



**Efecto de la *Moringa oleifera* sobre los microorganismos de cavidad oral, estudio in vitro en
Villavicencio (Colombia)**

Ingrith Daniela Martínez Velásquez

20571916393

Valeryn Camila Velásquez Mahecha

20571916524

Yorlay Natalia Arenas Rodríguez

20571811924

Universidad Antonio Nariño

Programa de Odontología

Facultad de Odontología

Villavicencio, Colombia

2023

**Efecto de la *Moringa oleifera* sobre los microorganismos de cavidad oral, estudio in vitro en
Villavicencio (Colombia)**

Ingrith Daniela Martínez Velásquez
20571916393

Valeryn Camila Velásquez Mahecha
20571916524

Yorlay Natalia Arenas Rodríguez
20571811924

Proyecto de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:

Odontólogo

Director (a):

Jorge Orlando Cuellar Mancilla

DDs of the El Bosque University (Colombia)

Specialist in Management Applied to Health Services of the Pontifical Javeriana University (PUJ),), School of Dentistry, Araçatuba (Brazil) Professor in Research Degree Work and Paediatric Dentistry of the Antonio Nariño University (UAN), School of Dentistry

Codirector (a):

Yolanda Milena Acuña Mayorga

Bacteriología

Línea de Investigación:

Ciencias Odontológicas

Universidad Antonio Nariño

Programa de Odontología

Facultad de Odontología

Villavicencio, Colombia

2023

NOTA DE ACEPTACIÓN

47

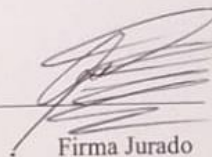
El trabajo de grado titulado Efecto de la *Moringa oleifera* sobre los microorganismos de cavidad oral, estudio in vitro en Villavicencio (Colombia)
Cumple con los requisitos para optar
El título de Odontólogo.



Firma del Tutor

Karen Giselle Rodríguez C.

Firma Jurado



Firma Jurado

Dedicatoria

Primero a Dios por permitirnos llegar a este punto y por la sabiduría otorgada, a nuestros padres por su esfuerzo durante años para formar individuos con valores, por su paciencia y amor incondicional. A todos aquellos que nos acompañaron y apoyaron en este proceso académico y profesional.

Agradecimientos

A las Universidades Antonio Nariño (UAN) y a la Universidad de los Llanos que nos abrieron las puertas para la ejecución de esta investigación.

A la estudiante de biología Fany Yulieth Gordillo León por apoyarnos desde sus conocimientos y actitudes en el ámbito de la biología y la Doctora Karen Giselle Rodríguez Castro por brindarnos el apoyo y la confianza en el transcurso de la elaboración de nuestro trabajo de grado.

A nuestro asesor el Doctor Jorge Orlando Francisco Cuellar Mancilla por guiar nuestro proyecto, por su tiempo y dedicación en la orientación de nuestro proceso formativo.

Tabla de contenido

1	Resumen	11
2	Abstract.....	13
3	Introducción.....	15
4	Planteamiento de problema	17
4.1	Pregunta problema.....	19
5	Objetivos.....	20
5.1	Objetivo general	20
5.2	Objetivos específicos	20
6	Hipótesis	21
6.1	Hipótesis nula:.....	21
6.2	Hipótesis alternativa:.....	21
7	Justificación.....	22
8	Marco teórico.....	24
8.1	La cavidad oral.....	24
8.1.1.	La microbiota oral.....	24
8.1.2.	Enfermedades de cavidad oral	24
8.2	Clorhexidina	25
8.3	Extractos metabólicos	26

8.3.1.	La <i>Moringa oleifera</i>	26
8.3.2.	Fitoquímico	27
8.3.3.	Los metabolitos secundarios	27
8.4	Antimicrobiano.....	28
8.5	Pruebas de sensibilidad.....	28
8.6	Cultivo dilución en agar.....	29
9	Metodologías	30
9.1	Población de Estudio y Muestra de microbiota oral	30
9.2	Obtención de extracto de <i>Moringa oleifera</i>	30
9.2.1.	Percolación en frío	30
10	Obtención de la muestra (Hisopado bucal).....	31
10.1	Criterios de inclusión	32
10.2	Criterios exclusión	32
11	Fase experimental (Laboratorio de microbiología)	32
11.1	Prueba piloto	32
11.2	Dilución en agar	33
11.3	Aislamiento de microorganismos y observación	34
12	Manejo estadístico	35
12.1	Análisis de datos	35
13	Resultado	37
13.1	Prueba piloto	37

13.2	Resultados estudio.....	37
13.2.1.	Anova. Diseño cuadrado latino (DCL)	38
13.2.2.	Hipótesis para paciente.....	40
13.2.3.	Hipótesis para tratamientos	40
13.2.4.	Prueba de Tukey HSD de comparaciones múltiples.....	42
13.2.5.	Prueba de LSD.....	43
14	Discusión	44
15	Conclusiones.....	47
16	Referencias bibliográficas	48

Lista de tablas

Tabla 1 Variables. Descripción de variables asociadas al planteamiento metodológico y objetivo del trabajo.....	36
Tabla 2 Summary del anova. dcl en Agar mackoncey.....	40
Tabla 3 Summary del anova dcl en Agar Sangre.....	41

Lista de figuras

Figura 1 Diagrama de cajas y bigotes del anova en Agar MacConkey.	38
Figura 2 Diagrama de cajas y bigotes del anova en Agar Sangre.....	39
Figura 3 Test de Tukey HDS.	42
Figura 4 Test. LSD. Grafica.....	43

1 Resumen

En la actualidad son varios los estudios que se han enfocado en evaluar la capacidad antimicrobiana que presentan los metabolitos secundarios en las plantas, dado que esta podría ser una alternativa para el tratamiento de diversas implicaciones en la salud, tanto bucal como general. El principal objetivo del trabajo fue evaluar el efecto inhibitorio de los extractos metabólicos de la *Moringa oleifera* sobre los microorganismos presentes en muestras recolectadas en cavidad oral de pacientes de Villavicencio - Meta. Se llevó a cabo un proceso de extracción de metabolitos secundarios implementado la técnica de percolación en frío, posteriormente el extracto resultante fue llevado a rotavapor. Adicionalmente se realizó un gradiente de disoluciones, para evaluar aquellas con mayor efecto antimicrobiano y a partir de esto plantear concentraciones estándar con las cuales se realizó un proceso de diluciones en agar. El estudio se centró en las muestras de cavidad oral (hisopadas) extraídas de los pacientes voluntarios. Con tres repeticiones para cada concentración, tres para el paciente sano (control), tres para el paciente con gingivitis y tres para el paciente con periodontitis, con el fin de disminuir el margen de error estadístico, estableciendo tres tipos de tratamientos diferentes, considerando las concentraciones y el control. Para la evaluación del efecto se realizó un conteo de colonias de microorganismos para cada concentración, con el fin de contrastar tratamientos, tipo de paciente y número de colonias en una prueba de comparaciones múltiples,

adicionalmente se realizaron observaciones cualitativas frente a la inhibición de la proliferación. Como resultado se encontró que existe un efecto inhibitorio de los extractos de *Moringa oleifera* frente a la proliferación de microorganismos de cavidad oral, con una mínima concentración de eficacia sobre las 1500 ppm, además la efectividad de los tratamientos no discrimina en el tipo de paciente, para complicaciones generadas por grupos de bacterias Gram

positivas. Este estudio podría tenerse en cuenta en futuros trabajos como base para una investigación mucho más amplia, que ofrezca otra alternativa para el control de enfermedades en cavidad oral a través de la fitoquímica.

palabras claves: fitoquímico, inhibitorio, metabolitos, antimicrobiano, cavidad oral, extracción.

2 Abstract

Currently, several studies have focused on evaluating the antimicrobial capacity of secondary metabolites in plants, given that this could be an alternative for the treatment of various health implications, both oral and general. The main objective of the work was to evaluate the inhibitory effect of the metabolic extracts of *Moringa oleifera* on the microorganisms present in samples collected from the oral cavity of patients from Villavicencio - Meta. An extraction process of secondary metabolites was carried out using the cold percolation technique; subsequently, the resulting extract was taken to a rotary evaporator. Additionally, a gradient of solutions was carried out to evaluate those with the greatest antimicrobial effect and from this to propose standard concentrations with which a dilution process was carried out in agar. The study focused on oral cavity samples (swabs) taken from volunteer patients. With three repetitions for each concentration, three for the healthy patient (control), three for the patient with gingivitis and three for the patient with periodontitis, in order to reduce the margin of statistical error, establishing three types of different treatments, considering the concentrations and control. To evaluate the effect, a count of microorganism colonies was carried out for each concentration, in order to contrast treatments, type of patient and number of colonies in a multiple comparisons test. Additionally, qualitative observations were made against the inhibition of proliferation.

Additionally, qualitative observations were made regarding the inhibition of proliferation. As a result, it was found that there is an inhibitory effect of *Moringa oleifera* extracts against the proliferation of microorganisms in the oral cavity, with a minimum effective concentration above 1500 ppm. Furthermore, the effectiveness of the treatments does not discriminate according to the type of patient. for complications generated by groups of Gram positive bacteria. This study

could be taken into account in future works as a basis for a much broader investigation, which offers another alternative for the control of diseases in the oral cavity through phytochemistry.

Keywords: phytochemical, inhibitory, metabolites, antimicrobial, oral cavity, extraction.

3 Introducción

La cavidad oral tiene una gran concentración microbiana, superada solo por el tracto gastrointestinal. Asimismo, la microbiota oral, es el sitio con mayor diversidad de microorganismos y algunas de estas están asociadas a afecciones sistémicas (Matesanz-Pérez *et al.*, 2008), además la cavidad oral está compuesta por distintos microambientes, cada uno sujeto a características específicas (Lamont *et al.*, 2018).

Entre las enfermedades producidas en la cavidad oral por la alteración de la microbiota oral, se distingue el desarrollo de biopelículas, las cuales se forman por un desequilibrio que ocasiona el crecimiento excesivo de algunos microorganismos que producen sustancias dañinas (Yumoto *et al.*, 2019). Lo que se conoce como placa dental es una biopelícula constituida en el esmalte dental y es la principal causa de caries, periodontitis y gingivitis, enfermedades dentales más comunes en todo el mundo (Lamont *et al.*, 2018), las cuales son tratadas principalmente con productos sintéticos y algunos otros farmacológicos los cuales están perdiendo su eficacia.

Algunos extractos acuosos y etanólicos de diversas plantas se han postulado como una opción eficaz y menos adversa para tratar este tipo de complicaciones relacionadas con microorganismos de cavidad oral, entre estos extractos encontramos los metabolitos secundarios presentes en las hojas de *M. oleifera*, a estos se les adjudican propiedades antibacterianas prometedoras, con efectos inhibidores significativos sobre especies Gram positivas y sobre especies Gram negativas (Matic *et al.*, 2020). Además, se ha demostrado que el extracto de etanol de hojas de *M. oleifera* presenta el radio de inhibición medio más alto contra el crecimiento de microorganismos mutantes de *S. aureus* y *Streptococcus sp*, los cuales son causantes de algunas complicaciones en cavidad oral, durante comparaciones realizadas por

Matic *et al.*, 2020 entre una pasta de dientes experimental que contenía el extracto de diferentes partes de la planta de *M. oleifera* y el enjuague bucal convencional.

4 Planteamiento de problema

La presencia de distintos microorganismos orales se asocian como un factor de riesgo para diversas enfermedades (He *et al.*, 2015). La proliferación bacteriana está sujeta a cambios directos en el ecosistema oral (Ph, flujo salivar, temperatura), lo que promueve la aparición de diferentes agentes patógenos (Eraso, n.d.). Algunas comunidades polimicrobianas representativas de la caries dental y periodontitis muestran una compleja integración estructural y funcional (Lamont *et al.*, 2018). La caries dental y las enfermedades periodontales están relacionadas con la placa bacteriana a nivel supra y subgingival (Doherty, 2016). Sin embargo, no son las únicas, pues existen diferentes microorganismos que se adhieren a las distintas estructuras orales como las superficies dentales, lengua, surco gingival y mucosa oral (García, 2015).

Para mantener la salud oral se emplean distintas herramientas, entre éstas el cepillo dental, dentífricos, hilo dental y antisépticos bucales (“Improving Periodontal Outcomes: Merging Clinical and Behavioral Science,” 2016). (Mouchrek Junior *et al.*, 2015;Wessel *et al.*, 2016). El gluconato de clorhexidina (CHX) es el antiséptico bucal de primera elección (Supranoto *et al.*, 2015). Un estudio realizado por Løe y Schiott en 1970, en el cual se demostró que realizar un colutorio con gluconato de clorhexidina al 0,2% dos veces al día durante 60 segundos, sin realizar un cepillado normal, tiene como resultado la inhibición de la formación de la placa dental y con esto el progreso de gingivitis, sin embargo, su uso es limitado, ya que al utilizarse por un tiempo prolongado trae como consecuencia trastornos temporales del gusto y tinción de los dientes (Tartaglia *et al.*, 2017; Kulik *et al.*, 2015).

La implementación de sustancias antimicrobianas que controlan la proliferación de bacterias que hacen parte de la microbiota oral, son continuamente estudiadas. La fitoterapia es

una técnica en donde se utilizan plantas y sustancias vegetales para tratar diversas enfermedades (Moyo, 2012). La planta *Moringa oleifera* en la salud bucal tiene antecedentes ancestrales, este uso ha sido ratificado por diversas investigaciones científicas que mencionan sus efectos analgésico, antiinflamatorio, cicatrizante y antimicrobiano (Rathi *et al.*, 2006; Manaheji *et al.*, 2011; Chiedozi *et al.*, 2016a; Alarcón *et al.*, 2017).

En el año 2020 se vio un incremento del consumo de la *Moringa oleifera*, producto de la pandemia producida por el virus SARS- CoV-2 (Covid 19), ya que presenta una alta concentración de nutrientes que ayuda a combatir los radicales libres, dada su función antioxidante se consideró como una alternativa natural, que junto a otras plantas se convirtió en una elección casera para contrarrestar este virus (*Y BIOQUÍMICA*, 2021).

Se han realizado estudios en los cuales se evalúan los efectos de la *Moringa oleifera* sobre microorganismos de cavidad oral a partir de extractos obtenidos de sus diferentes partes, en donde se difiere en concentraciones y disolventes (Vieira *et al.*, 2010; Sayeed *et al.*, 2012; Alarcón *et al.*, 2017). De tal forma la *Moringa oleifera* se muestra como una alternativa en la prevención y tratamiento de enfermedades relacionadas con microorganismos de cavidad oral (Alarcón *et al.*, 2017). Por otra parte, si se tiene en cuenta la agresividad de algunos fármacos, así como uno de los problemas más complejos actualmente frente a la resistencia a los antimicrobianos, esta planta se reconoce como una opción para el desarrollo de nuevos tratamientos con variaciones farmacológicas, sin embargo, todavía se observa un gran vacío de información sobre el efecto de la *Moringa oleifera* en el tejido bucal, sus rutas de acción, concentraciones base y efectos secundarios. Por tanto, este estudio plantea identificar:

4.1 Pregunta problema

¿Cuál es el efecto de los metabolitos secundarios de extractos de *Moringa oleifera* en diferentes concentraciones sobre microorganismos de la cavidad oral?

5 Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto inhibitorio de los extractos metabólicos de la *Moringa oleifera* sobre los microorganismos presentes en muestras recolectadas en cavidad oral de pacientes voluntarios de Villavicencio - Meta.

5.2 Objetivos específicos

- Identificar la capacidad antimicrobiana de los extractos de *moringa oleifera* frente a los microorganismos de cavidad oral.
- Relacionar la variable número de colonias frente a cada una de las concentraciones de metabolitos secundarios de *Moringa oleifera*, con el fin de referir una concentración mínima óptima con efectos significativos sobre la proliferación de microorganismos correspondientes a diferentes enfermedades en cavidad oral.

6 Hipótesis

6.1 Hipótesis nula:

Los extractos de metabolitos secundarios de *Moringa oleifera* no inciden sobre la proliferación y formación de colonias de los microorganismos de cavidad oral.

6.2 Hipótesis alternativa:

Hay un efecto de los extractos de *Moringa oleifera* sobre la proliferación y formación de colonias de microorganismos de cavidad oral.

7 Justificación

La cavidad oral está compuesta por diferente microhábitats, estos dependen de diversos factores como “las concentraciones de oxígeno, la disponibilidad de nutrientes, la temperatura, la exposición a factores inmunológicos y las características anatómicas” en estos se encuentran una gran cantidad de microorganismos, algunos de ellos relacionados con enfermedades comunes, como lo son la caries y la enfermedad periodontal (Cruz Quintana *et al.*, 2017).

Para el año 2015 según el estudio nacional de salud bucal (ENSAB) se encontró que 9 de cada 10 colombianos presentan condiciones que afectan su salud bucal, lo que ha llevado a que se considere como una condición de salud pública. Teniendo en cuenta esto, se han buscado diferentes métodos para combatir estas enfermedades, con el fin de mejorar la salud bucal de los colombiano (Sayeed *et al.*, 2012; Mitchel Otieno *et al.*, 2016; Alsaraf *et al.*, 2016).

Ahora bien, una de las formas de combatir las bacterias de la cavidad oral que causan las enfermedades más comunes, es por medio de extractos de metabolitos secundarios vegetales, entre estos los de *Moringa oleífera* (Mo) (Moyo, 2012). Los metabolitos secundarios son activos que contienen una gran cantidad de productos químicos que pueden ayudar a inhibir el crecimiento bacteriano, actuando con los mismo mecanismo que los de un antibiótico como por ejemplo: contribuyendo con la inhibición de la síntesis de la pared celular y la activación de enzimas que destruyen esa pared, alterando sus ácidos nucleicos (He *et al.*, 2015).

Son bastantes las investigaciones que se han generado en torno al estudio de productos medicinales a base de extractos de las plantas, dado que presentan un amplio impacto por sus cantidad de beneficios a nivel de cavidad oral como antibiótico, antiespasmódico, cicatrizante,

por esto en la industria la venta de productos medicinales a base de plantas ha incrementado su venta de 7 a 15% anualmente (Alarcón *et al.*, 2017).

Teniendo en cuenta la problemática planteada, el hecho de estudiar la eficacia de los metabolitos secundarios de *Moringa oleífera* en los cuales ya se ha demostrado que existe un efecto controlador frente a la proliferación de algunos microorganismos tanto gram + y gram – en cavidad oral, a diferentes concentraciones (Sayeed *et al.*, 2012), es una opción de tratamiento y prevención de las enfermedades más comunes que se pueden encontrar en cavidad oral (Alarcón *et al.*, 2017).

8 Marco teórico

8.1 La cavidad oral

La cavidad oral está constituida por múltiples microambientes (paladar, lengua, encía mejillas, superficie dentales y saliva), los cuales comprenden su propia microbiota, esto incide sobre la variación de su composición según la superficie (mucosa o tejido dental) y los lugares que las componen (surcos o fisuras) (Marsh & Percival, 2006).

8.1.1. La microbiota oral

La microbiota oral es una parte de la cavidad oral y representa una parte importante de la microbiota humana, su función principal es proteger y controlar la colonización de bacterias extrínsecas que podrían afectar la salud general (Walker, 2016). Está integrada por una amplia gama de bacterias Gram positivas y Gram negativas, entre las cuales se encuentran las especies anaerobias facultativas y anaerobias estrictas (HOFFMAN, 1957).

8.1.2. Enfermedades de cavidad oral

Algunas de las enfermedades de cavidad oral más conocidas son la caries dental y las enfermedades periodontales, que se consideran patologías inflamatorias crónicas multifactoriales (Kinane *et al.*, 2017). Dentro de las cuales se encuentran la gingivitis y la periodontitis. La

gingivitis se propicia por la acumulación de biofilm dental, por ausencia de un cepillado adecuado y es un estado de inflamación localizado en la encía, en donde se presenta sangrado, es considerada una enfermedad reversible que, si no se trata de forma pertinente, aumenta el factor de riesgo a desarrollar de una periodontitis (Trombelli *et al.*, 2018), cuya característica principal es la pérdida ósea a nivel de los tejidos de soporte.

Los principales agentes causales de la periodontitis crónica son *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythia*, en donde *P. gingivalis* es el microorganismo más patógeno dentro de la categoría de bacilos anaerobios Gram negativos (Mujica Troncoso *et al.*, 2010). Frente a las enfermedades como la gingivitis esta puede ser propiciada por algunas bacterias en su mayoría gram negativas, tales como *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, *Streptococcus* y entre otros microorganismos (Martínez & Ruiz, 2005).

8.2 Clorhexidina

Se han empleado herramientas para disminuir la carga bacteriana de cavidad oral, entre los más utilizados actualmente encontramos la clorhexidina (gluconato de clorhexidina), que es considerada una de los principales antisépticos en el uso odontológico, ya que presenta un amplio espectro antimicrobiano (Mileydi de la Torres López *et al.*, 2009). Sin embargo, no se recomienda un uso constante, dado que presenta algunos efectos secundarios asociados a los colutorios con contenido de alcohol (etanol), en donde se pueden generar reacciones en los tejidos duros como desmineralización y tinción del esmalte, junto a alteraciones en el gusto y en la mucosa oral (Blanco Carrión & Otero Rey, 2014).

8.3 Extractos metabólicos

Los extractos son compuestos presentes en los tejidos de las plantas, provenientes de la obtención de sustancias activas, que son generadas por una extracción adecuada y solventes como agua, etanol u otro solvente selectivo. A partir de esto hay estudios que abordan el uso de extractos de compuestos naturales para reducir la carga bacteriana en cavidad oral. Algunos productos vegetales como “(la manzanilla, el cacao, el aloe, la moringa, el orégano, coco, ajo, clavo, cardamomo, entre otros)” se relacionan como una alternativa terapéutica ((Santos-Zambrano *et al.*, 2020). Existe diversa literatura sobre los efectos de los productos naturales como tratamientos alternativos a variadas complicaciones.

8.3.1. La *Moringa oleifera*

La *Moringa oleifera* es una especie arbórea no endémica de Colombia, su origen es de los Himalayas y es un árbol de crecimiento acelerado que alcanza alrededor de 10-12 metros de altura (Liñán, 2010). Tiene caracteres xerófilos, además de ser viable a nivel agronómico. Esta planta posee innumerables propiedades, diversos estudios corroboran las propiedades medicinales de la *Moringa oleifera* como antioxidante, en el sistema nervioso central, cáncer, en el sistema inmunológico, antiviral y antibacteriano (Jung, 2014).

8.3.2. Fitoquímico

Son sustancias químicas que se producen por las plantas y generan un impacto en la salud, la textura, el olor, el sabor o el color de las plantas. Los metabolitos secundarios tienen caracteres fitoquímicos y los más representativos de la *Moringa oleifera* son los taninos, saponinas y polifenoles (Más Toro *et al.*, 2017).

8.3.3. Los metabolitos secundarios

Son compuestos obtenidos a partir del metabolismo primario de las plantas y tienen un papel ecológico importante puesto que presentan múltiples funciones en la especie vegetal (Augustin *et al.*, 2011), considerados como una fuente de principios activos para medicamentos y productos químicos (Isaza M., 2004). A partir de esto, se indica que están involucrados en funciones que favorecen la adecuación de mecanismos adaptativos en la planta (Mendes *et al.*, 2012).

La *Moringa oleifera* y sus extractos son de amplia aplicabilidad en términos de tratamientos alternativos, esto es debido a que en sus metabolitos secundarios se encuentran grandes potenciales de acción, que a su vez generan reacciones biológicas, entre estas su capacidad antibacteriana que es ocasionada por el (4-(β -D-glucopyranosyl -1 \rightarrow 4- β L-trhamnopyranosyloxy)-benzyl thiocarboxamide), teniendo en cuenta que son muchos más los compuestos químicos que constituyen los metabolitos de esta planta (Bijina *et al.*, 2011).

8.4 Antimicrobiano

La capacidad que tiene un compuesto de inhibir el aumento de la población bacteriana o de eliminarla es considerado un efecto antimicrobiano (Rathi *et al.*, 2006; Manaheji *et al.*, 2011; Chiedozie *et al.*, 2016b). Partiendo de esto, se encontraron estudios bacteriológicos que evidencian la actividad antimicrobiana de los extractos de *Moringa oleifera*, los cuales aglomeran bacterias Gram positivas y Gram negativas. Su acción bacteriostática se ve reflejada en la destrucción de la membrana celular, por medio de la inhibición de enzimas esenciales (Suarez *et al.*, 2003).

8.5 Pruebas de sensibilidad

Una prueba de sensibilidad no permite realizar una predicción mediante un experimento *in vitro*, observar una respuesta de un determinado antibiótico, la evolución de una infección y detectar resistencia relevante de los organismos a diversos procesos dañinos para el mismo (Jorgensen & Ferraro, 1998). Existen distintos métodos para llevar a cabo pruebas de sensibilidad, algunos de ellos son la difusión en agar (Técnica de Bauer & Kirby), dilución en agar, microdilución en caldo y métodos especializados, entre muchos otros (Jorgensen & Ferraro, 1998). Sin importar el método a emplear, existen tres pasos fundamentales, los cuales son; el medio de cultivo que se emplea, el antibiótico (antibacteriano, antifúngico) y la cepa bacteriana o colonia. Cualquiera que sea el método se hace necesario controlar cada una de estas tres variables (Kulik *et al.*, 2015).

8.6 Cultivo dilución en agar

Se incorpora el antimicrobiano a un medio con agar, este se adiciona cuando el medio aún se encuentra en estado líquido. Para alcanzar el rango de dilución deseado se preparan una serie de placas, cada una con una concentración específica de antimicrobiano. El número de placas para cada concentración a preparar será dado por el número de microorganismos que se vayan a estudiar. En la mayoría de las situaciones, el medio de cultivo a emplear es agar Mueller-Hinton, pero en función de los microorganismos y de sus necesidades nutritivas puede ser necesario agregar algún suplemento a este medio, o emplear un medio diferente (Zhurbenko, Raisa; Viera Oramas, Diana Rosa; Rodríguez Martínez, Claudio; Ortega Surís, 2010)

9 Metodologías

9.1 Población de Estudio y Muestra de microbiota oral

El estudio se centró en las muestras de microbiota de cavidad oral, por medio de hisopos (método de frotis en carrillo, lengua y encía) extraídas de voluntarios (adultos, hombres y mujeres mayores de edad) de Villavicencio, Meta, los cuales tenían características específicas de inclusión; estos firmaron con antelación un consentimiento en donde admiten su participación en el estudio. Fueron nueve repeticiones por concentración, teniendo en cuenta que son tres concentraciones, más el control, tres para el paciente sano (control), tres para el paciente con gingivitis y tres para el paciente con periodontitis (Triplicata) respectivamente a cada una de estas se le realizaron dos siembras con el fin de disminuir el margen de error estadístico.

9.2 Obtención de extracto de *Moringa oleifera*

9.2.1. Percolación en frío

El material seco de *Moringa oleifera* paso por un proceso de molienda y tamizado, separando el material vegetal por tamaño hasta conseguir una homogeneidad, posteriormente fue separado en cantidades de 500 g. La solución extractora estuvo constituida por 70% de etanol y 30% de agua destilada, metodología tomada y modificada de (Eni, 1967)

Se llevo a cabo un proceso de percolación en frío, para evitar que los metabolitos extraídos puedan alterarse. Las extracciones sólido-líquido se llevaron a cabo implementando dos embudos de decantación, ubicados verticalmente con ayuda de un soporte universal, el superior contenía la mezcla de etanol 70% y agua 30% y el inferior se organizó de la siguiente forma; en su base se ubicó un algodón, posteriormente un papel filtro y se adiciono el material vegetal más delgado seguido del más grueso, y se ubicó nuevamente papel filtro, se adecuo para mantener un goteo constante, hasta terminar la extracción del metabolito. Posteriormente el extracto fue llevado al rotavapor en dónde se obtuvo un extracto madre (pasta), el cual fue pesado para evaluar su porcentaje de recuperación, para llevar a aforo y evaluar la concentración en ppm.

Con el extracto madre obtenido, se realizaron diluciones 5.000 ppm, 15.000 ppm, 30.000 ppm, 36.000 ppm, esto con la ayuda de probeta volumétrica.

10 Obtención de la muestra (Hisopado bucal)

Los voluntarios no se vieron expuestos a riesgo alguno frente a los procedimientos mínimamente invasivos, como lo son hisopado bucal y fotografías que fuesen necesarias, conforme a los principios éticos de las normas anteriores, de la Ley 35 de 1989, de la resolución 1995 de 1999 y de la Ley 2015 de 2020. Días previos a la toma de muestras se realizó una evaluación a cada uno de los pacientes para verificar su diagnóstico.

Para la toma de muestras, se ubicó al voluntario de forma óptima y se realizó un hisopado de toda la mucosa oral, (por paciente se hizo una toma de cuatro hisopados), y posteriormente se realizaron las siembras inmediatas en los medios correspondientes.

10.1 Criterios de inclusión

Pacientes mayores de 20 años. Los casos fueron pacientes con gingivitis y periodontitis. En los controles tuvimos pacientes con salud periodontal y baja prevalencia de caries dental.

10.2 Criterios exclusión

Pacientes menores de veinte años, que presentaron enfermedades sistémicas o pacientes edéntulos totales. Además, también se excluyeron aquellos pacientes con factores que puedan provocar cambios en el flujo salival o aquellos que por distintos motivos se encontraran bajo tratamiento médico.

11 Fase experimental (Laboratorio de microbiología)

11.1 Prueba piloto

Se realizaron diferentes disoluciones en ppm partiendo de un a foro de 500 ml del extracto de *Moringa oleífera*, a partir de las diluciones a concentraciones establecidas, se llevó a cabo una prueba piloto para generar una curva que permitió observar desde qué concentración los metabolitos secundarios del extracto madre empezaron a tener efecto sobre la proliferación de microorganismos de cavidad oral, esto se llevó cabo con muestras tomadas de dos pacientes sanos, siguiendo la misma metodología ya plantada para toma de muestras, factores de exclusión,

realización de agar y adición de concentraciones, en óptimo estado de esterilidad y bajo las medidas necesarias de temperaturas y aislamiento.

11.2 Dilución en agar

De la prueba piloto realizada, para el gradiente de concentraciones de *Moringa oleifera*, la concentración más baja establecida fue de 4000 ppm y en esta se evidencio un efecto total de inhibición, partiendo de esto, se seleccionaron tres concentraciones por debajo de esta correctamente distribuidas que permitiera identificar, una concentración mínima base de inhibición.

Este método nos permitió determinar la sensibilidad a los antimicrobianos (Extractos de *Mo*). El medio de cultivo empleado fue base de agar Mueller Hinton, en función de los microorganismo presentes en los hisopados de los pacientes, posteriormente se realiza la siembra en agar MacConkey y agar Sangre, el agente antimicrobiano *Mo*, se incorporó dentro del medio con agar, de forma que cada placa tuviera una concentración diferente del extracto (García Rodríguez *et al.*, 2000). Una vez esterilizado el medio de cultivo, durante un promedio de 20 minutos a 121°C en autoclave, se dejó enfriar hasta llegar a unos 45 °C antes de añadir las disoluciones, después se vertió en placas Petri estériles, evitando la formación de burbujas. Las disoluciones correspondieron a tres por cada concentración en ppm, frente a las muestras tomadas de microorganismos en pacientes y tres que se establecieron como control. Cada agar con su concentración establecida estuvo dividido en cuatro partes iguales, de las cuales tres estuvieron inoculadas y una actuó como control de agar, este método se denomina evaluación

por triplicata. Una vez solidificadas, las placas se utilizaron inmediatamente, los inóculos de los distintos microorganismos (Bacterias de cavidad oral) se sembraron de forma masiva y simultáneamente sobre la superficie del agar, empezando por la menor concentración. El conteo se realizó después de 24 horas. Los medios se almacenaron refrigerados y sellados con vinipel industrial negro, dado que los extractos de material vegetal podrían presentar fotosensibilidad y también para evitar su desecación. Es necesario inocular las placas control de agar sin extracto de material vegetal (control de viabilidad) para confirmar que no hubo contaminación.

11.3 Aislamiento de microorganismos y observación

Se aisló el mismo tipo de colonias para evitar un sesgo, para ello se hizo una siembra masiva antes de llevar a cabo la prueba piloto en agar Mueller Hilton y posteriormente, se realizan las siembras de los microorganismos aislados en agar sangre y agar MacConkey. Se implementó una coloración de Gram y un examen macroscópico de las colonias, para aislar solo un tipo de colonia (Cocos y bacilos). Posterior a la siembra, se cubrió cada una de las petri en vinipel negro y se llevaron a incubadora, se realizó una revisión constante y se registran datos, respecto al conteo de colonias a las 96 horas y observaciones cualitativas.

12 Manejo estadístico

12.1 Análisis de datos

Las mediciones cualitativas se realizaron por triplicado ($n=3$). Para la parte estadística se implementa el programa Rstudio versión: 2023.09.1+494 fue usado el procesamiento estadístico para el análisis de las diferencias significativas entre las variables, a través de una anova.

Teniendo en cuenta que se evaluaron los microorganismos de cavidad oral bajo caracteres excluyentes en tres pacientes, y se identificó el efecto de la *Mo* por triplicata, se realizó una evaluación cuantitativa, en donde se consideró el control (Sin extracto *Mo*), con esto se comparó el número de colonias (conteo) respecto al grupo tratamiento, se implementó un alfa de 0,05, en una prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Para la evaluación cualitativa, se identificó si hay o no efecto, se construyó una tabla en donde (+++) implica una inhibición completa de la proliferación, (++) una inhibición parcial, (+) falso positivo, (-) no hay inhibición.

Descripción de variables	
Tipo de microorganismos (Gram+-)	Cualitativa nominal
Tipo de paciente	Cualitativa ordinal
Presencia o ausencia de colonias	Cualitativa ordinal
Número de colonias	Cuantitativa discreta
Concentración de extracto de MO	Cuantitativa discreta

Tabla 1 Variables. Descripción de variables asociadas al planteamiento metodológico y objetivo del trabajo.

13 Resultado

13.1 Prueba piloto

Se realizó siembra inmediata con los hisopados tomados a cada uno de los pacientes sanos, en agar Mueller Hinton libres de extracto metabólico de Mo, se observó proliferación de microorganismos, adherida a la curva normal de crecimiento microbiano, esto observado a las 24, 48 y 72 horas.

Se incorporaron a cada uno de los agares las concentraciones del extracto de metabolitos secundarios de Mo establecidas que correspondieron a 5.000 ppm, 15.000 ppm, 30.000 ppm y 36.000 ppm y se estableció un segundo control (sin siembra) para cada una de las concentraciones. No se identificó proliferación de microorganismos en ninguna de estas concentraciones, por ello, la mínima concentración fue considerada para realizar la evaluación frente a la inhibición de formación de colonias de microorganismos en cavidad oral, con el fin de identificar la concentración mínima en donde exista un efecto significativo del extracto sobre la proliferación de microorganismos.

13.2 Resultados estudio

A partir de los resultados obtenidos es posible afirmar que existen un efecto inhibitorio de los extractos de *Moringa oleífera* sobre los microorganismos de cavidad oral presentes en las

muestras tomadas de pacientes voluntarios, que depende de la concentración implementada y no discrimina de la enfermedad bucal.

13.2.1. Anova. Diseño cuadrado latino (DCL)

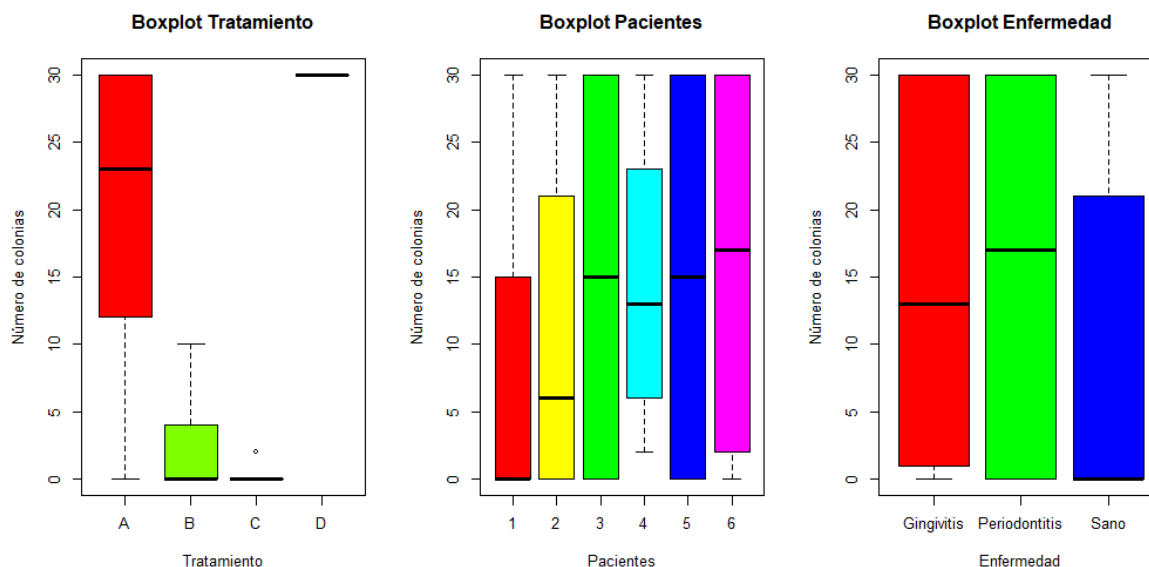


Figura 1 Diagrama de cajas y bigotes del anova en Agar MacConkey.

A) Tratamientos A (250ppm), B (1500ppm), C (4000ppm), D (Sin extracto), frente al número de colonias, la media en relación para el tratamiento A se encuentre entre 23 y 24, con un valor mínimo de cero y un Q3 de 30, para el tratamiento B, el valor máximo es 10, frente a los tratamientos C y D, se identifica un resultado polarizado, con total inhibición y una proliferación sobre los valores máximos de colonias, respectivamente. **B).** Variable número de colonias respecto al paciente, (1 y 2) sanos, (3 y 4) gingivitis, (5 y 6) periodontitis, en pacientes con periodontitis se alcanzan valores del Q3 de 30. **C).** Número de colonias respecto a la enfermedad, la media en pacientes con gingivitis y periodontitis está por encima de 10, respecto a la de los pacientes sanos que es cercana a cero.

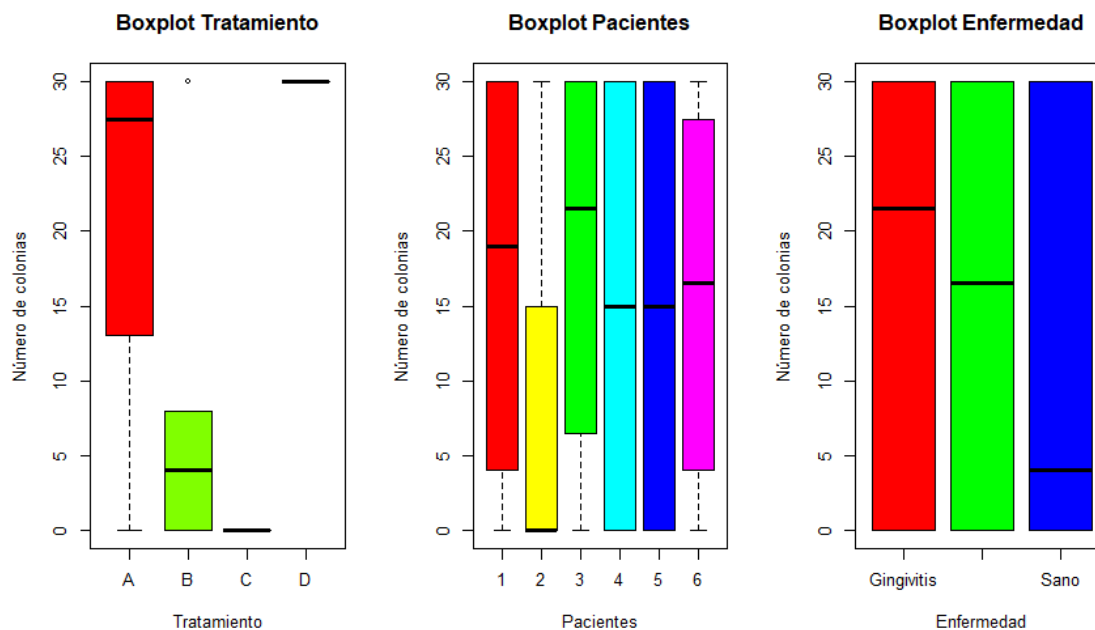


Figura 2 Diagrama de cajas y bigotes del anova en Agar Sangre.

A) Tratamientos A (250ppm), B (1500ppm), C (4000ppm), D (Sin extracto), frente al número de colonias, la media en relación para el tratamiento A se encuentre entre 25 y 30, con un valor mínimo de cero y un Q3 de 30, para el tratamiento B, el valor máximo es de 8, frente a los tratamientos C y D, se identifica un resultado polarizado, con total inhibición para el tratamiento C y una proliferación sobre los valores máximos de colonias para el tratamiento D. Se puede observar una relación entre los tratamiento A-D. **B).** Variable número de colonias respecto al paciente, (1 y 2) sanos, (3 y 4) gingivitis, (5 y 6) periodontitis, las medias de los pacientes a excepción del paciente 2, están por encima de 15, todos con datos mínimos sobre cero. **C).** Número de colonias respecto a la enfermedad, se evidencia una diferencia representativa entre las medias de los pacientes sanos, respecto a las medias de los pacientes con gingivitis y periodontitis, con medias por encima de quince.

13.2.2. Hipótesis para paciente

Ho: No existen diferencias entre el tipo de paciente

Ha: Existen diferencias entre el tipo de paciente

13.2.3. Hipótesis para tratamientos

Ho: No existen diferencias entre los tipos de tratamientos

Ha: Existen diferencias entre los tipos de tratamientos

```
> summary(a.anova.dcl)
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Paciente   5    223    44.6   1.039    0.431
Tratamiento 3   3646  1215.3  28.343 1.99e-06 ***
Residuals  15    643    42.9
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> |
```

Tabla 2 Summary del anova. dcl en Agar mackconcey

Relación de la variable independiente (Número de colonias) respecto a la variable tratamientos y el tipo de paciente, con valores para paciente ($p > 0,05$), lo que implica que no existen diferencias significativas entre las medias del número de colonias respecto al paciente, sin embargo, el tipo de tratamiento ($p: 1.99e-06$) es significativo, lo que implica que si existen diferencias significativas entre las medias del tipo de tratamiento.


```

> summary(a.anova.dcl)
              Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Paciente      5    284    56.8    0.738 0.606706
Tratamiento   3   3262  1087.3  14.125 0.000121 ***
Residuals    15   1155    77.0
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

Tabla 3 Summary del anova dcl en Agar Sangre.

Relación de la variable independiente (Número de colonias) respecto a la variable tratamientos y el tipo de paciente, con valores para paciente ($p: 0.06067$), lo que implica que no existen diferencias significativas entre las medias de los pacientes en función del número de colonias, sin embargo, se identifica nuevamente que el tipo de tratamiento ($p: 0.000121$) es significativo, lo que implica que si existen diferencias significativas entre las medias del tipo de tratamiento.

13.2.4. Prueba de Tukey HSD de comparaciones múltiples

A

```
Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = Colonias ~ Tratamiento, data = an)

$Tratamiento
      diff      lwr      upr    p adj
B-A -17.33333 -27.9668352 -6.699831 0.0010027
C-A -19.33333 -29.9668352 -8.699831 0.0003031
D-A  10.33333  -0.3001685 20.966835 0.0586930
C-B  -2.00000 -12.6335019  8.633502 0.9516740
D-B  27.66667  17.0331648 38.300169 0.0000027
D-C  29.66667  19.0331648 40.300169 0.0000010
```

B

```
Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = Colonias ~ Tratamiento, data = anova.dcl)

$Tratamiento
      diff      lwr      upr    p adj
B-A -13.66667 -27.372248  0.03891452 0.0508180
C-A -21.33333 -35.038915 -7.62775215 0.0016039
D-A  8.66667  -5.038915 22.37224785 0.3162142
C-B  -7.66667 -21.372248  6.03891452 0.4195257
D-B  22.33333  8.627752 36.03891452 0.0010063
D-C  30.00000  16.294419 43.70558119 0.0000305
```

Figura 3 Test de Tukey HDS.

A) Agar MacConkey, se presenta la comparación todos los tratamientos; Tratamientos A (250ppm), B (1500ppm), C (4000ppm), D (Sin extracto). Con un p-valor: 0.586 es posible afirmar que no existen diferencias significativas entre el tratamiento D-A, de igual forma con valores de $p > 0,05$ entre los tratamiento C-B tampoco existen diferencias significativas. **B).** Agar Sangre, con un p-valor: 0.316 es posible afirmar que no existen diferencias significativas entre el tratamiento D-A, de igual forma con valores de $p > 0,05$ entre los tratamiento C-B tampoco existen diferencias significativas, sin embargo, entre las demás comparaciones entre tratamientos si existen diferencias significativas.

13.2.5. Prueba de LSD

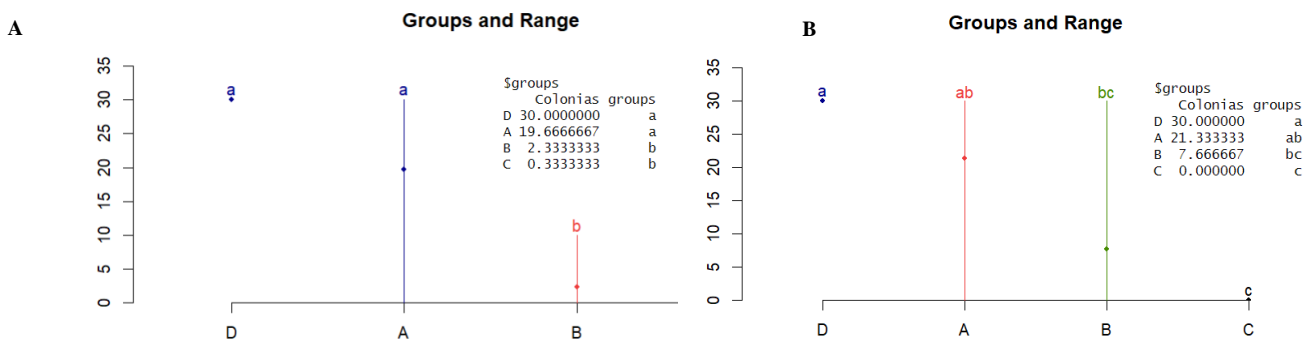


Figura 4 Test. LSD. Grafica

A). Agar MacConkey y grafica. **B).** Agar Sangre. Respecto a la diferencia mínima significativa entre las medias de los tratamientos, letras diferentes implican diferencias significativas a-b, a-c, letras iguales agrupan los tratamientos respecto a medias que estadísticamente no son significativamente diferentes a-a, b-b, c-c.

14 Discusión

Los metabolitos secundarios presentes en los extractos de las hojas de la *M. oleífera* tales como, isotiocianatos, flavonoides, antocianinas, proantocianidinas, polifenoles, flavonoides y cinamatos (García H., 2017), son considerados compuestos bioactivos que son potencialmente responsables de los procesos de inhibición y control de microorganismos patógenos (Ibrahim *et al.*, 2022). Respecto a la actividad antibacteriana, los extractos de *M. oleífera* fueron efectivos para inhibir el crecimiento de microorganismo de cavidad oral tanto de tipo gram + como gram – (p: 1.99e-6; p: 0,000121), además no discrimina entre el tipo de paciente, dado que el efecto es significativo en todos los tratamientos sin que la enfermedad del paciente sea una variable considerable, para este caso se acepta la hipótesis nula, no existen diferencias significativas entre el tipo de paciente, sin embargo para la variable tipo de tratamiento, se rechaza la hipótesis nula y se dice que existe una diferencia significativa entre las medias de cada uno de los tratamiento aplicados. Los resultados se relacionan con algunos otros obtenidos en estudios realizados anteriormente frente a la efectividad de la acción de los metabolitos de *M. oleífera* (Elgamily *et al.*, 2016; Rieuwpassa *et al.*, 2022; Faisal Madhloom *et al.*, 2022) en donde se ha demostraron la acción bactericida del extracto de *M. oleífera*.

Al contrastar los tratamientos A (250ppm), B (1500ppm), C (4000ppm), contra el tratamiento D, en la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, se evidencian valores de $p < 0,05$ lo que implica que existen diferencias significativas entre este y los demás tratamientos a excepción del tratamiento A, en donde los valores de $p < 0.05$ tanto en las siembras realizadas en agar MacConkey, como agar Sangre. El tratamiento D, no contenía el extracto, este se dispuso como el control negativo, allí la proliferación de bacterias fue la máxima, y el hecho de que

estadísticamente existan diferencias significativas con los tratamientos B (1500ppm) y C (4000 ppm) implica que en estos dos tratamientos la concentración del extracto de *Moringa oleífera* tuvo un efecto representativo frente a la proliferación de microorganismo de cavidad oral, sin embargo, en concentraciones cercana o iguales a 250ppm (Tratamiento A), la inhibición no es representativa, dado que este en contraste con el tratamiento D, no presenta diferencias significativas asociadas la proliferación de microorganismos en ninguno de los dos tipos de agares (p: 0.058; 0.316), frente a los tratamiento B-C en ambos casos los p-valores son mayores a 0.05, esto implica que las diferencias en cuanto a su eficacia no es significativamente diferente.

Dentro de los microorganismos de cavidad oral vamos a encontrar tanto gram positivos, como gram negativos, esto últimos en su mayoría causantes de enfermedades tales como periodontitis y gingivitis (Bascones *et al.*, 2005) y aunque se esperaba que la susceptibilidad de los microorganismo gram-positivos, asociados al agar sangre fuera mayor a la del otro grupo, dado que los extractos presentan fitocompuestos con un alto potenciales de acción, (Bijina *et al.*, 2011), se evidencio que las concentraciones de metabolitos secundarios del extracto de *Moringa oleífera*, mayores o iguales a 1500 ppm tenían la capacidad de controlar la proliferación tanto de bacterias asociadas al agar MacConkey (Gram-), como a las del agar sangre, encontrándose diferencias significativas frente al control negativo (0 ppm), lo que implica que bajo estas concentraciones si existe un efecto inhibitorio de proliferación de microorganismos, en los tres grupos de paciente.

Respecto a la concentración mínima inhibitoria los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que esta se encuentra sobre las 1500ppm, dado que, aunque a una concentración

de 250 ppm existe ya una inhibición, es importante garantizar que esta sea eficaz tanto en microorganismos Gram positivo, como Gram negativos.

Uno de los factores que se consideró dentro del estudio fue el tipo de extracción, debido al comportamiento de los metabolitos y su susceptibilidad a las temperaturas y a la luz, se buscó controlar siempre estas condiciones con el fin de obtener el máximo rendimiento frente a su potencial de acción, además se consideró el etanol como solvente del extracto en crudo debido a que este no es responsable de la actividad microbiana bajo estas condiciones y tampoco actúa como coadyuvante (*ISSN 1405-2768 Núm. 55 Enero 2023, 2023*).

Es importante mencionar que la práctica y utilización de la fitoquímica se basa en el uso de extractos de plantas con características asociadas, con el fin de buscar alternativas que puedan contrarrestar el efecto de diversas enfermedades (Gallegos Zurita, 2016). Está como ya se había mencionado se ha utilizado desde tiempos históricos dando lugar a los fitofármacos, además de ser de menor costo y desde lo que se ha demostrado reducidos índices de toxicidad, en comparación con los productos de síntesis (Gallegos Zurita, 2017).

15 Conclusiones

Si identifica una acción inhibitoria de amplio espectro de los metabolitos secundarios *Moringa oleífera* frente a la proliferación de los microorganismos de cavidad oral presentes en las muestras tomadas de los pacientes voluntarios. Si bien existen diversos estudios que enfatizan en el tratamiento de enfermedades implementado extractos de diversas partes de algunas plantas y muchas de ellos relacionados a tratamientos con complicaciones odontológicas, es necesario continuar haciendo investigación que aporte al conocimiento frente a sus vías de acción, sus componentes, contraindicaciones, características asociadas, etc.

La eficiencia de los procesos de extracción de material vegetal depende de diversos factores que están estrechamente relacionados con la solubilidad de los componentes a extraer. Estos factores incluyen la temperatura, el tamaño de las partículas, la presencia de impurezas, la agitación, la capacidad de disolución y la cantidad de solvente utilizado, entre otros. Por esta razón, se han realizado mejoras significativas en estos procedimientos con el objetivo de aumentar tanto el rendimiento como la composición de diferentes metabolitos secundarios.

Respecto a las hipótesis iniciales planteadas, se ha sugerido que los metabolitos de *Moringa oleífera* podrían tener un efecto inhibitorio real sobre los microorganismos de cavidad oral, con concentraciones mínimas viables iguales o mayores a 1500 ppm, sin discriminar complicación, lo que plantea la posibilidad de utilizarlos como una alternativa en el ámbito de la salud oral para abordar posibles complicaciones. Sin embargo, es importante destacar que, incluso identificando un efecto significativo de inhibición de estos metabolitos frente a los

microorganismos, es necesario llevar a cabo nuevas investigaciones centradas en la identificación de los componentes químicos específicos responsables de estas propiedades.

16 Referencias bibliográficas

1. Alarcón, M., Fernández, R., Silva, D., & Reyes, D. (2017). Salus Moringa oleifera: potenciales usos en odontología Moringa oleifera: potential uses in dentistry. *Rev. Salus*, 21(2), 28–34. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=375953625007>
2. Alsaraf, K. M., Abd, S. T., & Husain, N. S. (2016). An Antimicrobial Activity of Moringa Oleifera Extract in Comparison to Chlorhexidene Gluconate : In Vitro Study. *Journal of Baghdad College of Dentistry*, 28(1), 183–187. <https://doi.org/10.12816/0024732>
3. Bijina, B., Chellappan, S., Krishna, J. G., Basheer, S. M., Elyas, K. K., Bahkali, A. H., & Chandrasekaran, M. (2011). Protease inhibitor from Moringa oleifera with potential for use as therapeutic drug and as seafood preservative. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18(3), 273–281. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2011.04.002>
4. Blanco Carrión, A., & Otero Rey, E. (2014). Patología oral asociada a la sequedad bucal. *Avances En Odontoestomatología*, 30(3), 129–133. <https://doi.org/10.4321/S0213-12852014000300005>
5. Chiedozie, E. I., Ahamefula, O. F., Ukamaka, A. A., Ezemokwe, I., Chiedozie, O., & Felix, A. (2016a). Anti-Inflammatory, Antimicrobial and Stability Studies of Poly-Herbal Mouthwashes against Streptococcus mutans. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(5), 354–361.
6. Chiedozie, E. I., Ahamefula, O. F., Ukamaka, A. A., Ezemokwe, I.,

Chiedozié, O., & Félix, A. (2016b). Anti-Inflammatory, Antimicrobial and Stability Studies of Poly-Herbal Mouthwashes against *Streptococcus mutans*. ~ 354 ~ *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(5).

7. Consuelo Domínguez-Barradas, Gerardo Eliseo Cruz-Morales, & Carlos González-Gándara. (2015). Medicinal plants of the Ecological Reserve “Sierra of Otontepec” Township Chontla, Veracruz, Mexico. *Ciencia UAT*, 9(2), 41–52.
https://revistaciencia.uat.edu.mx/index.php/CienciaUAT/article/view/708/359%0Ahttp://www.scielo.org.mx/article_plus.php?pid=S2007-78582015000100041&tlng=es&lng=es

8. Cruz Quintana, S. M., Díaz Sjöstrom, P., Arias Socarrás, D., & Mazón Baldeón, G. M. (2017). Microbiota of oral cavity ecosystems. *Revista Cubana de Estomatología*, 54(1), 84–99.

9. Doherty, R. (2016). Biofilms: What does subgingival plaque look like? *British Dental Journal*, 221(1), 16. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2016.487>

10. Elgamily, H., Moussa, A., Elboraey, A., EL-Sayed, H., Al-Moghazy, M., & Abdalla, A. (2016). 585 ID Design 2012/DOOEL Skopje, Republic of Macedonia Open. *Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 4(4), 585–590.
<https://doi.org/10.3889/oamjms.2016.132>

11. Eni. (1967). 濟無 No Title No Title No Title. *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952., Mi, 5–24.

12. Eraso, E. (n.d.). *OCW2013 – E. Sevillano, E. Eraso*. 1–4.

13. Ezz El-Din Ibrahim, M., Alqurashi, R. M., & Alfaraj, F. Y. (2022). Antioxidant Activity of *Moringa oleifera* and Olive *Olea europaea* L. Leaf Powders and Extracts on Quality and Oxidation Stability of Chicken Burgers. *Antioxidants*, 11(3).

<https://doi.org/10.3390/antiox11030496>

14. Faisal Madhloom, A., Bashir Hashim Al-Taweel, F., Sha, A. M., & Raad Abdulbaqi, H. (2022). Antimicrobial Effect of Moringa Oleifera L. and Red Pomegranate against Clinically Isolated Porphyromonas gingivalis: in vitro Study. *Archives of Razi Institute*, 77(4), 1405–1419. <https://doi.org/10.22092/ARI.2022.357513.2051>

15. Gallegos Zurita, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *Anales de La Facultad de Medicina*, 77(4), 327. <https://doi.org/10.15381/anales.v77i4.12647>

16. Gallegos Zurita, M. (2017). *Las plantas medicinales : usos y efectos en el estado de salud de la población rural de Babahoyo – Ecuador – Para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias de la Salud*. 118.

17. García H., R. (2017). *Estudio sobre la capacidad antioxidante de extractos de hoja de Moringa oleifera de diferente origen geográfico*. 27.
https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/19625/GarcíaHernández_Rafael_TFG_2017.pdf?sequence=2

18. García, P. C. E. (2015). Investigación bibliográfica de los mecanismos de defensa de las bacterias de la cavidad bucal. *Ug*.
<http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/11867>

19. García Rodríguez, J., Cantón, R., García Sánchez, J. E., Gómez-Lus, M. L., Martínez Martínez, L., Rodríguez-Avial Jordi Vila, C., & José A. (2000). *Procedimientos en Microbiología Clínica*.

20. He, J., Li, Y., Cao, Y., Xue, J., & Zhou, X. (2015). The oral microbiome diversity and its relation to human diseases. *Folia Microbiologica*, 60(1), 69–80.

<https://doi.org/10.1007/s12223-014-0342-2>

21. HOFFMAN, H. (1957). Oral microbiology. *Annual Review of Microbiology*, *11*, 183–198. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.11.100157.001151>
22. Improving periodontal outcomes: merging clinical and behavioral science. (2016). *British Dental Journal*, *221*(2), 62–62. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2016.523>
23. Isaza M., J. H. (2004). Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia Et Technica*, *13*(33), 13–18. <http://www.redalyc.org/pdf/849/84903303.pdf>
24. *ISSN 1405-2768 Núm. 55 Enero 2023*. (2023).
25. Jorgensen, J. H., & Ferraro, M. J. (1998). Antimicrobial Susceptibility Testing: General Principles and Contemporary Practices. In *Diseases* (Vol. 26, Issue 4).
26. Kinane, D. F., Stathopoulou, P. G., & Papapanou, P. N. (2017). Periodontal diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, *3*, 1–14. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.38>
27. Kulik, E. M., Waltimo, T., Weiger, R., Schweizer, I., Lenkeit, K., Filipuzzi-Jenny, E., & Walter, C. (2015). Development of resistance of mutans streptococci and *Porphyromonas gingivalis* to chlorhexidine digluconate and amine fluoride/stannous fluoride-containing mouthrinses, in vitro. *Clinical Oral Investigations*, *19*(6), 1547–1553. <https://doi.org/10.1007/s00784-014-1379-y>
28. Lamont, R. J., Koo, H., & Hajishengallis, G. (2018). The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(12), 745–759. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0089-x>
29. Liñán, F. (2010). Moringa oleifera el árbol de la nutrición. *Revista Ciencia y Salud*, *2*(1), 130–138. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6635304>

30. Manaheji, H., Jafari, S., Zaringhalam, J., Rezazadeh, S., & Taghizadfarid, R. (2011). Analgesic effects of methanolic extracts of the leaf or root of *Moringa oleifera* on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *Journal of Chinese Integrative Medicine*, 9(2), 216–222. <https://doi.org/10.3736/jcim20110216>
31. Marsh, P. D., & Percival, R. S. (2006). The oral microflora - Friend or foe? Can we decide? *International Dental Journal*, 56(4 SUPPL. 1), 233–239. <https://doi.org/10.1111/j.1875-595x.2006.tb00107.x>
32. Martínez, B., & Ruiz, F. (2005). Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas. *Avances En Periodoncia e Implantología Oral*, 3(3), 147–156. <http://scielo.isciii.es/pdf/peri/v17n3/147enfermedades.pdf>
33. Más Toro, D., Martínez Aguilar, Y., Rodríguez Bertot, R., Pupo Torres, G., Rosabal Nava, O., & Olmo González, C. (2017). Análisis preliminar de los metabolitos secundarios de polvos mixtos de hojas de plantas medicinales Preliminary analysis of secondary metabolites in mixed powders of leaves of medicinal plants. In *Revista Cubana de Plantas Medicinales* (Vol. 22, Issue 1). <http://scielo.sld.cu>
34. Matesanz-Pérez, P., Matos-Cruz, R., & Bascones-Martínez, A. (2008). Enfermedades gingivales: una revisión de la literatura. *Avances En Periodoncia e Implantología Oral*, 20(1), 11–26. <https://doi.org/10.4321/s1699-65852008000100002>
35. Mendes, D. B., Lemes, L. S., Carlos, R., Cruz, S., Lúcia, M., Castro, L. De, Carneiro, L. C., Gazzola, A., Cunha, D. A., Paiao, G. D., Vescove, I., Ed, P., CASTRO. C, Pereira, R. J., Cardoso, M. das G., Briega, D., Sousa, R. F. D. T. M., Sousa, R. F. D. T. M., & Gobetti, S. T. D. C. (2012). Metabólitos secundários e hipertireodismo. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 3(1MENDES, D. B. et al. Metabólitos

secundários e hipertireodismo. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, v. 3, n. 1, pp. 1–69, 2012.), 1–69. <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/951393>

36. Mileydi de la Torres López, D. C., Díaz Álvarez, M., & Alina Acosta Morales, D. (2009). ene-abr. In *Gaceta Médica Espirituana* (Vol. 11, Issue 1).
37. Mitchel Otieno, O., James Mucunu, M., Laetitia Wakonyu, K., Daniel Waweru, G., Stephen Gitahi, K., & Francis Okumu, O. (2016). Phytochemical Profile and Antioxidant Capacity of Leaves of *Moringa oleifera* (Lam) Extracted Using Different Solvent Systems. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry JPP*, 5(4), 302–308.
38. Mouchrek Junior, J. C. E., de Araújo Castro Nunes, L. H., Arruda, C. S., de Castro Rizzi, C., e Silva Mouchrek, A. Q., De Jesus Tavares, R. R., Tonetto, M. R., Bandeca, M. C., & Filho, E. M. M. (2015). Effectiveness of Oral Antiseptics on Tooth Biofilm: A Study in vivo. *Journal of Contemporary Dental Practice*, 16(8), 674–678. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-1739>
39. Moyo. (2012). Antimicrobial activities of *Moringa oleifera* Lam leaf extracts. *African Journal of Biotechnology*, 11(11), 2797–2802. <https://doi.org/10.5897/ajb10.686>
40. Mujica Troncoso, C., Castillo-Ruiz, M., Daille, L., Fuentevilla, I., & Bittner, M. (2010). Co-detección de Patógenos Periodontales en Pacientes Chilenos con Periodontitis Crónica. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, 3(3), 118–122. <https://doi.org/10.4067/s0719-01072010000300003>
41. Rathi, B. S., Bodhankar, S. L., & Baheti, A. M. (2006). Evaluation of aqueous leaves extract of *Moringa oleifera* Linn for wound healing in albino rats. In *Indian Journal of Experimental Biology* (Vol. 44).

42. Santos-Zambrano, T. B., Jaime-Szwom, R., & Couto de- Almeida, R. S. (2020). Uso De Compuestos Naturales Para Reducir La Carga Bacteriana De La Cavidad Oral: Un Artículo De Revisión. *Biotempo*, *17*(1), 173–183. <https://doi.org/10.31381/biotempo.v17i1.3146>
43. Sayeed, M. A., Hossain, M. S., Chowdhry, M. E. H., & Haque, M. (2012). Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry In vitro Antimicrobial Activity of Methanolic Extract of. *Journal of Medicinal Plants Research*, *1*(4), 94–98.
44. Suarez, M., Entenza, J. M., Doerries, C., Meyer, E., Bourquin, L., Sutherland, J., Marison, I., Moreillon, P., & Mermod, N. (2003). Expression of a Plant-Derived Peptide Harboring Water-Cleaning and Antimicrobial Activities. *Biotechnology and Bioengineering*, *81*(1), 13–20. <https://doi.org/10.1002/bit.10550>
45. Supranoto, S. C., Slot, D. E., Addy, M. A., & Van der Weijden, G. A. (2015). The effect of chlorhexidine dentifrice or gel versus chlorhexidine mouthwash on plaque, gingivitis, bleeding and tooth discoloration: A systematic review. *International Journal of Dental Hygiene*, *13*(2), 83–92. <https://doi.org/10.1111/idh.12078>
46. Tartaglia, G. M., Kumar, S., Fornari, C. D., Corti, E., & Connelly, S. T. (2017). Mouthwashes in the 21st century: a narrative review about active molecules and effectiveness on the periodontal outcomes. *Expert Opinion on Drug Delivery*, *14*(8), 973–982. <https://doi.org/10.1080/17425247.2017.1260118>
47. Trombelli, L., Farina, R., Silva, C. O., & Tatakis, D. N. (2018). Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations. *Journal of Periodontology*, *89*(1), S46–S73. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0576>
48. Vieira, G. H. F., Mourão, J. A., Ângelo, Â. M., Costa, R. A., & Vieira, R.

H. S. dos F. (2010). Antibacterial effect (in vitro) of moringa oleifera and annona muricata against gram positive and gram negative bacteria. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 52(3), 129–132. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652010000300003>

49. Walker, A. W. (2016). *Microbiota of the Human Body*. 902, 5–32. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-31248-4>

50. Wessel, S. W., van der Mei, H. C., Maitra, A., Dodds, M. W. J., & Busscher, H. J. (2016). Potential benefits of chewing gum for the delivery of oral therapeutics and its possible role in oral healthcare. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 13(10), 1421–1431. <https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1193154>

51. *Y BIOQUÍMICA*. (2021).

52. Yumoto, H., Hirota, K., Hirao, K., Ninomiya, M., Murakami, K., Fujii, H., & Miyake, Y. (2019). The pathogenic factors from oral streptococci for systemic diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18). <https://doi.org/10.3390/ijms20184571>

53. Zhurbenko, Raisa; Viera Oramas, Diana Rosa; Rodríguez Martínez, Claudio; Ortega Surís, A. (2010). Optimización de la formulación de agar de Mueller-Hinton . *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 41, 1–12.