

# ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE ALGUNAS ESPECIES DE GNAPHALIUM Y ACHYROCLINE

COLEGIO UNIVERSITARIO COLOMBIANO  
COLEGIO ODONTOLOGICO COLOMBIANO

Ana Luz Riaño Heredia\*Ruben

Torrenegra\*\*Ines A. Revelo\*\*\*

## RESUMEN

El propósito de este estudio fue comprobar la bioactividad de *Gnaphalium elegans*, *Achyrocline sp* y *Achyrocline bogotensis* frente a *Streptococcus mutans* y *Cándida albicans*, en enfermedades frecuentes como la caries dental y oportunistas como la Candidiasis; se utilizó el método de dilución en agar para determinar el extracto de mayor sensibilidad sobre los patógenos; se halló la CMI de los extractos que presentaron bioactividad. Los resultados de ésta investigación permitieron concluir que los extractos totales de flores y hojas de *Gnaphalium elegans*, *Achyrocline bogotensis* y *Achyrocline sp*, presentaron actividad bacteriostática frente a *Streptococcus mutans* e inactividad frente a *Cándida albicans*. Las fracciones de los extractos en éter de petróleo y diclorometano resultaron significativamente activas frente a *Streptococcus mutans*.

Se evaluó la actividad de Listerine (Enjuague bucal recomendado para el control de la placa bacteriana) dando una inactividad frente a los patógenos.

## INTRODUCCION

El presente trabajo tiene como fin el empleo de las plantas como alternativas en prevención y manejo de la enfermedad cariogénica y oportunista, ya que no es desconocido que para el hombre ha sido y será siempre importante conocer las propiedades medicinales de los extractos de las plantas y su directa acción farmacológica, sobre los organismos. Estos extractos han sido

utilizados desde tiempos antiquísimos y recientemente en muchos medicamentos.

Esta investigación de *Gnaphalium* y *Achyrocline* hace parte del proyecto de investigación denominado "Actividad antimicrobiana de extractos de algunas especies de *Gnaphalium* y *Achyrocline*".

La finalidad del proyecto consiste en obtener extractos de *Gnaphalium elegans*, *Achyrocline bogotensis* y *Achyrocline Sp*. Y evaluar la

---

\*Estudiante X semestre Colegio Odontológico Colombiano

\*\* Director Científico

\*\*\* Odontóloga Magister en Administración en Salud

actividad antimicrobiana (antibacteriana y antifúngica) de los extractos obtenidos. La parte experimental de este trabajo se dividió en tres etapas: En la primera etapa se realizó el aislamiento de *Streptococcus mutans*, y *Cándida albicans* a partir de surcos profundos de molares y para la *Cándida albicans* de la parte dorsal de la lengua de un paciente cuyo diagnóstico clínico presuntivo fué *Candidiasis oral*. En la segunda etapa se realizó la extracción de *Gnaphalium y achyrocline*.

En la tercera etapa se evaluaron las propiedades antimicrobianas (fungitóxicas y antibacterianas) de dichos extractos.

Las bacterias y las levaduras se encuentran como microbiota normal de cavidad oral, cuando un proceso bien sea interno o externo altera el medio ambiente de la cavidad oral, surgen enfermedades "silenciosas" como es el caso de la Periodontitis y Oportunistas para la infección producida por *Cándida*.

Por esta razón se enfocó éste estudio como una alternativa en la prevención y posible tratamiento de éstas enfermedades, en vista que no se han logrado encontrar tratamientos terapéuticos que solucionen del todo éstos problemas.

Desde hace algunos años se ha venido observando un considerable aumento de personas que sufren de Caries, mal aliento y lesiones de tejidos duros y blandos; problemas que conllevan con el tiempo a la pérdida de una o más piezas dentales, o en el peor de los casos a la pérdida de sostén y piezas dentarias en su totalidad. Esta problemática motiva a la atención dental y a la búsqueda de nuevas opciones para evitar éste problema.

Su etiología es en general provocada por la descomposición bacteriana de partículas de alimentos, células, sangre y de algunos componentes de la saliva.

Existen en el mercado numerosos antibacterianos que contrarrestan los problemas de caries y enfermedad periodontal, que contienen antisépticos u otros compuestos que con el tiempo pueden llevar al desgaste del esmalte dental o a la aparición de carga microbiana resistente si se utilizan de manera descontrolada. Es por ello que en este trabajo se plantea el uso de agentes antimicrobianos a partir de extractos de *Gnaphalim y Achyrocline* ya que es imposible desconocer la importancia que han tenido las "plantas" en la fabricación de fármacos en países industrializados, satisfaciendo las expectativas de la humanidad frente al tratamiento de ciertas afecciones .

La posibilidad de determinar su bioactividad, toxicidad y principios activos, se convierten en alternativas de empleo de las plantas como fitomedicamentos.

A través de éste estudio se quiere dar a conocer el uso de productos naturales en el tratamiento de enfermedades ya que ha sido un componente importante en el transcurso del tiempo en las terapias medicinales.

En éste sentido la familia Compositae puede ofrecer oportunidades de descubrir nuevas sustancias con propiedades antimicrobianas ya que la gran biodiversidad de plantas en los países latinoamericanos ha dado lugar a que exista un gran número de especies vegetales que son utilizadas en medicina tradicional por diferentes grupos étnicos. Es importante por lo tanto validar la eficacia y utilidad en la terapéutica en el hombre, de manera que puedan ser integrados a los programas de salud primarios del país.

Las compuestas constituyen la familia de las plantas más extensas de las angiospermas, en éstas hay cerca de 20.000 especies (CRONQUIST, A. 1982) agrupadas en 1000 géneros aproximadamente y trece tribus (TORRENEGRA, R. et al 1982), las que se encuentran distribuidas por todo el mundo. La sistemática de la familia de las compuestas, fue organizada en un principio, por el botánico Wettstein (TORRENEGRA, R. et al 1982), quien las dividió en doce grupos según las características florales; Teniendo en cuenta que evolutivamente estas poseían rasgos avanzados, como la reducción del número de partes, modificaciones de éstas, como la presencia de papos, flores irregulares, algunas flores imperfectas, coalescencia de cada verticilo y adnación (GOLA, G. Et al 1975) . Su ubicación taxonómica fue descrita posteriormente por Erlich quien las organizó en trece tribus, y dentro de las últimas modificaciones introducidas en la sistemática, se encuentra en la denominada "Clasificación moderna" de Engler (CRONQUIST, A. 1982), quien agrupó a la familia Compositae en las siguientes dos subfamilias: Las ligulifloras (entre las cuales se encuentra la tribu Cichoraceae) y en las tubifloras las doce tribus restantes: Veronias, Eupatoriae, Astereae, Heliantheceae, Musticeae, Heleneae, Senecieae, Calenduleae, Arctotideae, Cynareae, Anthemineae e inuleae).

La inclusión de todas las especies del género *Gnaphalium* dentro de la tribu Inuleae no es

completamente aceptada por los taxónomos de hoy, quienes refieren un considerable polimorfismo entre sus especies.

Se han hecho algunos estudios para complementar la clasificación de las compuestas entre los cuales el análisis de anatomía vascular, embriología y estructura del grano de polen, que han demostrado claramente como ninguno de los sistemas tradicionales son totalmente correctos. En este sentido se pronuncia Cronquist (**CRONQUIST, A. 1982**).

Las *Gnaphalium* son plantas que se distribuyen en zonas frías, localizadas entre 2600 y 3800 metros sobre el nivel del mar.

Se conocen unas 25 especies diferentes, americanas y europeas, pertenecientes al género *Gnaphalium* que llevan los nombres comunes de "vira-vira", "queto-queto", "Don alonso", "Lechuguilla", entre otros. Son plantas que tienen las siguientes características morfológicas: herbáceas y pueden alcanzar hasta dos metros de altura, presentan tallos redondeados cubiertos por tomento blanco, ramificados, hojas alternas, sesiles, lanceoladas o lineoblongas, dentadas, ápice agudo o acuminado, base angosta, haz y envés con tricomonas, anteras paniculadas o en espiga, ramificadas, subglobosas, involucros subacampanados, tres- cuatro seriados, brácteas oblongas, redondeadas en el ápice, glabras, aquenios rugosos, glabros globosos, vilano o papo blanco con numerosas aristas, cabezuelas heterógamas, discoideas, numerosas flores marginales femeninas, flores del centro hermafroditas, con corolas tubulosas o discoideas (**TORRENEGRA, R. Et al 1982**). A continuación se describe morfológicamente la especie perteneciente al género *Gnaphalium*, escogida para el trabajo:

***Gnaphalium elegans***: Arbustico o yerba alta de 2 metros, erecta, tallos redondeados, cubiertos por tomento blanco en la parte media superior, hojas alternas sésiles, lanceoladas, base angosta, haz verde oscuro con tricomonas, envés blanco, enteras y membranáceas, corimbos terminales, involucro subacampanado, bracteas exteriores más cortas, cabezuelas heterógamas, discoideas, aquenios glabros.

Las plantas del género de *Gnaphalium* poseen propiedades de carácter farmacológico en organismos, tal es el caso de *Gnaphalium elegans* que en infusión se le atribuyen propiedades curativas contra la prostatitis.

Algunos flavonoides son medianamente activos contra el cultivo de células malignas, como el carcinoma, poseen poderes estrogénicos en animales y promueven o inhiben respuestas en el crecimiento vegetal.

Otros compuestos encontrados en estas plantas, son los diterpenos, a los cuales se les atribuyen acciones farmacológicas, por su carácter de vitaminas o coenzimas como el retinol (vitamina A), y el to-coferol (vitamina E), la vitamina k y la coenzima Q.

Los *Achyrocline* son hierbas erectas o semiprostradas que alcanzan hasta un metro de altura, ramificadas; tallos erectos pubescentes o lanuginosos con tricomonas blancos hojas alternas, sésiles, linear-lanceoladas agudas, en el ápice y con la base angosta, anteras lanuginosas por ambas caras inflorescencias en glomérulos laxos, globosos o subglobosos, pedunculados, dispuestos en el extremo de las ramas; cabezuelas heterógamas discoideas, sesiles, con unas 18 flores; involucros cilíndricos 3 seriada; bracteas en varias series cortas, glabras o ligeramente aracnoideo-lanuginosas en la base; flores marginales femeninas con las 4 corolas filiformes, glabras; flores centrales hermafroditas con 1-3 corolas tubulosas aquenios glabros, comprimidos papo uniseriado blanco, formados por pelos numerosos y largos. Se conocen unas doce especies llamadas comúnmente: "cenizo suso, vira- vira, etc., entre ellas; *A. bogotensis*, *A. lehmannii*, *A. satureioides*, *A. Crassiceps*, etc.

El complejo de la microbiota oral ha sido reconocido desde la examinación con microscopía por Van Leewenhoek en 1683, (**Socransky et al 1998**) desde éste tiempo numerosos estudios han evaluado la composición de la placa usando microscopía de luz y microscopía electrónica, más recientemente técnicas inmunológicas por DNA. Todas éstas técnicas refuerzan a Van Lewenhhoek en su observación inicial de la placa subgingival, por cierto se ha estimado más de 400 especies en ésta area indicando un alto grado de organización de la placa; por ejemplo las especies bacterianas de la superficie del diente son completamente diferentes a las del exterior de la placa (**Listgarten et al 1975**). La placa subgingival se caracteriza por una zona de carga microbiana Gram negativa y/o móviles localizadas adyacentes al epitelio de unión y algunas positivas en la raíz y agrupaciones cocoides en la superficie del esmalte y raíz. (**Listgarten 1976,1994**).

En general, el mayor número de bacterias se encuentran en el diente y en el dorso de la lengua ; la mucosa bucal y palatal esta menos poblada. La descamación limita la colonización en las superficies mucosas, pero puede ocurrir grandes acumulaciones bacterianas en el diente, especialmente en áreas, que no puede tener una buena limpieza oral, como fisuras oclusales (Addy M, et al.1998); en adultos con enfermedad periodontal (Moore en 1983) se encuentra una carga microbiana supragingival predominante perteneciente a las especies de *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Capnocytophaga*, *Veillonella parvula* *Leptotrichia bucalis*, *Selenomonas* y *Rothia dentocariosa* en contraste la composición con la placa subgingival donde habita especies de *Eubacterium*, *Campylobacter rectus*, *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotellas* esto sugiere un rol importante en la iniciación de infecciones periodontales (Moore 1994, Zambon 1996) . Cao 1990 encuentra carga microbiana con predominio de *Actinomyces* y *Streptococcus* con *Fusobacterium* y *Bacteroides pigmentados*, y Zee et al en 1996 encuentra microbiota Gram positiva y negativa donde incluye también a las especies enunciadas por moore en 1983 con unas variantes demás como son *Staphylococcus epidermidis*, *Veillonella dispar*, *Propionibacterium granulosum*, *gemella morbillorum*, *Streptococcus mitis* y *sanguis*. Gmur & Ggenheim 1994 detectan la presencia en placa interdental supragingival una carga microbiana perteneciente a *Actinobacillus actinomicetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *C. rectus*, *P. gingivalis* e *intermedia* y *prevotella nigrescens* sugiriendo que la placa supragingival puede ser reservorio de muchos microorganismos y que se puede encontrar tanto en placa supragingival como subgingival especies similares; sin embargo los datos en términos numéricos son limitados.

.La composición de la carga microbiana oral es muy variada existiendo muchos géneros de bacterias axogénicas y anoxigénicas.

Dentro de las anoxigénicas se encuentran:

*Actinomyces*, *Arachnia*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*.(JOEL B, ET AL 1991).

La incidencia de estos anoxigénicos varía con la edad, y con los sitios dentales de donde se tome la muestra, ya que la boca presenta una serie de diferentes microambientes y cada una de los cuales puede ser colonizado por diferentes

microorganismos. La mayoría de los microorganismos que inicialmente se adhieren a las superficies orales son desechados y solo una pequeña porción permanecen firmemente pegados.

.La caries dental es probablemente la infección microbiana más común encontrada en el hombre. Como no es una enfermedad, limitante en ausencia de tratamiento progresará hasta involucrar la pulpa dental y en algunos casos los tejidos que rodean al diente.

La caries ataca el esmalte y la dentina del diente, y se caracteriza por una inicial desmineralización del material orgánico de éstas estructuras seguida por la destrucción de los componentes orgánicos. Una vez iniciada, la caries progresa en la capa de esmalte del diente; al visualizarla en secciones histológicas esta formada por una zona de descalcificación completa, con caída de las estructuras del diente y presencia de bacterias.

La caries del tejido blando se encuentra en la región cervical del diente, donde la encía está en contacto con el diente. Una placa dental densa y adherente es importante en el desarrollo de esta caries. (WHINGMING L, et al 1998)

La placa microbiana presente en la proximidad de los tejidos gingivales es un factor para la iniciación de la gingivitis y por lo tanto de la mayoría de las formas destructivas de la enfermedad periodontal .

*Estreptococcus viridans* tienen su hábitat principalmente en la cavidad oral, y están claramente implicados en la colonización de superficies duras y blandas de la misma. Su significación patógena más importante va ligada a la formación de placas, a la génesis de la caries, gingivitis, periodontitis y a otros procesos odontológicos (abscesos periapicales y periodontales y pulpitis . (KONEMAN 1999)

Bajo la denominación de viridans se agrupa un amplio número de *Estreptococcus*. Basados en criterios fisiológicos, quimiogénéticos y nutricionales, se admiten los siguientes grupos: *mutans*, *oralis*, *salivarius*, *milleri* y variantes nutricionales. Estos *Estreptococcus* fuera del ámbito oral participan cada vez más en procesos sistémicos y focales, si bien su mayor importancia radica en la relación con las endocarditis subagudas . En la cavidad oral, los factores de virulencia más destacados de estos microorganismos son: la síntesis de polisacáridos extracelulares solubles e insolubles, la síntesis de polisacáridos intracelulares y su capacidad para

iniciar el desarrollo a pH 5. (WHINGMING L, et al 1998)

El grupo mutans está constituido por las especies *S. mutans*, *S. rattus*, *S. cricetus*, *S. sobrinus*, *S. ferus*, *S. downei* y *S. macacae*. No tienen cápsula, carecen de polisacárido C, ni complejos fibrilares y si éstos existen no son muy prominentes. En la pared se destacan proteínas dotadas de diversas funciones y polisacáridos, distintos del C. Estos polisacáridos muestran distintas especificidades antigénicas, lo que permite distinguir los serotipos a, b, c, d, e, f, g, y h.

El *Streptococcus mutans* posee polisacáridos antigénicos del grupo mutans c, e, y f. Sus colonias en agar sangre son alfa y gamma hemolíticas y excepcionalmente beta hemolíticas. Posee enzimas GTF-I, GTF-S Y FTF, sintetizando glucanos solubles, insolubles y fructanos, además de polisacáridos intracelulares de reserva que pueden ser degradados por dextranasas y glucógeno fosforilasas. Presenta proteínas fijadoras de glucanos, que intervendrían en la adhesión a la película adquirida, cuando en ella existen glucanos adsorbidos, y en los procesos de agregación bacteriana. También posee proteínas parietales superficiales, que pueden liberarse (KONEMAN 1999).

Al medio en el curso del crecimiento bacteriano, y que se comportan como adhesinas; son conocidas como antígenos I/II (sinónimos de Pac IF,B,P1), y mediarían la adhesión a la película adquirida en ausencia de glucanos en su superficie y la coagregación con otras bacterias, hechos que aumentarían con la saliva. (SOUCHAY A, et al 1995). El papel que desempeñan sus fimbrias y ácidos lipoteicoicos en los procesos de adhesión a tejidos del hospedador y en los de agregación bacteriana es controvertida. Entre el 50 y el 70% de las cepas son bacteriocinógenas. Estas bacteriocinas muestran un espectro que se extiende a otras bacterias Grampositivas, tanto cocos como bacilos e incluso *Nocardia spp.* Y *Mycobacterium phlei*; aunque su importancia ecológica no está clara sí pueden tener interés para la tipificación de cepas, con objeto de demostrar los mecanismos de su transmisión intrahumana. El hospedador principal es el hombre, en el que al igual que en diversos animales gnotobióticos ha mostrado su poder cariogénico. Coloniza principalmente las superficies duras de la cavidad oral (esmalte o cemento), aunque se han obtenido también aislamiento a partir de heces humanas. *S. mutans* induce lesiones cariosas tanto de superficies lisas, de fosas y fisuras, como en zonas

interproximales y en cemento radicular, siendo más que posible su papel en la progresión del proceso. A nivel extraoral, *S. mutans* está relacionado con endocarditis subagudas y, más raramente con otros procesos patológicos.

Esta especie sigue siendo sensible a una amplia gama de antibióticos (betalactámicos, macrólidos y lincosamidas). En los últimos años, se ha observado una lenta y progresiva pérdida de la sensibilidad, y se han descrito cepas con elevados grados de resistencia a los aminoglucósidos y tolerantes a la penicilina. (RUSELL D et al 1999) *Cándida albicans* se encuentra comunmente como comensal en el tracto digestivo y vaginal como microbiota normal. En las décadas pasadas la prevalencia de cándida ha sido atribuida al uso indiscriminado de antibióticos, agentes inmunosupresores, deficiencias nutricionales, desordenes endocrinos y defectos inmunes (Bodey GP, 1992). *Cándida* se considera una de las infecciones oportunistas más frecuentes en humanos su colonización inducida por estados hipersensitivos los agentes causales son levaduras anascosporadas cuyo estado anamorfo pertenece a la subdivisión Deutero mycotina y su estado teleomorfo puede ser Ascomicotina (*Pichia*, *kluveromyces*) o Basidiomycotina (*Leucosporidium*), Se han descrito 81 especies, de las cuales al menos siete causan enfermedades en seres humanos (ROBERT B ET AL 1999). El género *Cándida*, en sentido amplio es dimorfo. *C. albicans* se ha dividido en varios biotipos, y por sus características antigénicas en los serotipos A y B; el primero está relacionado con *C. tropicalis* y el segundo con *C. stellatoidea* que algunos consideran similar a *C. albicans*.

Estos hongos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, pero *C. albicans* sólo se encuentra como endosaprófito del tubo digestivo de mamíferos y aves y en los seres humanos son comensales de la cavidad oral.

La infección ocurre a partir de un foco endógeno y en pocas ocasiones, del medio externo. Los hongos actúan como oportunistas y se convierten en patógenos cuando hay alteraciones de la inmunidad celular; como en inmunodeprimidos; a consecuencia de cambios fisiológicos normales.

La candidiasis puede ser enfermedad ocupacional o transmitirse por contacto sexual. Los factores predisponentes son múltiples y muchas veces pueden combinarse, como es el caso de la cavidad oral se relacionan con aplicación local de antibióticos o pérdida del espacio interdental por uso de prótesis inapropiadas.

La *Candida* puede afectar cualquier tejido, incluso hueso y articulaciones, La localización en esófago es consecuencia de extensión a partir de la cavidad bucal. La colonización primaria de la membrana (Henderson DK., 1989) y mucosa es un factor importante en infecciones invasivas más recientemente se ha demostrado la asociación de la *Candida* con el SIDA ya que puede ser uno de los primeros signos del virus de inmunodeficiencia humana (Holmstrup P, et al 1990). La candidiasis orofaríngea y esofágica es una infección que ataca a la mayoría de la población infectada con VIH. (Spencer PM et al 1989)

La gravedad de la infección depende sobre todo de las alteraciones primarias del huésped más que de las propiedades patógenas del hongo.

En pacientes con sida se encuentra con mayor frecuencia el serotipo B, pero al parecer no son cepas en particular virulentas.

*Cándida* es una levadura con capacidad de producir filamentos. La fase levaduriforme está relacionada con la fase saprofitica y con la iniciación de lesiones clínicas; en cambio la fase micelial se relaciona con la forma parasitaria e invasora de casi todos los hongos dimorfos. En estudios recientes se señala que las levaduras se adhieren, por medio de mananas al epitelio antes de invadirlo; se ha encontrado en la pared celular una glicoproteína ácida que es el componente antigénico de mayor importancia; también se ha encontrado una candidotoxina que es tóxica invitro para células animales e in vivo produce eritema. Por estudios histoquímicos se ha encontrado que la superficie de la levadura tiene gran importancia durante el fenómeno de la invasión y destrucción debido a producción de fosfolipasas y quizá, de enzimas hidrolíticas. (Arenas R. 1993).

Las manifestaciones y el diagnóstico de las infecciones causadas por levaduras de tipo *Cándida* en cavidad oral pueden ser categorizadas básicamente como:

**Categoría I:** Candidiasis oral, que pueden ser infecciones confinadas al tejido oral y perioral.

**Categoría II:** Candidiasis secundaria es un desorden en el cual las manifestaciones candidosas son generalizadas, mucocutáneas sistémicas.

La candidiasis oral puede ser subdividida de acuerdo al criterio clinicopatológico en los siguientes tipos: (BUDTZ-J, LOMBARDI T 1994.)

Tipo agudo que se divide en Pseudomembranoso y eritematoso, el tipo crónico que se subdivide en Pseudomembranosa, eritematosa, liquen plano y nodular y la *Cándida* asociada a lesiones como la queilitis angular, estomatitis por dentaduras y la glositis romboidal media.

El criterio usado para el diagnóstico y clasificación de la candidiasis oral dentro de estos grupos tenemos tradicionalmente incluidos:

Áreas blancas o áreas difusas eritematosas

Culturas de *Cándidas* positivas

Presencia de micelios en exámen directo del extendido de la lesión

Exámen de biopsia que demuestre hifas en el epitelio

Cambios histológicos característicos

Niveles altos de anticuerpos contra *Cándida* en suero y saliva.

El diagnóstico podría ser basado en la presencia de cambios clínicos consistentes con candidiasis, la presencia de hifas o pseudomembranas en extendidos de lesiones y especies de *Cándida* en lesiones. En las formas eritematosa y atrofica las levaduras sobre el extendido es generalmente menos importante en la *Cándida* pseudomembranosa o hiperplásica. (MARTIN MV, 1986) En estomatitis producida por dentaduras, la cual es la más común de las formas de candidiasis oral la cual es una lesión eritematosa que recubre la mucosa y cuya etiología es multifactorial. Para el diagnóstico es muy importante obtener o cuantificar levaduras sobre las superficies dentales y sobre toda la mucosa.

En pacientes con sospecha de candidiasis oral y/o aguda, el diagnóstico se confirma semicuantitativamente o microscópica y/o exámen directo.

Una biopsia y un exámen histológico son primarios e indicados en tipos de placas crónicas o nodulares y la detección de estados malignos asociados con infecciones producidas por *Cándida*. Idealmente el diagnóstico oral de éstas levaduras se basa sobre la combinación de identificación micológica y una valoración de signos y síntomas clínicos que podrían ser realizados antes del tratamiento antifúngico.

En pacientes inmunocomprometidos la infección fúngica es frecuente como causa de estados febriles, síntomas sépticos o signos inflamatorios localizados o diarreas eventuales. Sin embargo la transmisión podría ser por contacto directo como un patógeno nosocomial en pacientes inmunosuprimidos. La colonización por *Cándida* es uno de las primeras manifestaciones en

pacientes inmunocomprometidos el cultivo extraído de cavidad oral y la faringe podría ser obtenido antes de que los pacientes entren en períodos profundos de granulocytopenia. En pacientes inmunocomprometidos es muy importante determinar la susceptibilidad de las levaduras a agentes antimicóticos antes del tratamiento. Esto se podría realizar sin embargo los test realizados in vitro de agentes antifúngicos pueden no demostrar respuesta in vivo. (CIDALIA P, ET AL 2000)

Dentro de los antifúngicos encontramos los polienos que es un macrolido, la nistatina y la anfotericina B, los derivados del imidazol, clotrimazol, miconazol, ketoconazol, itraconazol y el biguanadine- bis - cationico antiséptico clorhexidina que es una medicina de uso tópico intraoral y de uso sistémico. (MACNEILL S ET AL 1997) Dentro de los aspectos que entrarían a evaluarse de los agentes antifúngicos sería: Indicación, acción, período de tratamiento, complicaciones, efectos secundarios y resistencia de la *Cándida*.

El modo de acción de los polienos es la membrana plasmática de los hongos incrementando la permeabilidad celular. La resistencia fúngica es virtualmente no conocida. La nistatina es usada solamente tópicamente como tabletas, pastillas o suspensión, el problema con la nistatina es que no es agradable, la nistatina en tabletas de 500.000UI puede ser usado para el tratamiento de candidiasis oral sin embargo ésta no es muy efectiva como la suspensión o las pastillas. (Martin MV 1986). La hipersensibilidad puede darse en algunos casos. (Martin MV, 1990) El efecto de la clorhexidina se ha evaluado para el tratamiento y prevención de *Cándida* asociada a estomatitis por prótesis (Axéll T, Budtz 1989, Budtz-jørgensen E, 1972) la clorhexidina es efectiva en tratamientos asociados a estomatitis por prótesis dental usándola como rince para el tejido o como agente para las dentaduras. La acción de la clorhexidina sobre las levaduras puede ser mayor en la inhibición de la adherencia de especies de *Cándida* al acrílico de la dentadura (McCourtie J, 1985, McCourtie J, 1986). Sin embargo la pérdida del color de las dentaduras puede ser un problema. En niños con leucemia puede ser un gran problema con candidiasis pseudomembranosa, la clorhexidina al 0.2% solución ha mostrado tener un efecto clínico excelente. (Langsslet A Olsen I, 1974)

Los Objetivos planteados fueron los siguientes:

El general evaluar la actividad antimicrobiana de extractos de algunas especies de *Gnaphalium* y *Achyrocline* sobre *Streptococcus mutans* y *Cándida albicans* causante de caries dental y lesiones en cavidad Oral.

Y en los específicos.

evaluar la actividad antimicrobiana (antibacteriana) de extractos de *Gnaphalium* y *Achyrocline*, contra *Streptococcus mutans*

Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de extractos de *Gnaphalium* y *Achyrocline* contra *Streptococcus mutans*

Evaluar la actividad antifúngica de extractos de *Gnaphalium* y *Achyrocline* contra *Cándida albicans*.

Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de aceites esenciales de *Gnaphalium* y *Achyrocline* contra *Cándida albicans*.

## METODO

El tipo de estudio fue Ensayo clínico cuantitativo Fase 1 prueba de laboratorio y la Población en estudio estuvo Constituido por cepas de *streptococcus mutans*, y *Cándida albicans*.

Las variables que intervinieron fueron:

Tipos de microorganismos

*Streptococcus mutans*

*Cándida albicans*

Crecimiento bacteriano

Actividad antibacteriana

Actividad antifúngica

### Temperatura

bacteriana 35.5 ° C.

fúngica 25-30°C

Los instrumentos que se utilizaron para efectos de este estudio fueron los siguientes :

Pruebas Bioquímicas para la identificación de *Streptococcus mutans* (Koneman 1999).

Y Para el instrumento 2 para la identificación de la muestra "b" tomada del dorso de la lengua se tuvo en cuenta el examen clínico:

- Test de raspamiento (positivo) y aspectos macroscópicos y microscópicos como:
- Presencia de clamidosporas de pared gruesa sostenidas aisladamente o en racimos, habitualmente en los ápices de pseudohifas

y/o blastoconidias producidas en densos racimos regularmente espaciadas a lo largo de las pseudohifas.

- c- Prueba de tubos germinativos que consistió en un inóculo muy pequeño aislado de levaduras se suspendió en 0,5 ml de suero de cordero, el tubo inoculado se incubó a 35°C durante 3 horas y se colocó una suspensión de levaduras en un portaobjetos limpio, se cubrió y se observó con bajo poder en busca de tubos germinativos, los cuales se observaron como apéndices y 3-4 veces la longitud de las células de levaduras de las cuales se originaron.

El procedimiento fue el siguiente:

Para el aislamiento primario se tomaron muestras de un paciente que presentaba caries activa en surcos de molares; para la evaluación de *Cándida* se tomó de la parte dorsal de un paciente en donde ante el examen clínico se determinó sugestivo de *Cándida sp.*

El aislamiento bacteriano primario de las muestras a, b, se llevó a cabo en agar sangre y azida de sodio mediante la técnica de agotamiento; se incubó por un lapso de 24 horas en ambiente de anoxigenia, donde se observarán las características macroscópicas, metabólicas y microscópicas de las colonias. (Koneman 1999)

Para la identificación bacteriana se utilizaron las pruebas bioquímicas correspondientes para cada microorganismo descritas por Koneman en 1999.

Las especies se recolectaron en los alrededores de la sabana de Bogotá en el municipio de la calera a una altura aproximada de 2600 mts y se recogieron en período de floración y se transportaron empacados en bolsas, las cuales inmediatamente se llevaron al laboratorio donde se procedió a separar cada una de sus partes (hojas, tallos y flores) y se dejaron al medio ambiente bajo techo.

Para la obtención de los extractos las plantas se recolectaron y se separaron en hojas, flores y tallos, las cuales se pusieron a secar por separado a temperatura ambiente bajo techo cubierto durante 24 horas. El material seco se homogenizó en un molino eléctrico salvato 35010 curtardo (PD), posteriormente se pesaron cada una de las partes molidas de las plantas (50 gr) y se sometieron a

una extracción continua en soxlhex con etanol para obtener los diferentes extractos, los cuales se concentraron a presión reducida en un rotavapor Buchi E11, y se filtraron. El material seco se pesaron 10 mg y se diluyeron en 2 ml de dimetil sulfóxido (DMSO).

Cada uno de los extractos se sometieron a ensayo antimicrobiano (antibacteriana y fungitóxica).

Los métodos utilizados para la separación de los compuestos fueron seleccionados teniendo en cuenta alguna de las propiedades físicas (polaridad, grado de adsorción y solubilidad) de las sustancias que fueron detectadas en las pruebas químicas preliminares realizadas para los diferentes extractos.

Para tratar los diferentes sustancias se realizaron extracciones S/L con 30ml de CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub> y Eter de petróleo (solventes de mediana y alta polaridad e inmiscibles con el agua) obteniendo las fracciones en Eter de Petróleo : EPH, EPT, EPI ; y diclorometano: EDMH, EDMT, EDMI ; de cada uno de los filtrados secos se pesaron 10 mg de cada una de las sustancias y se diluyeron en 2 ml de DMSO y Eter de petróleo y se sometieron a actividad antimicrobiana y fungitóxica.

En la evaluación de la actividad antimicrobiana se utilizó el método de dilución en agar que es una modificación de la técnica descrita por Bauer; Barry en 1970 describió la técnica Overline la cual tiene como ventaja el empleo de un inóculo más constante.

En éste estudio se empleó el medio BHI para la cepa *Streptococcus mutans*. Para la preparación del inóculo y siembra de la bacteria se tomaron colonias del microorganismo, de cultivos puros de no más de 24 horas, las colonias se llevaron a un tubo que contenía 4 ml del caldo Trypticasa sodio. Este caldo de cultivo se llevó a incubación a 35 °C durante 12 horas de incubación; el cultivo se diluyó en solución salina esteril hasta obtener una turbidez equivalente al tubo N° 2 de Mac Farland el cual corresponde a 600 millones de gérmenes viables por mililitro; se adicionó a la caja de petri esteril en donde se mezcló con agar BHI que se encontraba a una T° de 45°-50°C, una vez mezclados se dejó solidificar y se realizaron perforaciones en el agar. A partir del método del disco se hizo una modificación, método de perforaciones en placa; con un sacabocado esteril se hicieron perforaciones de 6 mm de diámetro sobre el agar y dentro de éstos orificios se agregaron los diferentes extractos. Se llevaron a incubación por 24 horas a 35°C en anoxigenia, antes de obtener datos.

Para evitar falsos positivos se hicieron patrones. En uno de los medios empleados en este estudio se sembró la bacteria para observar si ésta crece bien en este medio (Control del Inóculo) además se tuvo un control negativo (Control de inactividad del solvente). A manera de comparación se colocaron 50 ug/ml del antibiótico:

Amoxicilina, (Control del halo de Inhibición).

Se evaluó la posible actividad que tendría el Listerine frente a ésta bacteria (enjuague bucal recomendado para el control del crecimiento de la placa bacteriana).

El método utilizado para la evaluación del hongo *Cándida albicans* se realizó en agar Muller Hinton ; el Comité de la Organización Mundial de la Salud para la estandarización de pruebas de susceptibilidad ha aceptado el medio Müller Hinton para las pruebas ante éstos microorganismos, debido a sus posibilidades de reproducción y aceptación por aquellos dedicados a trabajos en este campo.

A partir de un cultivo puro de no más de 24 horas que se encontraba en fase estacionaria de *Cándida albicans* se realizó una suspensión en 4 ml de caldo nutritivo hasta el patrón 0.5 de Mac Farland y se sirvió en una caja de petri esteril, se mezcló en 15 ml de Agar Muller Hinton que se encontraba a una temperatura de 45-50°C.

- Después de sembrado el microorganismo se dejó solidificar el agar y con la ayuda de un sacabocado esteril se abrieron 5 pozos de 6 mm de diámetro en donde se depositaron los extractos de EEH, EET y EEF con DMSO.

Como Stock se utilizó 10mg de cada uno de los extractos totales EEH, EET y EEF diluidos en 2 ml de DMSO (5ug/ul) y cada uno se diluyó hasta 25, 50, 100, 200, 250 ug/ul y se depositaron en cada uno de los pozos.

Se llevó a incubar a 25,5 °C por 24 horas.

Al cabo de este tiempo se detectó la presencia de halos de inhibición en donde se determinó el efecto de cada uno de los extractos EEH, EEF y EET sobre la *Cándida albicans*.

**Barry, Overlay 1970**

Se emplearon 4 controles en el ensayo.

1 - Control de medio de cultivo Muller Hinton

2 - Control de crecimiento normal del hongo en el medio Muller Hinton

3 - Control positivo Nistatina, antibiótico de primera elección en infecciones causadas por *Cándida albicans*.

4 - Control negativo DMSO

El medio que se empleó como cultivo de mantenimiento de la *Cándida*

*albicans* fue P.D.A. (Papa- Dextrosa-Agar) en el cual este tipo de hongo tiene una curva de crecimiento adecuada. El inóculo empleado se tomó a partir de este medio PDA y se mantuvo la cepa en fase estacionaria haciendo repiques cada 24 horas e incubandolos a 25,5 °C

## RESULTADOS Y DISCUSION

### (Antibacteriana y fungitoxica).

Para cada uno de los datos obtenidos, se determinó el porcentaje de inhibición (%I) a las diferentes concentraciones, tomando el control positivo con un %I = 100.

Los (%I) permitieron calcular los porcentajes de crecimiento (%C) según la siguiente ecuación.

$$\% I = 100 - \% C$$

$$\% C = 100 - \% I$$

Para estudiar la acción antibiótica de las plantas *Gnaphalium elegans*, *Achyrocline bogotensis* y *Achyrocline sp.* Fue necesario la extracción de sustancias alta y medianamente polares con el fin de determinar si la actividad antimicrobiana era ejercida por alguna de éstas.

Los extractos totales de hojas, tallos y flores contienen flavonoides que son pigmentos de (Quercetina) que se localizan frecuentemente en la cutícula, flores y en forma de glucósido en las hojas y los terpenos se presentan en los aceites de las flores, frutos y semillas; guiandonos de una manera más precisa hasta el sitio de la planta en la que se encuentra más acumulada la sustancia con acción antibiótica.

Los extractos evaluados se les declaró activos frente a *Streptococcus mutans*, cuando el halo de inhibición fue similar al del antibiótico control, Amoxicilina. Aunque lo establecido por Kirby Bauer para los ensayos de susceptibilidad el halo debe ser superior a 21mm, Teniendo en cuenta que no estamos trabajando con sustancias puras, sino con una mezcla de ellas y debido a que el diámetro del halo depende de la difusión de la sustancia sobre el agar, un halo de inhibición mayor de 20 se consideró como extracto activo con poder antibacteriano.

Los extractos que manifestaron actividad antibacteriana fueron reevaluados a los 8 días con el fin de reevaluar el resultado inicial y conocer algo de las sustancias responsables de la actividad antibacteriana. Los ensayos practicados después

de 8 días de permanecer el extracto en la nevera arrojaron resultados iguales a los iniciales mientras que los que permanecieron a temperatura ambiente no mostraron ninguna acción, lo que indicó que las sustancias que poseen acción antibacteriana son inestables a temperatura ambiente, posiblemente se oxidan con el aire; razón por la cual los extractos utilizados debieron permanecer tapados y refrigerados.

Para conocer la acción que ejercen las sustancias de los extractos en el estudio se tomó una muestra a partir del halo de inhibición y se hizo un repique en agar sangre y a las 24 horas se volvió a repicar en agar sangre. La inhibición del crecimiento desapareció ya que el extracto no se encontraba en el agar; por lo tanto los extractos poseen poder bacteriostático.

Control del crecimiento del inóculo: para que se considere válida una acción antibiótica es necesario que haya crecimiento en el medio en el cual se efectuó el ensayo; se inoculó la bacteria y la levadura en los agares BHI Y Muller Hinton sin ninguna clase de sustancia inhibitoria.

Control de la inactividad del solvente: También es necesario comprobar que los solventes utilizados (etanol, eter de petroleo, diclorometano) en la extracción de las sustancias, no interfieran en el crecimiento de los microorganismos, por lo tanto en los medios utilizados se adicionaron cantidades de solvente iguales a las agregadas por el extracto.

Para estudiar la actividad antifúngica de los extractos sobre la *Cándida albicans* se escogió el método de dilución en agar en el cual a 4 ml de suspensión se llevo hasta la escala de MacFarland y se mezcló uniformemente con el agar Muller Hinton fundido. Los extractos se colocaron en los pozos se incubaron, al cabo de 24 horas se declararon inactivos frente a *Cándida albicans*.

La interacción de las sustancias disueltas o suspendidas en el medio de cultivo y cada una de las células inoculadas es directa e inmediata, por lo tanto cualquier sustancia insoluble podrá ejercer su acción aunque no existan condiciones adecuadas para la buena difusión.

La interacción de las sustancias disueltas o suspendidas en el medio de cultivo y cada una de las células inoculadas es directa e inmediata, por lo tanto cualquier sustancia insoluble podrá ejercer su acción aunque no existan condiciones adecuadas para la buena difusión.

El crecimiento bacteriano puede medirse en términos de concentración celular, la cuenta de las células viables se considera proporcional a la medida de concentración celular determinando la absorción de la luz o la dispersión de ella por medio del cultivo mediante procesos fotométricos relacionando los datos obtenidos con el tiempo, dando como resultado una curva estándar de crecimiento; dado que la reproducción celular es fisión binaria, una célula que se divide produce dos; el crecimiento de la población será en progresión geométrica. El tiempo de generación para una población celular es variable, sin embargo el desarrollo no se modifica, la población permanece temporalmente inalterada adaptándose al medio sintetizando enzimas y protoplasma nuevo; ésta fase se denomina fase de retardo, seguidamente las células se multiplican regularmente al ritmo constante, el desarrollo es máximo cuando se encuentra en la fase logarítmica o exponencial, luego cesa el crecimiento y la población permanece por un tiempo constante; se encuentra en fase estacionaria, finalmente los nutrientes se agotan la población muere y la curva declina.

La técnica de dilución en un tubo es la utilizada en éste ensayo para determinar la actividad mínima del extracto requerida para inhibir el desarrollo o crecimiento del microorganismo invitro, cantidad denominada CIM (Concentración inhibitoria mínima).

En éste ensayo se adicionó a los tubos con el microorganismo concentraciones de los extractos que presentaron actividad inhibitoria ante la bacteria, para evitar los falsos negativos que puedan presentarse durante la lectura a 580nm en el espectrofotometro ( Baush Lomb, spectronic 20 ) se leyeron los tubos contra blanco de caldo de Trypticasa de sodio esteril con los extractos a diferentes concentraciones, de ésta manera de los materiales o la opacidad que adquiera el medio de cultivo no interferirá en la evaluación.

## CONCLUSIONES

Los resultados de ésta investigación permiten concluir:

Los extractos totales de flores y hojas de *Gnaphalium elegans*, *Achyrocline bogotensis* y *Achyrocline sp*, son activos frente a *Streptococcus mutans*.

Los extractos totales de flores y hojas de *Gnaphalium elegans*, *Achyrocline bogotensis* y *Achyrocline sp*, son inactivos frente a *Cándida albicans*.

Las fracciones de los extractos en eter de petroleo y diclorometano resultaron activas frente *Streptococcus mutans*.

## RECOMENDACIONES

Efectuar estudios in vitro utilizando los mismos extractos con otros microorganismos que contribuyan a la enfermedad periodontal y/o caries dental.

Ampliar el estudio de las especies de *Gnaphalium* y *Achyrocline* utilizando estudios complementarios sobre sustancias que ayuden al conocimiento de éstas plantas bastante distribuidas en Colombia

## AGRADECIMIENTO

A Laboratorios Merck de Colombia, por su colaboración.

A la Pontificia Universidad Javeriana, por su colaboración.

## BIBLIOGRAFIA

**ADDY M**, Renton- Harper P, MyattG: A plaque index for occlusal surface and fissures. Measurement of repeatability and plaque removal. J. Clin periodontal 1998: 25: 164-168.

**ANGARITA,B** Contribución al estudio de los flavonoides del género *Gnaphalium* y análisis Fitoquímico de la vira vira *Gnaphalium pellitum*. Tesis de Grado. Universidad Javeriana, Bogotá,1977.

**AXELL T**, Budtz-Jørgensen E, Oksala E, Olsen I, Skoulund LA. Noen synspunkter pa diagnostik og behandling av oral candidose.Nor Tannlaegeforen Tidn 1989:99: 156-60.

**BARRIOS G**, Periodoncia su Fundamento Biológico O.P. Graficas .LTDA Bogotá-Colombia.1989.

**BODEY GP**. Candidiasis in cancer patients. Am j Med 1984: 77: 13-19.

**BODEY GP**. Azole antifungal agents. Clin Infec Dis 1992:14(Suppl 1): S161-169.

**BOGOTA, C**. Contribución al estudio Fitoquímico de la vira vira *Gnaphalium elegans*. Tesis de grado. Universidad Javeriana. 1977.

**BOUGNOUX ME**, Gueho E, Potocka AC.Resolutive Candida utilisitis fungemia in a non neutropic patient. J Clinic Microbiol 1993:31:1644-1645.

**BROOKI. Itzhak** , Anaerobic infeccion in childhood. Reviews of infections Diseases.v.g. Supplement I (march-april),p.p . S187-92. 1984.

**BUDTZ EJ Vind**. Jørgensen. Antifingical therapy in the oral cavity Periodontology 200 1996:10:89-106

**CIDALIA P**. Antifungal activity of ibuprofen alone and in combination with fluconazole against Candida species. J Med. Microbiol 2000:49:831-840.

**CRONQUIST, A.**, Introducción a la botánica. Ed. Continental, segunda edición, México, 650-70. 1982.

**CROUDEN, R.K**. Obtusifolium: una flavona con biosíntesis inusual. Chem. Abs. 74:1980,1971.

**ESCARRIA, S. TORRENEGRA, R and ANGARITA, B**.Phytochemistry, 16:1628,1977.

**GIBBONS R.J. AND VAN HOUTE**, Bacterial adherence. E.d. by E.H..New York Pp 63-104.1980.

**GMUR, R & Guggenheim, B** 1994. Interdental supragingival plaque A natural habitat of *Actinobacillus actinomicetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter rectus* and *Prevotella nigrescens*. Journal of Dental Reserch 73, 1421-1428.

**GOLA, G. NEGRI,G. Y CAPELETTI,** Tratado de botánica, Ed. Labor segunda edición Barcelona, 927-1008. 1975.

**HENDERSON DK**. Defining risk for nosocomial candidemia. Arch Intern Med 1989:149:2172-2173.

**HOLMSTRUP P**, Samaranayake L.P. Acute and AIDS-related oral candidoses. In: Samaranayake L.P., MacFarlane TW, ed. Oral candidosis. London: Jhon Wright, 1990:133-155.

**JOEL B.** The efficacy of chlorhexidine gel in reduction of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* species in patients treated with radiation therapy. Oral Surg. Oral Med., Oral Pathol 1991; 71: 172-178.

**LITTER, M** Buenos Aires. Farmacología experimental y clínica. Editorial Buenos Aires. Cuarta edición. 1971.

**LISTGARTEN, M.A.,** Mayo, H.E. & Tremblay, R. Development of dental plaque on epoxy resin crowns in man. A light and electron microscopic study. Journal of Periodontology 1975:46, 10-26.

**LISTGARTEN, MA** Structure of the microbial flora associated with periodontal health and diseases in man. Journal of Periodontology 1976: 47, 1-8.

**LISTGARTEN, M.A.** The structure of dental plaque. Periodontology 2000 1994:5, 52-65.

**LOIMARANTA V.** Colostral proteins from cows immunised with *Streptococcus mutans*/ *S. Sobrinus* support the phagocytosis and killing of *mutans* Streptococci by human leucocytes. J Med. Microbiol:1999:48: 917-926.

**MACNEILL S.** Effects of tetracycline hydrochloride and chlorhexidine gluconate on *Candida albicans*. J Clin. Periodontol 1997:24: 753-760.

**MARTIN MV,** Antifungal agents in Samaranayake L.P., MacFarlane TW, ed. Oral candidosis London: Jhon Wright, 1990: 238-251.

**MARTIN MV,** Farrelley PJ, Hardy P. An investigation of the efficiency of nystatin for the treatment of chronic atrophic candidosis (denture sore mouth). Br Dent J 1986:160: 201-204.

**MC COURTIE J,** MacFarlane Tw Samaranayake L.P. Effect of chlorhexidine gluconate on the adherence of *Candida* species to denture acrylic. J Med Microbiol 1985:20:97-104

**MC COURTIE J,** MacFarlane Tw Samaranayake L.P. Effect of chlorhexidine gluconate, amphotericin B and nystatin on the adherence of

*Candida* species to denture acrylic. J Antimicrob Chemother 1986:17:575-583.

**MOORE, W.E.C. & Moore L.V.H.** 1994 The Bacterial and periodontal diseases. Periodontology 2000 5, 66-67.

**NEWMAN M.G.** Anaerobic oral and dental infection. Reviews of infections diseases. V.G. Supplement I (March - April) p.p.107-13. 1984.

**PEDRAZA, G.S.,** Contribución al estudio de los flavonoides y sus glicosidos en *Gnaphalium meridianum* y sus posibles efectos fisiológicos. Tesis de grado. Universidad Javeriana. 1980.

**ROBERT B.** Acute susceptibility of age mice to infection with *Candida albicans*. J Med. Microbiol 1999:48: 1095-1102.

**ROJAS, C.** Contribución al estudio Fitoquímico de *Gnaphalium rufescens*. Tesis de grado. Universidad Javeriana. Bogotá, 1984.

**RUSELL, M.,** Do antiseptics and disinfectants select for antibiotic resistance. J Med. Microbiol. 1999 ;8: 613-615.

**SOCRANSKY SS,** Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr. Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. J. Clin. Periodontol 1998; 25:134-144.

**SOUCHAY A.** Mineralization of *Streptococcus mutans* in vitro an ultrastructural study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1995:79:311-320.

**SPENCER PM,** Jackson GG. Fungal and mycobacterial infection in patients infected with the human immunodeficiency virus. J Antimicrob Chemother 1989:23:107-125.

**SLOTS J,** Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Journal of clinical Microbiology. 1981:15: 606-609.

**SUTTER V.I.** Anaerobics as normal oral flora. Reviews of infections diseases V.G. Supplement I (March - April) p.p. S62- 5. 1984..

**TORRENEGRA, RD** y Col. 5,7- Dihidroxi 3,6,8- trimetoxi- flavona from the flowers of *Gnaphalium elegans*. Phytochemistry 19 pp. 2795-96. 1980.

**TORRENEGRA, RD., ESCARRIA, S.** España. Plantas Colombianas del género *Gnaphalium* (II). Revista Latinoamericana de química. 10 pp . 83-4. 1979.

**TORRENEGRA, R Y PEDROZO, J.** Estudio quimiotaxonómico de los generos *Gnaphalium* y *Achyrocline* , Rev. Asoc. Cienc. Biol. Barranquilla (Col. 2910- 33-44)1982.

**TORRES D.I.** Contribución al estudio Fitoquímico del *Gnaphalium colombianum* y sus posibles efectos fisiológicos. Tesis de grado, Universidad Javeriana, Bogotá 1980.

**VINCHIRA, J.P.** Bogotá. Estudio fitoquímico y efectos fisiológicos de *Gnaphalium Graveolens*. Tesis de grado. Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Departamento de Química. 1980.

**WAGNER, H.** Et al. Zur Strucktur and synthese van *Gnaphalium*, Metyl Gnaphalin aus *Gnaphalium* aus *Achyrocline satureioides*. Chem.Ver, 104:2381-2388,1971.

**WHINGMING L.** Lectin-Oral Streptococci interaccions. J Med. Microbiol 1998;47:29-37.

**YOUMANS G.P.** Paterson P.Y., sommers H.M. Secund. Ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia. P.p. 280-305. 1980.

**ZAMBON, J.J.** 1996 Periodontal diseases: microbial Factors. Annals of periodontology 1, 879-925

**ZEE, K.Y., Samaranayake, L.P.& Attstrom, R.**1996. Predominant cultivable supragingival plaque in Chinese rapid and slow plaque formers. Journal of clinical Periodontology 23, 1025-1031.

#### **CORRESPONDENCIA**

**Ana Riaño**  
**Plutarcoan@Hotmail.com.co**