

Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Citrus reticulata* sobre *Fusobacterium nucleatum* asociada a enfermedad periodontal

Antimicrobial effect of essential oil of *Citrus reticulata* on *Fusobacterium nucleatum* associated with periodontal disease

Cindy Giohanna Pardo*, Gladys Stella Monsalve**, Alveiro Erika***, Yeison Espinosa****, Gloria Isabel Jaramillo*****

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.57921

RESUMEN

La clorhexidina como tratamiento de la enfermedad periodontal ha logrado efectos bactericidas sobre periodontopatógenos y biopelícula oral. Su uso genera efectos adversos, por lo tanto se presentan alternativas naturales con efecto antimicrobiano similar. Los aceites esenciales han demostrado efectividad en el control de la placa dental, sin los efectos adversos de la clorhexidina. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto bacteriostático y bactericida del aceite esencial de mandarina contra *Fusobacterium nucleatum*. Se realizó extracción por expresión del aceite esencial de cáscaras de mandarina (variedades Arrayana y One-co). Se evaluaron concentraciones al 20%, 40%, 60%, 80% y 100% del aceite esencial diluido en Tween al 0,02%. El efecto bacteriostático y bactericida se determinó por pruebas de sensibilidad antimicrobiana por difusión en disco. Como control positivo se utilizó Clorhexidina 0,2% y agua como control negativo. Se midió halo de inhibición (mm) y se determinó ausencia o presencia de crecimiento bacteriano a partir de unidades formadoras de colonias. Para comparación de proporciones de la actividad bacteriostática y bactericida, se realizó prueba de Fisher y T student (IC 95% $p = 0,05$). El halo de inhibición a una concentración del 100% mostró comportamiento similar a clorhexidina ($p < 0,05$). Concentraciones al 100% y 80% fueron bactericidas, al 60%, 40% y 20% presentaron comportamiento bacteriostático. No se encontraron diferencias significativas en las proporciones de inhibición entre las dos variedades de mandarina ($p > 0,05$). El uso de aceites esenciales de mandarina podría ser una alternativa complementaria al tratamiento de la enfermedad periodontal.

Palabras clave: aceite esencial, agente antimicrobiano, cítrico, cavidad oral, odontopatógenos

-
- * Odontóloga OD, Universidad Cooperativa de Colombia-Facultad de Odontología, Cra 13ª No. 38-22 Bogotá, Colombia.
E-mail: cindypar05@hotmail.com
- ** Odontóloga OD, Universidad Cooperativa de Colombia-Facultad de Odontología, Cra 13ª No. 38-22, Bogotá, Colombia.
E-mail: gladysmonsalve-94@hotmail.com
- *** Odontólogo MSc, Universidad Cooperativa de Colombia-Facultad de Odontología, Cra 13ª No. 38-22, Bogotá, Colombia.
E-mail: halverash@gmail.com
- **** Microbiólogo MSc, Universidad Cooperativa de Colombia-Facultad de Odontología, Cra 13ª No. 38-22 Bogotá, Colombia.
E-mail: yeisone@hotmail.com
- ***** Bióloga PhD, Universidad Cooperativa de Colombia-Facultad de Medicina, Cra 35 No. 36-99 , Bogotá, Colombia.
E-mail: gloriaisabeljaramillo@gmail.com

ABSTRACT

Chlorhexidine as a treatment of periodontal disease has achieved bactericidal effects over periodontopathogens and oral biofilm. Its use generates adverse effects; therefore natural alternatives are presented with a similar antimicrobial effect. Essential oils have proved effective in controlling dental plaque without the adverse effects of chlorhexidine. The aim of this study was to determine the bacteriostatic and bactericidal effect of essential oil of tangerine against *Fusobacterium nucleatum*. The extraction of the essential oil was performed by expression of tangerine peels (Arrayana and Oneco varieties). Concentrations at 20%, 40%, 60%, 80% and 100% of the essential oil diluted in 0,02% Tween were evaluated. The bacteriostatic and bactericidal effect was determined by antimicrobial susceptibility testing by disk diffusion. As a positive control 0,2% chlorhexidine and water as negative control were used. Inhibition zone (mm) was measured and presence or absence of bacterial growth was determined from colony forming units. To compare proportions of bacteriostatic and bactericidal activity, Fisher and T student test (95% CI $p = 0,05$) were performed. The 100% concentration zone of inhibition showed a similar behavior as chlorhexidine ($p < 0,05$). 100% and 80% concentrations were bactericides, 60%, 40% and 20% showed bacteriostatic behavior. No significant differences between the proportions of inhibition of the two varieties of tangerine ($p > 0,05$). The use of essential oils of tangerine could be a complementary alternative to treatment of periodontal disease.

Key words: essential oil, antimicrobial agent, citric, oral cavity, oral pathogen

Recibido: enero 18 de 2017 **Aprobado:** noviembre 8 de 2017

INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal es la patología más frecuente en cavidad oral a nivel mundial, son varios los factores etiológicos asociados, sin embargo, el más relevante es la presencia de placa bacteriana, dado que las bacterias allí presentes interactúan y desencadenan el inicio y progreso de la misma (Ferro & Gomez, 2007). En la población colombiana, los marcadores microbiológicos más significativos para la aparición de la enfermedad periodontal son: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Fusobacterium nucleatum* (Van Winkelhoff et al., 2002; Crandall et al., 2012).

Dependiendo de la respuesta producida por el huésped (edematosa o fibrosa), a los mecanismos bacterianos se generan signos clínicos de enfermedad periodontal, los cuales pueden ser tratados clínicamente (terapias mecánicas y su potencialización con el uso de terapias antibióticas) (Drake & Villhauer, 2011), química (colutorios, cremas) (Cha et al., 2007) o naturalmente (Mosquera & Veloz, 2011).

La clorhexidina, una bisguanida catiónica (Cha et al., 2007), se ha empleado como agente antimicrobiano de amplio espectro. Aunque actúa como un potente bacteriostático o bactericida según la concentración, causa efectos adversos sobre los tejidos dentales, células epiteliales y restauraciones existentes. Por tal motivo, el uso de plantas como fuente de principios activos antimicrobianos, ha generado gran interés en

el tratamiento de múltiples patologías y algunos microorganismos orales (Neira & Ramirez, 2005; Vitery et al., 2010), ya que son de fácil acceso, bajo costo y pocos efectos colaterales indeseables (Cha et al., 2007).

Dentro de las alternativas de origen natural se encuentran los aceites esenciales, fracciones líquidas volátiles responsables del aroma de las plantas. Es posible extraer el aceite esencial de hojas, raíces, pericarpio del fruto, semillas, tallo, flores y frutos (Mosquera & Veloz, 2011). Estos aceites poseen acción bacteriostática y bactericida, dependiendo de la concentración y el tipo de aceite. Se han utilizado como enjuagues bucales mostrando efectividad en el control de la placa dental y en el desarrollo y progreso de enfermedades que comprometen las estructuras de soporte dental (Kuboniwa & Lamont, 2010).

Aceites esenciales extraídos de plantas de la familia *Rutaceae* (naranja, limón, mandarina) han mostrado efectividad antimicrobiana (Shankar & Mohan, 2014). Los aceites esenciales de la cáscara de naranja son efectivos para controlar *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. (Pittman et al., 2011), *Mycobacterium tuberculosis* y otras Micobacterias no tuberculosas (Crandall et al., 2012; Espina et al., 2011). El aceite esencial de *Citrus aurantium*, presenta propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, ansiolíticas y antimicrobianas (Fuselli et al., 2008), presentando una mayor efectividad sobre bacterias Gram positivas (Tsai et al., 2008).

El Aceite esencial (AE) de mandarina (*Citrus reticulata*) presenta inhibición de crecimiento bacteriano contra *Enterococcus faecium* (ATCC 19434), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Salmonella entérica* subsp. entérica ser. Enteritidis (ATCC 49214) y *Escherichia coli* O157:H7. El aceite esencial de mandarina tiene actividad antibacteriana del tipo bactericida contra *B. subtilis*, *S. aureus* y *L. monocytogenes* (Martinez et al., 2003), *Shigella flexneri* y los hongos *Neurospora crassa* y *Candida albicans* (Hsouna et al., 2013; Martinez et al., 2003).

Basados en la evidencia científica y en la efectividad de los aceites esenciales de cítricos frente a otros microorganismos con características similares a los presentes en cavidad oral, se hace necesario el estudio y análisis *in vitro* de estas sustancias naturales para determinar su posible aplicabilidad en el tratamiento patologías más importantes en cavidad oral, abriendo la senda para futuros estudios *in vivo* de compuestos cítricos que busquen complementar las terapias convencionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de tipo experimental *in-vitro*, a partir de cepas referencia ATCC de *Fusobacterium nucleatum*. Tomando como unidad muestral las unidades formadoras de colonia con crecimiento homogéneo y sin contaminación. Se tomaron en cuenta las siguientes variables para el desarrollo de los experimentos: variedad del aceite esencial (Oneco/Arrayana), halo de inhibición a diferentes concentraciones (100%, 80%, 60%, 40% 20%), actividad bactericida a diferentes concentraciones (100%, 80%, 60%, 40% 20%) y actividad bacteriostática a diferentes concentraciones (100%, 80%, 60%, 40% 20%).

Extracción aceite esencial

Se seleccionaron frutos frescos de las variedades de Arrayana y Oneco que no presentaran ningún tipo daño en el pericarpio y con un tiempo de recolección inferior a un día; asegurando que su procedencia fuera de algún municipio aledaño a la ciudad de Bogotá y del mismo proveedor para contar con frutos de edades similares y cultivadas bajo los mismos parámetros agrícolas. El centro de adquisición de las mandarinas fue en la central de abastos (Corabastos) de la Ciudad de Bogotá.

Una vez en el laboratorio, los frutos fueron lavados con agua corriente y agua destilada, posteriormente fueron dispuestos en una superficie sobre toallas de

papel para su secado. Se retiró manualmente el pericarpio de la mandarina y se pesó el producto en balanza analítica.

Se realizó la extracción del aceite esencial indicado para cítricos, por medio de la técnica de expresión o presión en frío (Navarrete et al., 2010); el pericarpio fue sometido a presión mecánica para la extracción del aceite el cual fue colectado en una caja Petri de 90 mm a 37 °C, posteriormente con una micropipeta se recogió el material en tubos eppendorf de 1,5 ml.

Para garantizar la separación del aceite esencial de otros compuestos y la pureza del mismo, las muestras fueron centrifugadas durante 30 seg, luego el sobrenadante (correspondiente al aceite esencial) se separó en un tubo nuevo, esta operación se repitió al menos dos veces. Las muestras purificadas fueron envueltas en papel aluminio y refrigeradas a 4°C hasta su utilización.

Una vez extraído el aceite esencial y justo antes de realizar las pruebas microbiológicas, se prepararon diluciones porcentuales del AE en un volumen final de 100 µl (tabla 1).

Tabla 1. Diluciones seriadas (%) del Aceite Esencial (AE) de mandarina (variedades Arrayana y Oneco) en Tween 20 para pruebas microbiológicas.

Dilución AE %	AE µl	H2O µl	Tween 20 µl
100	100	-	-
80	80	18	2
60	60	38	2
40	40	58	2
20	20	78	2

Cultivo Bacteriano

Se trabajó en el medio de cultivo Agar Sangre enriquecido con sangre de cordero 5% para suplementada con Hemina y Menadiona, incubando por 5-8 días a 37 °C en condiciones de anaerobiosis.

Las cepas microbianas fueron reactivadas y se mantuvieron en medio de conservación leche al 10 %, luego se cultivaron durante 8 días en un ambiente anaerobio con sobres e indicadores de anaerobiosis. Se tomaron de tres a cinco colonias y se inocularon en 1

ml de caldo tioglicolato; se ajustó la turbidez a 0.5 en la escala de Macfarland de forma visual.

Determinación de susceptibilidad para anaerobios

Con la ayuda de un asa de hockey estéril, se esparcieron de forma homogénea, 100 µl de caldo tioglicolato en una caja de Petri con agar, dividida previamente en ocho partes para cada uno de los tratamientos evaluados: 1. Control positivo (clorhexidina al 0,2%), 2. Control negativo (agua), 3. Vehículo (Tween® 20 al 0,02%), 4. Aceite esencial 100%, 5. Aceite esencial 80%, 6. Aceite esencial 60%, 7. Aceite esencial 40%, 8. Aceite esencial 20%. Las diluciones del aceite esencial se realizaron con el emulsionante Tween® 20 (0,02%). Después se colocó un sensidisco en cada división y sobre ellos se aplicó 1 µl de cada tratamiento. Finalmente, las cajas de Petri se llevaron a incubación en recipientes herméticos con sobres de anaerobiosis durante siete días a una temperatura de 35°C a 37°C (Mosquera & Veloz, 2011). Para disminuir la variabilidad y el sesgo, se realizaron tres repeticiones en un mismo día y tres replicas en días diferentes.

La efectividad de los aceites esenciales se calculó midiendo el diámetro (mm) de la zona de inhibición de crecimiento del microorganismo sobre el sensidisco, con un pie de rey. Se determinó la presencia del halo de inhibición y el crecimiento o ausencia de unidades formadoras de colonias UFC dentro del halo; de esta forma se evaluó la actividad bacteriostática definida como la inhibición en el crecimiento de los microor-

ganismos y la actividad bactericida definida como la ausencia del crecimiento bacteriano (Romero, 2007).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo a partir de frecuencias y medidas de tendencia central. Se realizó una prueba de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad de cada variable ($p = 0,05$). Se compararon las proporciones de actividad bacteriostática y bactericida a partir de porcentajes y su variación (IC 95%). Se realizó una prueba de Fisher para determinar la diferencia entre los valores. Las comparaciones de los halos de inhibición en mm se realizaron a partir de los IC 95 %; y la prueba T student para muestras independientes ($p = 0,05$). Adicionalmente se realizó una ANOVA con corrección Bonferroni para determinar la diferencia entre todos los grupos ($p = 0,05$).

RESULTADOS

Teniendo en cuenta los halos de inhibición producidos por los aceites esenciales de las dos variedades de mandarina evaluadas, se observó que el promedio de inhibición para la concentración al 100 % (17,73 mm; IC95 % 15,52-19,94) es similar al producido por el control positivo (18,12 mm; IC95 % 16,24-20), no encontrándose diferencias significativas entre ellas ($p > 0,05$). Los promedios del diámetro de los halos de inhibición disminuyeron a medida que la concentración del aceite esencial también disminuía, presentándose valores entre 0 mm y 24 mm (tabla 2).

Tabla 2. Halos de inhibición de los aceites esenciales de mandarina (variedades *Arrayana* y *Oneco*) frente a *F. nucleatum*.

Concentración	Variiedad	Media (mm)	IC 95%	DS	p^*
100%	Arrayana	16,86	12,10 - 21,62	5,15	0,55
	Oneco	16,67	6,32 - 27,01	4,16	
	Total	17,73	15,52 - 19,94	3,99	0,21
80%	Arrayana	12,71	4,11 - 21,32	9,30	0,65
	Oneco	13,33	17,02 - 43,69	12,22	
	Total	13,77	8,64 - 18,9	8,49	0,04
60%	Arrayana	10,29	5,26 - 15,31	5,44	0,37
	Oneco	13,00	0,14 - 26,14	5,29	
	Total	12,57	9,39 - 15,76	5,52	0,24
40%	Arrayana	6,86	2,41 - 11,31	4,81	0,40
	Oneco	10,00	14,84 - 34,84	10,00	
	Total	7,24	4,39 - 10,08	5,53	0,1
20%	Arrayana	5,57	2,00 - 9,15	3,87	0,73
	Oneco	2,33	7,71 - 12,37	4,04	
	Total	18,12	16,24 - 20,00	3,66	0,79

*Prueba T para muestras independientes.

Las concentraciones menores evaluadas (20% y 40%) tienden a presentar diferencias significativas con las concentraciones mayores (60%, 80% y 100%). La concentración al 20% presentó diferencias significativas en el diámetro del halo de inhibición en relación a las concentraciones de 60%, 80% y 100% ($p>0,05$); y la concentración al 40% presentó diferencias significativas con las concentraciones al 80% y 100% ($p>0,05$).

Al comparar los halos de inhibición de los aceites esenciales de las dos variedades de mandarina, no se observaron diferencias significativas entre ellas a las concentraciones evaluadas ($p>0,05$). Para la variedad Oneco, no se encontraron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones (a partir de las comparaciones entre los IC95%) (tabla 2).

Se observó una actividad bactericida del 88,2% en combinación para las dos variedades de aceite esencial a una concentración al 100%. Las concentraciones de 100% y 80% presentaron un comportamiento bactericida, mientras que las concentraciones del

60%, 40% y 20% mostraron un comportamiento bacteriostático. A la concentración más baja evaluada (20%), los aceites esenciales presentaron una actividad bacteriostática combinada de 76,5%. No se encontraron diferencias significativas entre las actividades bacteriostáticas o bactericidas de las variedades Arrayana y Oneco ($p>0,05$) (tabla 3).

DISCUSIÓN

Fusobacterium nucleatum es una bacteria que se ha asociado fuertemente con el establecimiento y mantenimiento de la biopelícula oral por la capacidad de promover la coagregación bacteriana, que finalmente termina generando múltiples enfermedades en cavidad oral como la periodontitis (Flanagan *et al.*, 2014; Dahya *et al.*, 2015; Budd *et al.*, 2015). Su tratamiento ha estado marcado por medicamentos de origen sintético como la clorhexidina, el cual ha logrado efectos bactericidas sobre periodontopatógenos y biopelícula oral, reflejados en disminución de la inflamación, enrojecimiento y bolsa periodontal. Sin embargo, diversos estudios argumentan que su uso

Tabla 3. Actividad bactericida y bacteriostática de los aceites esenciales de mandarina, variedades Arrayana y Oneco a diferentes concentraciones sobre *F. nucleatum*.

Actividad	Cat.	Arrayana		Oneco		Total		p^*
		n	%	n	%	n	%	
Bactericida (100%)	Si	8,00	100	7,00	77,8	15,00	88,2	0,47
	No	0,00	0,0	2,00	22,2	2,00	11,8	
Bacteriostática (100%)	Si	0,00	0,0	1,00	11,1	1,00	5,9	1,00
	No	8,00	100	8,00	88,9	16,00	94,1	
Bactericida (80%)	Si	4,00	50,0	5,00	55,6	9,00	52,9	1,00
	No	4,00	50,0	4,00	44,4	8,00	47,1	
Bacteriostática (80%)	Si	4,00	50,0	3,00	33,3	7,00	41,2	0,64
	No	4,00	50,0	6,00	66,7	10,00	58,8	
Bactericida (60%)	Si	4,00	50,0	2,00	22,2	6,00	35,3	0,33
	No	4,00	50,0	7,00	77,8	11,00	64,7	
Bacteriostática (60%)	Si	4,00	50,0	5,00	55,6	9,00	52,9	1,00
	No	4,00	50,0	4,00	44,4	8,00	47,1	
Bactericida (40%)	Si	3,00	37,5	4,00	44,4	7,00	41,2	1,00
	No	5,00	62,5	5,00	55,6	10,00	58,8	
Bacteriostática (40%)	Si	4,00	50,0	5,00	55,6	9,00	52,9	1,00
	No	4,00	50,0	4,00	44,4	8,00	47,1	
Bactericida (20%)	Si	2,00	25,0	0,00	0,00	2,00	11,8	0,21
	No	6,00	75,0	9,00	100,0	15,00	88,2	
Bacteriostática (20%)	Si	5,00	62,5	8,00	88,9	13,00	76,5	0,29
	No	3,00	37,5	1,00	11,1	4,00	23,5	

*Estadístico exacto de Fisher.

continuo genera efectos adversos en la cavidad oral, tales como alteración del gusto, pigmentación de la estructura dental, sensación de quemazón o ardor en el epitelio gingival (Arjunkumar & Balagopal, 2013).

Tratamientos naturales alternos como los aceites esenciales de cítricos han demostrado tener una excelente actividad antimicrobiana y podrían ser una buena opción para el control de especies bacterianas presentes en biopelículas que causan enfermedades orales (Almeida *et al.*, 2014). Tal como se encontró en este estudio, en donde el aceite esencial de mandarina en sus variedades Arrayana y Oneco, mostraron un efecto antimicrobiano sobre *Fusobacterium nucleatum*, una especie bacteriana clave en la formación de biopelículas (Socransky & Haffajee, 2005). En este estudio sin embargo, la actividad antimicrobiana del aceite esencial fue dependiente de la concentración, lo cual podría ser explicado por la complejidad de la envoltura celular de doble membrana de los microorganismos gram negativos como *F. nucleatum* (Ben *et al.*, 2013) que podrían reaccionar ante sustancias antimicrobianas difundiendo la sustancia tóxica al medio externo y llevando los demás compuestos, al medio interno (Pendleton, 2011). Esto podría dar cuenta de la resistencia, el efecto bacteriostático y no bactericida en algunas especies bacterianas como *Prevotella intermedia* y *Porphyromonas gingivalis* ante la presencia de aceites esenciales derivados de cítricos (Hussain *et al.*, 2015).

Otros estudios han mostrado que aceites esenciales derivados de cítricos como el *Citrus limonum* y *Citrus aurantium* son eficientes a la hora de controlar la composición bacteriana de las biopelículas (Almeida *et al.*, 2014). Especies bacterianas como *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* involucrados en procesos carcinogénicos y periodonto patológicos han mostrado ser sensibles ante los efectos de los aceites esenciales de *Citrus sinensis* (Hussain *et al.*, 2015), (Shetty *et al.*, 2016).

De acuerdo a los resultados, parece no haber diferencias significativas en el efecto bactericida y bacteriostático entre las dos variedades de mandarina evaluadas (tablas 2 y 3). Esto es importante pues para la selección de aceites esenciales en el tratamiento de enfermedades orales de origen infeccioso es importante tener en cuenta la composición química y sus propiedades biológicas (Stashenko *et al.*, 2014) debi-

do a que la actividad puede variar de un aceite a otro dependiendo de su quimiotipo (Pino *et al.*, 2014). Aunque no se realizó un estudio para determinar la caracterización de cada aceite esencial, se podría concluir que a pesar de las diferencias morfológicas entre las dos variedades, no hay diferencias entre la composición de sus aceites esenciales y por lo tanto no se podría hablar de quimiotipos diferentes.

El potencial antimicrobiano de los aceites esenciales posiblemente se debe a la presencia de taninos, saponinas, compuestos fenólicos, aceites esenciales y flavonoides, compuestos biológicamente activos con actividad antimicrobiana. Aproximadamente el 80.3% de los compuestos presentes en cáscaras frescas de *Citrus reticulata* Blanco son monoterpenos (Sawamura *et al.*, 2004). El terpineno, mircenolol y pineno presente en las cáscaras de una gran variedad de mandarinas han mostrado tener una alta actividad antimicrobiana (Fuselli *et al.*, 2008), se ha reportado que el tanino que se encuentra en extractos de cáscaras de *Citrus sinensis* inhibe la síntesis proteica celular debido a la formación de complejos irreversibles con proteínas ricas en prolina (Shimada, 2006); esto permite comprender las propiedades biológicas de los aceites esenciales y los responsables de la actividad antimicrobiana contra microorganismos.

Los resultados de este estudio muestran la eficacia de los aceites esenciales de cáscara de mandarina sobre una especie bacteriana clave en la formación de biopelículas como es *Fusobacterium nucleatum*, la combinación de estos aceites esenciales con otros derivados de cítricos podría ser una alternativa terapéutica para el control de comunidades bacterianas presente en las biopelículas principalmente las asociadas a enfermedad periodontal, sin embargo es importante tener en cuenta su complejidad de los microbiomas presentes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, S., Rabelo, J., Bispo, F., Aparecida, C., & Olavo, A. (2014). The antimicrobial effects of *Citrus limonum* and *Citrus aurantium* essential oils on multi-species biofilms. *Brazilian Oral Research*, 28(1), 1-6.
- Arjunkumar, R., & Balagopal, S. (2013). Chlorhexidine: the gold standard antiplaque agent. *Journal of pharmaceutical*, 5; 270-274).

- Ben, A., Hamdi, N., Ben, N., & Abdelkafi, S. (2013). Characterization of essential oil from *Citrus aurantium* L. Flowers: Antimicrobial and Antioxidant activities. *Journal of Oleo Science*, 62(10), 763-772.
- Budd, E., Johnson, D. S., Thomas, E., & Saradangani, M. (2015). Subacute osteomyelitis of the femur due to *Fusobacterium nucleatum* in a 7 year old boy. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 34(3), 324-326.
- Cha, J. D., Jeong, M. R., Jeong, S. I., Moon, S. E., Kil, B. S., Yun, S. I., ... & Song, Y. H. (2012). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cryptomeria japonica*. *Phytotherapy research*, 21(3), 295-299.
- Crandall, P. C., Ricke, S. C., O'Bryan, C. A., & Parrish, N. M. (2012). *In vitro* effects of Citrus oils against *Mycobacterium tuberculosis* and non tuberculosis *Mycobacterium* of clinical importance. *Journal of Health*, 47(7), 736-741.
- Dahya, V., Patel, J., Wheeler, M., & Ketsela, G. (2015). *Fusobacterium nucleatum* endocarditis presenting as liver and brain abscesses in an immunocompetent patient. *The American Journal of the Medical Sciences*, 349(3), 284-285.
- Drake, D., & Villhauer, A. L. (2011). An *in vitro* comparative study determining bactericidal activity of stabilized chlorine dioxide and other oral rinses. *Journal of Clinic Dental*, 22(1), 1-5.
- Espina, L., Somolinos, M., Loran, S., Conchello, P., Garcia, D., & Pagan, R. (2011). Chemical compositions of commercial Citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control*, 22(6), 896-902.
- Ferro, M., & Gomez, M. (2007). Fundamentos de la odontología periodoncia. Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.
- Flanagan, L., Schmid, J., Ebert, M., Soucek, P., Kunicka, T., Liska, V., ... & Jenab, M. (2014). *Fusobacterium nucleatum* associates with stages of colorectal neoplasia development, colorectal cancer and disease outcome. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 33(8), 1381-1390.
- Fuselli, S., García, S., Eguaras, M., & Fritz, R. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of Citrus essences on honeybee bacterial pathogen *Paenbacillus* larvae, the causal agent of American Foulbrood. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 2067-2072.
- Hsouna, B., Hamdi, N., Halima, B., & Abdelkafi, S. (2013). Characterization of essential oil from *Citrus aurantium* L. flowers: antimicrobial and antioxidant activities. *Journal of Oleo Science*, 62(10), 763-772.
- Hussain, K. A., Tarakji, B., Kandy, B. P. P., John, J., Mathews, J., Ramphul, V., & Divakar, D. D. (2015). Antimicrobial effects of Citrus sinensis peel extracts against periodontopathic bacteria: an *in vitro* study. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 66(2).
- Kuboniwa, M., & Lamont, R. (2010). Subgingival biofilm formation. *Periodontology 2000*, 52(1), 38-52.
- Martinez, J., Sulbarán, G., Ojeda, G., Ferrer, A., & Nava, R. (2003). Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 20(4).
- Mosquera, T., & Veloz, T. (2011). Eficacia *in vitro* de un colutorio elaborado con aceite esencia de la hoja de Ishpingo ocotea quixos (Lam.) Kostern ex. OC Schimdt y clavo de olor *Syzygium aromaticum* (L.) Merr & LM Perry. *La Granja. Revista de Ciencias de la Vida*, 13(1), 31-41.
- Navarrete, C., Gil, J., Durango, D., & Garcia, C. (2010). Extracción y caracterización del aceite esencial de mandarina obtenido de residuos agroindustriales. *Dyna*, 77(162), 85-92.
- Neira, A., & Ramirez, M. (2005). Actividad antibacteriana de extractos dos especies de guayaba contra *Streptococcus mutans* y *Escherichia coli*. *Actualidades biológicas*, 27(1), 27-30.
- Pendleton, S. J. (2011). The antimicrobial activity of cold pressed terpenless Valencia orange oil at cold temperatures. Dissertation/Thesis, University of Arkansas.
- Pino, O., Sánchez, Y., Rojas, M. M., Abreu, Y., Correa, T. M., Martínez, D., & Montes de Oca, R. (2014). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ruta chalepensis* L. *Revista de Protección Vegetal*, 29(3), 220-225.
- Pittman, C. I., Pendleton, S., Bisha, B., O'Bryan, C. A., Belk, K. E., Goodridge, L., ... & Ricke, S. C. (2011). Activity of citrus essential oils against *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* spp. and effects on beef subprimal cuts under

- Shetty, S. B., Mahin-Syed-Ismail, P., Shaji Varghese, B. T. G., Kandathil-Thajuraj, P., Baby, D., Haleem, S., ... & Devang-Divakar, D. (2016). Antimicrobial effects of Citrus sinensis peel extracts against dental caries bacteria: An *in vitro* study. *Journal of clinical and experimental dentistry*, 8(1), e71.
- Shimada, T. (2006). Salivary proteins as a defense against dietary tannins. *Journal of Chemical Ecology*, 32, 1149-1163.
- Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000*, 38, 135-187.
- Stashenko, E., Martinez, J., Duran, D., Cordoba, Y., & Caballero, D. (2014). Estudio comparativo de la composición química y la actividad antioxidante de los aceites esenciales de algunas plantas del género *Lippia* (Verbenaceae) cultivadas en Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas*, 38, 89-105.
- Tsai, T. H., Tsai, T. H., Chien, Y. C., Lee, C. W., & Tsai, P. J. (2008). *In vitro* antimicrobial activities against cariogenic streptococci and their antioxidant capacities: A comparative study of green tea versus different herbs. *Food Chemistry*, 110(4), 859-864.
- Van Winkelhoff, A. J., Loos, B. G., Van der Reijden, W. A., & Van der Velden, U. (2002). *Porphyromonas gingivalis*, bacteroides forsythus and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *Journal of Clinical Periodontology*, 29(11), 1023-1028.
- Vitery, G., Escribano, S., Gamboa, F., Chavarria, N., & Gomez, R. (2010). Actividad inhibitoria de la Stevia rebaudiana sobre el Lactobacillus acidophilus y el Streptococcus mutans. *Revista Nacional de Odontología de la Universidad Cooperativa de Colombia*, 6(10), 57-64.