asunción)* 41(3),201-207. Disponible en: <https://revistaspp.org/index.php/pediatria/article/view/133/133>
- Cerqueira, J., Silva, I., Fonseca, M., Souza, I., Jesus, K., Barbosa, A. F. & Yatsuda, R. (2013). Avaliação antimicrobiana dos extratos etanólicos da *Maytenus* sp. (Galho e casca) sobre estreptococos do grupo mutans. *Diálogos & Ciência*, 11(34), 50-53. <https://doi.org/10.7447/dc.2013.011>
- Colacite, J. (2015). Triagem Fitoquímica, Análise Antimicrobiana e Citotóxica e dos Extratos das Plantas: *Schinus terebinthifolia*, *Maytenus ilicifolia* Reissek, *Tabebuia avellaneda*, *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. *Saúde e Pesquisa*, 8(3), 509-516. <https://doi.org/10.17765/1983-1870.2015v8n3p509-516>

- Degen, R. & González, Y. (2014). Plantas utilizadas en la medicina popular paraguaya como antiinflamatorias. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 13(3), 213-231. Disponible en: <http://www.revistas.usach.cl/ojs/index.php/blacpma/article/view/1508/1395>
- Del Castillo, A., Molineras, P., Campo, M. & Bettin, A. (2017). Actividad antibacteriana del extracto total de hojas de Cucurbita moschata Duchesne (Ahuyama). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 22(1), 1-13. <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v22n1/pla09117.pdf>
- Diomedi, A., Chacón, E., Delpiano, L., Hervé, B., Jemenao, M. I., Medel, M... Cifuentes, M. (2017). Antisépticos y desinfectantes: Apuntando al uso racional. Recomendaciones del Comité Consultivo de Infecciones Asociadas a la Atención de Salud, Sociedad Chilena de Infectología. *Revista chilena de infectología*, 34(2), 156-174. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182017000200010>
- Dirección Nacional de Vigilancia Sanitaria. (2016). Política Nacional de Medicamentos. Paraguay 2015. OPS/OMS. Disponible en: <https://www.mspbs.gov.py/dependencias/portal/adjunto/ab85d7-PoliticaNacionaldeMedicamentosParaguay2015.pdf>
- Ducat, G., Torres, Y. R., Dalla, H. S., Caetano, I. K., Kleinubing, S. A., Stock, D...Quináia, S. P. (2011). Correlation among metallic ions, phenolic compounds and antimicrobial action in medicinal plants extracts: Metals, phenolics and antimicrobial action in plants. *Journal of Food Quality*, 34(5), 306-314. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2011.00403.x>
- Ferreira, H. (2019). *Avaliação da atividade antibacteriana de extratos de plantas medicinais: Significância sanitária em região de tríplice fronteira*. Tese de Doutorado, Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de Paulo, Ribeirão Preto. doi:10.11606/T.22.2019.tde20052019-202640. [www.teses.usp.br](http://www.teses.usp.br)
- Gamboa, F. O. (2014). Identificación y caracterización microbiológica, fenotípica y genotípica del *Streptococcus mutans*: Experiencias de investigación. *Universitas Odontológica*, 33(71), 65 - 73. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.uo33-71.icmf>
- González, A. A. (2004). Obtención de aceites esenciales y extractos etanolicos de plantas del Amazonas [Nacional de Colombia]. [https://www.researchgate.net/publication/38975471\\_Obtencion\\_de\\_aceites\\_esenciales\\_y\\_extractos\\_etanolicos\\_de\\_plantas\\_del\\_Amazonas](https://www.researchgate.net/publication/38975471_Obtencion_de_aceites_esenciales_y_extractos_etanolicos_de_plantas_del_Amazonas)
- Gutiérrez, J., Bagán, J., Bascones, A., Llamas, R., Llena, J., Morales, A...Salmerón, J. (2006). Documento de consenso sobre la utilización de profilaxis antibiótica en cirugía y procedimientos dentales. *Avances en Odontostomatología*, 22(1), 41-67. <http://scielo.isciii.es/pdf/odonto/v22n1/original4.pdf>
- Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. (2001). *Política Nacional de Medicamentos. Paraguay 2001*. Disponible en: <http://www2.paho.org/hq/dmdocuments/2009/Paraguay%20Politica%20nal%20m%20tos%202001.pdf>
- Montanari, T. & Bevilacqua, E. (2002). Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. On pregnant mice. *Contraception*, 65(2), 171-175. [https://doi.org/10.1016/S0010-7824\(01\)00301-8](https://doi.org/10.1016/S0010-7824(01)00301-8)
- Ojeda Pereda, M. C. & Beltrán Orbegoso, R. A. (2019). Efecto antimicrobiano in vitro de los extractos de *Allium sativum* y *Zingiber officinale* frente a *Staphylococcus aureus*. *Rev. UCV-SCIENTIA*, 10(2), 152-159. Disponible en: <https://doi.org/10.18050/RevUcv-Scientia.v10n2a4>
- Ojeda-Garcés, J. C., Oviedo-García, E. & Salas, L. A. (2013). *Streptococcus mutans* and dental caries. *Revista CES Odontología*, 26(1), 44-56. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/262501682\\_Streptococcus\\_mutans\\_and\\_dental\\_caries](https://www.researchgate.net/publication/262501682_Streptococcus_mutans_and_dental_caries)
- Pabón, L. C., Rodríguez, M. F. & Hernández-Rodríguez, P. (2017). Plantas medicinales que se comercializan en Bogotá (Colombia) para el tratamiento de enfermedades infecciosas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 16(6), 529-546.
- Ramírez, L. S. & Marin, D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia Et Technica*, 15(42), 263-268. <https://www.redalyc.org/pdf/849/84916714049.pdf>
- Rivadeneira-Cajas, D. & Álvarez-Velasco, P. (2015). Essential oil *Schinus molle* L. (Molle) as an antimicrobial potential on *Streptococcus mutans*. Study in vitro. *Revista KIRU*, 12(2), 8-14. <https://www.aulavirtualusmp.pe/ojs/index.php/Rev-Kiru0/article/view/753/590>
- Salinas, R., García, M. & Velásquez, A. (2016). Biotecnología y etnomedicina para el desarrollo humano. *Ciencia Revista Científica*, 9(2), 46-55. <https://doi.org/10.5377/creaciencia.v9i2.2874>
- Santos-Oliveira, R., Coulaud-Cunha, S. & Colaço, W. (2009). Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(2b), 650-659. <https://doi.org/10.1590/S0102695X2009000400025>

- Serrano-Coll, H. A., Sánchez-Jiménez, M. & Cardona-Castro, N. (2015). Conocimiento de la microbiota de la cavidad oral a través de la metagenómica *Revista CES Odontología*, 28(2), 112-118. <http://www.scielo.org.co/pdf/ceso/v28n2/v28n2a09.pdf>
- Servicios antimicrobianos Dr. Carlos G. Malbrán. (2012). *Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución. MIC testing* (Vol. 32). Clinical and Laboratory standards institute. <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/04-DETERMINACION-DE-LA-SENSIBILIDAD-METODO-DE-DILUCION-2012.pdf>
- Sharapin, N., Alonso, J., Henriques, A., Zuanazzi, J., Mentz, L., Nunes, E...Cañigual, S. (2006). Hoja de congrosa (Mayteni folium). *Revista de fitoterapia*, 6(11), 2943. [https://www.fitoterapia.net/php/descargar\\_documento.php?id=4665&doc\\_r=sn&num\\_volumen=15&secc\\_volumen=5956](https://www.fitoterapia.net/php/descargar_documento.php?id=4665&doc_r=sn&num_volumen=15&secc_volumen=5956)
- Smith, A., Jackson, M. & Bagg, J. (2001). The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. *Journal of Medical Microbiology*, 50(11), 940-946. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-11-940>
- Tabach, R., Duarte-Almeida, J. & Carlini, E. (2017). Pharmacological and Toxicological Study of *Maytenus ilicifolia*. Leaf Extract Part II-Clinical Study (Phase I): *Maytenus ilicifolia*. Clinical Study. *Phytotherapy Research*, 31(6), 921-926. <https://doi.org/10.1002/ptr.5816>
- Toran, J., Martinon, F., Farinati, A. & Doloisio, N. (2013). Actividad antimicrobiana de extracto alcohólico de *Maytenus ilicifolia* sobre aislamientos de *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*. 45, 94. [http://www.aam.org.ar/src/img\\_up/18102014.0.pdf](http://www.aam.org.ar/src/img_up/18102014.0.pdf)
- Yevenes, I., Reyes, J., Campos, N. & Saragoni, V. (2003). Efecto inhibitorio en placa microbiana y propiedades antibacterianas de enjuagatorios de clorhexidina. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*, 15(1), 19-24. <https://doi.org/10.4321/S1699-65852003000100003>