

doi: 10.30827/ars.v65i1.29152

Artículos originales


## Evaluación preclínica de la actividad antiinflamatoria de un gel con aceite de árbol de té

Preclinical evaluation of the anti-inflammatory activity of a gel with tea tree oil

Diana Daniela Díaz-Basurto<sup>1</sup>  0000-0002-5953-6980

Norma Angelica Noguez-Méndez<sup>2</sup>  0000-0003-0809-696X

Susana Aurora Macín-Cabrera<sup>1</sup>  0000-0003-3376-224X

Alejandro Rubio-Martínez<sup>3</sup>  0000-0002-3453-6685

Luis Alfonso Moreno-Rocha<sup>4</sup>  0000-0002-1021-4884

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Departamento de Atención a la Salud, Ciudad de México, México.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Departamento de Sistemas Biológicos, Ciudad de México, México.

<sup>3</sup>Tecnológico Nacional de México, Campus Querétaro, Departamento de Ciencia Básica, Queretaro, México.

<sup>4</sup>Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Departamento de Sistemas Biológicos, Ciudad de México, México.

---

### Correspondencia

Susana Aurora Macín-Cabrera  
smacin@correo.xoc.uam.mx

---

**Recibido:** 06.10.2023

**Aceptado:** 01.12.2023

**Publicado:** 20.12.2023

---

### Agradecimientos

A los médicos de familia por su colaboración.

---

### Financiación

Sin financiación.

---

### Conflicto de intereses

Ninguno

---

### Otras declaraciones

Todos los autores han aprobado el manuscrito final y este no se ha enviado ni totalmente ni en partes a otras revistas a la vez que a Ars Pharmaceutica

## Resumen

**Objetivo:** Evaluar la actividad antiinflamatoria de una formulación semisólida que contiene Aceite de Árbol de Té (AAT), a dos concentraciones (2 % y 2,5 %), para futuro tratamiento de enfermedad periodontal.

**Método:** Prueba preclínica de edema auricular por aceite de croton, con una muestra de 30 ratones, para ser comparados con Indometacina y Diclofenaco.

**Resultados:** La concentración al 2 % mostró un 51,21 % de inhibición de la actividad inflamatoria, mientras que para la concentración del 2,5 %, fue de 54,74 %. Las pruebas estadísticas para conocer la eficacia de los tratamientos demostraron que no existen diferencias significativas entre las combinaciones de tratamientos, indicando que todos tratamientos son similares ( $p>0,05$ ).

**Conclusiones:** Los resultados de este estudio demuestran que la forma semi solida de AAT, en los estudios preclínicos en la fase de ensayos *in vivo* con animales no humanos demostró poseer una actividad antiinflamatoria.

---

**Palabras clave:** Agente antiinflamatorio; enfermedad periodontal; fitoterapia; aceite de árbol de té; evaluación preclínica de fármacos.

## Abstract

**Objective:** To evaluate the anti-inflammatory activity of a semi-solid Tea Tree Oil (TTO) form at 2 % and 2,5% concentrations for treating periodontal disease.

**Method:** A preclinical test in a sample of 30 mice with ear edema induced by croton oil was divided into two groups to compare treatment with Indomethacin and Diclofenac.

**Results:** TTO at 2,5 % concentration showed a higher inhibition activity of inflammation (54,74 %) than TTO at 2 % (51,21 %). Statistical analysis showed no significant differences between treatment combinations ( $p>0,05$ ).

**Conclusions:** The tea tree oil in semi-solid form, applied in 2 - 2,5 % concentration in this preclinical study, showed consistent anti-inflammatory activity.

---

**Keywords:** Anti-inflammatory agents; periodontal disease; phytotherapy; tea tree oil; preclinical drug evaluation.

## Puntos clave

El aceite del árbol de té tiene distintas propiedades entre las que destacan la actividad antiinflamatoria, lo que lo convierte en un agente con amplio potencial para su uso como alternativa a los fármacos sintéticos en el tratamiento de las enfermedades periodontales.

Se evaluó la actividad antiinflamatoria del aceite del árbol de té contenido en una pre-formulación en gel y se comparó con indometacina y diclofenaco obteniendo resultados similares en la actividad.

Se demostró en el modelo de edema auricular inducido por aceite de croton la actividad antiinflamatoria por vía tópica del aceite del árbol de té contenido en un gel, esto permite el empleo de este aceite en el desarrollo de formas farmacéuticas semisólidas que puedan ser destinadas para esta vía de administración.

## Introducción

Las Enfermedades Periodontales (EP) se pueden iniciar por la disbiosis que ocasionan las bacterias en la biopelícula de la placa dental, provocando una respuesta inmune por lo cual el proceso inflamatorio es un mecanismo de defensa del organismo que se produce por diferentes estímulos, la cronicidad de la inflamación puede conducir a la destrucción de los tejidos periodontales, debido al incremento de mediadores inflamatorios y alteraciones en la resolución de la inflamación<sup>(1,2,3)</sup>. Actualmente existen dos tipos de antibioterapia con fármacos sintéticos ya sea de forma sistémica o de forma local, los cuales presentan desventajas como son: uso limitado de 7 a 14 días, reacciones adversas (vómito, dolor de cabeza, náuseas), tinción de dientes, disgeusia, formación de cálculos supragingivales, entre otros<sup>(4)</sup>. Por lo cual se está en la búsqueda constante de principios activos que sean eficaces y seguros para su uso por periodos prolongados, siendo una alternativa el uso de fitoterapia<sup>(5)</sup>.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), recomienda el uso de la fitoterapia<sup>(6)</sup> la cual se define como: “la ciencia que estudia el uso de los productos de origen vegetal con finalidad terapéutica<sup>(7,8)</sup>”, como una alternativa al uso de fármacos sintéticos. Se estima que alrededor del 80 % de la población mundial recurre a este tipo de terapia, mientras que en México se considera que el 60 % de la población la utiliza<sup>(6,9)</sup>. En México existe la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, publicada en el año 2001, que incluye monografías de plantas que se usan en los medicamentos herbolarios, pero únicamente incluyen a las de mayor uso en el país, por lo cual hacen falta estudios para corroborar la eficacia del AAT en México. Los estudios preclínicos en aceites se realizan para demostrar eficacia y seguridad, así como para conocer sus posibles efectos adversos antes de ser utilizados en humanos, estos estudios se realizan en animales o modelos fisiológicos, en los cuales se analizan las propiedades fisicoquímicas y fisiológicas del principio activo *in vitro* o *in vivo*, basados en los resultados obtenidos en esta primera etapa, se puede proponer o desechar estudios más extensos<sup>(9)</sup>.

Actualmente se conocen unos 3,000 aceites esenciales<sup>(10)</sup>, los cuales se clasifican por su uso seguro y poseen aprobación por diferentes organismos a nivel mundial, dentro de éstos se encuentra el Aceite de Árbol de Té (AAT), del cual en las últimas tres décadas se han descrito sus diferentes propiedades terapéuticas como son: antimicrobiana, antiviral, antiinflamatoria, analgésica y antimicótica. Su aplicación en estomatología está siendo validado por la investigación científica, con datos *in vitro* e *in vivo*, los cuales están respaldando las propiedades terapéuticas.

El Árbol del Té (*Melaleuca alternifolia*), es una planta de origen australiano, con crecimiento rápido (6 meses), cuyo aceite se obtiene de las hojas, se ha demostrado que posee más de 100 componentes, entre los que destacan dos: el *terpinen-4* y el *1,8-cineol*, los cuales son los implicados en poseer las actividades terapéuticas. Data su utilización en las tribus aborígenes australianas de la Costa Norte de Nueva Gales del Sur, definido como “el sanador más versátil de la naturaleza”, utilizaban las hojas de la planta para aliviar cortaduras, quemaduras, picaduras de insectos e infecciones de la piel, su reconocimiento oficial es a partir del año 1949, por el departamento de Sanidad Australiano<sup>(6,7,11,12)</sup>.

Se han realizado algunos estudios para verificar la acción antiinflamatoria del AAT como: Hart et al., en el año 2000, evalúa las propiedades antiinflamatorias *in vitro* del AAT, mediante la reducción de in-

terleucinas (IL) TNF- $\alpha$  IL-1B, IL-8 y IL-10 y prostaglandina E2 (PGE2), por monocitos humanos activados por lipopolisacáridos (LPS), reportando que existió una supresión de LPS de TNF- $\alpha$ , IL-1B e IL-10 en un 50 % y de PGE2 en un 30 % después de 40 horas, indicando que el componente terpinen-4-ol fue el responsable de esta acción<sup>(13)</sup>.

Nogueira et al., en 2014, utilizó macrófagos estimulados por lipopolisacáridos bacterianos, reportando una reducción en la producción de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10, mientras que en el TNF- $\alpha$  no hubo cambios significativos, por lo cual concluye que el terpinen-4-ol y alfa-terpinol, componentes principales del AAT, pueden suprimir la producción de mediadores inflamatorios en macrófagos humanos estimulados con lipopolisacáridos, además informa que esta inhibición estuvo mediada por la interferencia con las rutas NF-kB, p38 o ERK MAPK<sup>(14)</sup>.

No obstante, el AAT puede no solo actuar como un mediador inflamatorio a través de su actividad antioxidante, también puede proteger eficientemente el organismo al reducir la proliferación de células inflamatorias sin afectar su capacidad de secretar citosinas antiinflamatorias<sup>(15)</sup>. Estas respuestas inmunoinflamatorias se reducen por una cascada de diferentes reacciones producidas por el organismo. Aunque poco explicado, estas propiedades podrían considerablemente cambiar la reacción del huésped contra bacterias periodontopatógenas<sup>(16)</sup>.

Este estudio preclínico tiene como finalidad la aplicación de una forma semi sólida con principio activo de AAT, para ser utilizada en la enfermedad periodontal, debido a que es una patología que ocasiona una respuesta inflamatoria, por lo cual se necesitan pruebas preclínicas para determinar si la preformulación semisólida conteniendo AAT, presenta actividad antiinflamatoria, por esta razón se eligió el modelo in vivo de "edema auricular inducido por aceite de crotón" que ocasiona un edema de forma localizada por vía tópica, este método es el más utilizado para evaluar la actividad antiinflamatoria en extractos, aceites esenciales, de fármacos esteroideos y no esteroideos<sup>(17,18)</sup>. Esta prueba desencadena todos los eventos propios del proceso inflamatorio: vasodilatación, eritema, extravasación y edema, a nivel histológico se produce agregación plaquetaria y adherencia a compuestos polimorfonucleares (neutrófilos y eosinófilos)<sup>(17)</sup>. Esta respuesta inflamatoria se cuantifica midiendo la diferencia de peso de ambas orejas (discos de 6 mm), en un intervalo de tiempo (4 a 8 h), en este lapso de tiempo se demuestra que existe infiltración de granulocitos y se puede aplicar el tratamiento para reducir la inflamación<sup>(18,19)</sup>.

## Métodos

Los estudios de preformulación para el diseño del gel con AAT y el estudio preclínico antiinflamatorio se llevó a cabo en los laboratorios de: Farmacia Molecular y Liberación Controlada y el Laboratorio de Síntesis de Polímeros, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Se diseñó un estudio experimental, transversal, comparativo y prospectivo, el cual se llevó a cabo de noviembre del 2019 a abril del 2020.

### Preparación de Soluciones

Se realizaron ocho formulaciones preliminares de AAT (Farmacia París. Lote 1901730, certificado de calidad no. GPC058) en gel a partir de la información farmacotecnia y farmacopeica de las cuales se eligió una para realizar la formulación con las dos concentraciones de AAT (tabla 1). Las pruebas de control que permitieron seleccionar el gel óptimo fueron: pruebas organolépticas, pH (6,9), viscosidad (25,754 cP) y la cuantificación del AAT (terpinen-4-ol) por método espectrofotométrico a una longitud de onda de 240 nm con un intervalo de recobro de 97 – 103 %. Una vez seleccionada la formulación a las concentraciones adecuadas se elaboraron las formulaciones con ambas concentraciones de AAT (2 y 2,5 %) y se sometieron a prueba de estabilidad en refrigeración por tres meses y al término de esta se observó que conserva sus características organolépticas, pH, viscosidad y el contenido de AAT (98,045 %).

**Tabla 1.** Componentes de la formulación semisólida que contiene AAT

Componente	Concentración %
AAT	2 y 2,5
Mentol	0,40
Carboximetilcelulosa	3 - 6
Sacarina	0,12 - 3
Propilenglicol 10	25
Sorbitol	20 - 60
Grenetina	0,2 - 1
Agua destilada	c.b.p. 100
c.b.p.= cantidad bastante para	

Se realizó una dilución de aceite de crotón (Sigma-Aldrich) al 5 % en acetona RA (JT Baker), así como soluciones de principios activos indometacina y diclofenaco a concentraciones de 0,5 g/mL en acetona RA.

### Evaluación del efecto antiinflamatorio

Para la evaluación de la actividad antiinflamatoria se utilizó una solución de aceite de crotón al 5 % (v/v) en acetona debido a su ausencia de efecto antiinflamatorio en el modelo. Así mismo, de acuerdo con lo reportado<sup>(20)</sup> las concentraciones de AAT en la preformulación no deben presentar riesgo de toxicidad por contacto con la piel.

Se emplearon 30 ratones macho de la cepa CD-1 con un peso promedio de 25 g proporcionados por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL-Bioterio) de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, los cuales se mantuvieron en el laboratorio durante 24 horas para adaptarse a las condiciones con cama de viruta limpia y alimento y agua *ad-libitum*.

Se formaron 5 grupos de 6 ratones cada uno a los cuales se les administró 20 µL de la solución de aceite de crotón únicamente en la oreja derecha (10 µL en la parte interior y 10 µL en la parte exterior) para ocasionar el edema. Después de 30 minutos se aplicaron 20 µL de cada uno de los tratamientos (tabla 2) en la oreja derecha y se dejó actuar durante 4 horas, al cabo de las cuales se sacrificaron los ratones mediante dislocación cervical y se extrajeron discos de 6 mm de diámetro de cada oreja empleando una pinza sacabocado y se pesaron en una balanza analítica.

**Tabla 2.** Grupos de tratamiento

Grupo	Tratamiento
Grupo 1	AAT 2 %
Grupo 2	AAT 2,5 %
Grupo 3	Indometacina en acetona 0,5 mg/mL (control positivo)
Grupo 4	Diclofenaco en acetona 0,5 mg/mL (control positivo)
Grupo 5	Acetona (control negativo)

La actividad antiinflamatoria se calculó como porcentaje de reducción del edema en los ratones tratados respecto al grupo control negativo. La magnitud del edema se cuantificó por la diferencia de peso. El porcentaje de inhibición se calculó según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Inhibición del edema} = [(\Delta P_c - \Delta P_t) / \Delta P_c] \times 100$$

Donde:

$\Delta P_c$ = Media aritmética de la variación de peso en el grupo control negativo

$\Delta P_t$ = Media aritmética de la variación de peso en el grupo tratado

## Análisis de datos

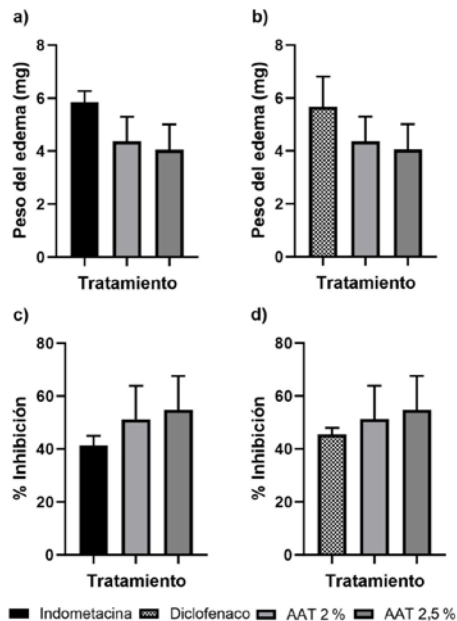
Los datos obtenidos de la prueba de edema auricular inducido por aceite de crotón se analizaron empleando el software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc.) realizando un análisis de varianza (ANDEVA) para comparar los grupos de AAT con cada control positivo.

## Consideraciones éticas

Este protocolo se realizó bajo los principios de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 de especificaciones técnicas para la producción cuidado y uso de los animales de laboratorio, para evitar el sufrimiento de los animales, así como la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, de protección ambiental, salud ambiental, residuos peligrosos biológico-infecciosos, clasificación y especificaciones de manejo.

## Resultados

El AAT en ambas concentraciones (2 % y 2,5 %) fue capaz de reducir la inflamación inducida mediante la prueba de edema auricular inducido por aceite de crotón, obteniendo valores de % de inhibición (promedio  $\pm$  DE) de 51,21  $\pm$  12,6 % y 54,74  $\pm$  12,8 %, respectivamente; mientras que los controles positivos de indometacina y diclofenaco obtuvieron valores de 41,3  $\pm$  3,65 % y 45,51  $\pm$  2,43 %, respectivamente, ver Figura 1.



**Figura 1.** Resultados de la evaluación de efecto antiinflamatorio (promedio  $\pm$  DE). a) Comparación del peso del edema de los dos grupos de AAT con el control positivo de indometacina. b) Comparación del peso del edema de los dos grupos de AAT con el control positivo de diclofenaco. c) Comparación del porcentaje de inhibición de los dos grupos de AAT con el control positivo de indometacina. d) Comparación del porcentaje de inhibición de los dos grupos de AAT con el control positivo de diclofenaco.

Se realizaron pruebas estadísticas para conocer la eficacia de los tratamientos. Se realizaron los análisis de varianza (ANDEVA) comparando los resultados del peso del edema auricular y el porcentaje de inhibición de la inflamación de los dos grupos de AAT con cada control positivo y en todos los casos se obtuvo un valor de  $p > 0,05$ , lo cual indica que estadísticamente no hay diferencia entre los tratamientos

con AAT y los controles de indometacina y diclofenaco en la actividad antiinflamatoria determinada mediante el modelo de enema auricular inducido con aceite de crotón.

## Discusión

En los últimos años se han incrementado las investigaciones en fitoterapia, no obstante, aún no se cuentan con suficientes estudios que avalen la eficacia terapéutica de las plantas empleadas para el tratamiento de padecimientos de origen oral pero actualmente se están haciendo esfuerzos para ofrecer otras alternativas que muestren alguna ventaja sobre tratamientos con fármacos sintéticos, que en algunos casos no se recomienda su uso prolongado<sup>(5,8,16)</sup>. Con base en lo anterior se seleccionó al AAT que ha mostrado eficacia antiinflamatoria para proponer el desarrollo de un dentífrico en gel que permita su aplicación<sup>(11,13,21,22,23,24)</sup>.

Se han realizado diferentes estudios para evaluar la respuesta inflamatoria, sin embargo, no existe similitud de los estudios ya que cada uno es diferente en cuanto a metodología y técnicas utilizadas, no obstante, concluyen que el AAT, presenta una acción antiinflamatoria. Nogueira et al., en 2014 indican que la acción antiinflamatoria es a través de la supresión de las citocinas: IL-1 $\beta$ , IL-6 y la IL-10<sup>(14)</sup>. Por otra parte, Ninomiya et al., en 2013 indicaron que la acción del AAT, disminuye la producción de citoquinas, que conduce a una supresión de las reacciones inflamatorias<sup>(25)</sup>.

Maruyama et al., en el 2005, realizaron un estudio induciendo inflamación en la cavidad peritoneal de ratones, por inyección de *curdlán* por vía cutánea, el AAT se utilizó para suprimir la inflamación celular (neutrófilos) ocasionada por el *curdlán* obteniendo una disminución de la actividad de MPO (mieloperoxidasa) en un  $68 \pm 32$  %<sup>(24)</sup>, este estudio comparte ciertas similitudes con el realizado en esta investigación, aunque se presenta una diferencia en cuanto al porcentaje de inhibición inflamatoria obtenido que fue de 51 % para la concentración del 2 % y del 54 % para la concentración del 2,5 %, en ambos estudios se podrían considerar con una actividad antiinflamatoria significativa.

Saxer et al., en 2003, demostraron mediante un estudio clínico que el AAT, reduce la inflamación mediante el empleo de un enjuague, atribuyéndolo a la presencia de 1,8-cineol y terpinen-4-ol<sup>(22)</sup>. En tanto que Brand et al., en 2002, indicaron mediante citometría de flujo, la supresión de E-selectina inducida por TNF- $\alpha$  en células humanas, reportando que el AAT, puede regular el edema<sup>(26)</sup> y en otro estudio realizado por el mismo autor reporta que mediante un modelo animal con edema auricular en ratones inducido por histamina el AAT es eficaz para controlar el edema<sup>(27)</sup>.

## Conclusión

El uso de la fitoterapia puede ser una ventaja en la práctica estomatológica, sin embargo, se deben realizar mayores estudios para comprobar su eficacia y ser validada. Los resultados de este estudio demuestran que el AAT, en los estudios preclínicos en la fase de ensayos *in vivo* con animales no humanos demostró poseer una actividad antiinflamatoria. Con base en los resultados obtenidos en esta investigación pudiera considerarse como una alternativa terapéutica en el tratamiento de la enfermedad periodontal y podría emplearse por periodos largos de tiempo, aunque se requiere completar con estudios clínicos para evaluar su eficacia y posibles eventos adversos.

## Bibliografía

1. Macín Cabrera SA. Tratamiento periodontal no quirúrgico en pacientes con gingivitis y periodontitis moderada: respuesta microbiológica y bioquímica [tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2010.
2. Casarin M, Pazinato J, Santos RCV, Zanatta FB. *Melaleuca alternifolia* and its application against dental plaque and periodontal diseases: A systematic review. *Phytother Res*. 2018; 32(2):230-242. DOI: 10.1002/ptr.5974

3. Kaur G, Grover V, Bhaskar N, Kaur RK, Jain A. Periodontal Infectogenomics. *Inflamm Regen*. 2018; 38(1):8. DOI: 10.1186/s41232-018-0065-x
4. Falcao Costa C, Moura E Sá A, Faria Almeida R, Bascones A. Antibioterapia en Periodoncia: Situación actual I- Antibióticos Sistémicos. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*. 2001; 13:39-47.
5. Regalado AI, Sánchez LM, Mancebo B. Actividad anti-inflamatoria de los extractos metanólicos de hojas y de tallos de *Tabebuia hypoleuca* (C. Wright) Urb. *J Pharm Pharmacogn Res*. 2015; 3(5):109-117.
6. Vivot EP, Sánchez C, Cacik F, Sequin C. Actividad antibacteriana en plantas medicinales de la flora de Entre Ríos (Argentina). *Ciencia, Docencia y Tecnología*. 2012; XXIII(45):165-185.
7. Hernández Rodríguez A. Fitoterapia. Bases científicas y legales para su aplicación. *Bol Latinoam Caribe Plantas Med Aromat*. 2005; 4(4):71-74.
8. Salazar Aranda R, Torre Rodríguez YC, Alanís Garza BA, Pérez López LA, Waksman de Torres N. Evaluación de la actividad biológica de productos herbolarios comerciales. *Medicina Universitaria*. 2009; 11(44):156-164.
9. Marovac J. Investigación y desarrollo de nuevos medicamentos: de la molécula al fármaco. *Rev Med Chil*. 2001; 129:99-106.
10. Dávila B. L, Yibrin C, Lugo G, Rojas T, Romero I, Giménez X, Infante J, Gutiérrez R, Arteaga S, Palacios M, Sosa L. Salud periodontal y salud gingival. *Revista Odontológica de Los Andes*. 2010; 014(2):26-48.
11. Hammer KA, Dry L, Johnson M, Michalak EM, Carson CF, Riley TV. Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil in vitro. *Oral Microbiol Immunol*. 2003; 18(6):389-392. DOI: 10.1046/j.0902-0055.2003.00105.x
12. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clin Microbiol Rev*. 2006; 19(1):50-62. DOI: 10.1128/cmr.19.1.50-62.2006
13. Hart PH, Brand C, Carson CF, Riley TV, Prager RH, Finlay-Jones JJ. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflamm Res*. 2000; 49(11):619-626. DOI: 10.1007/s000110050639
14. Nogueira MNM, Aquino SG, Rossa Junior C, Spolidorio DMP. Terpinen-4-ol and alpha-terpineol (tea tree oil components) inhibit the production of IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10 on human macrophages. *Inflamm Res*. 2014; 63(9):769-778. DOI: 10.1007/s00011-014-0749-x
15. Cruz Martínez C, Diaz Gómez M, Oh MS. Use of traditional herbal medicine as an alternative in dental treatment in Mexican dentistry: a review. *Pharm Biol*. 2017; 55(1):1992-1998. DOI: 10.1080/13880209.2017.1347188
16. Kothiwale SV, Patwardhan V, Gandhi M, Sohoni R, Kumar A. A comparative study of antiplaque and antigingivitis effects of herbal mouthrinse containing tea tree oil, clove, and basil with commercially available essential oil mouthrinse. *J Indian Soc Periodontol*. 2014; 18(3):316-320. DOI: 10.4103/0972-124x.134568
17. Gómez Estrada HA, González Ruiz KN, Domingo Medina J. Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. *Bol Latinoam Caribe Plantas Med Aromat*. 2011; 10(3):182-217.
18. Tubaro A, Dri P, Melato M, Mulas G, Bianchi P, Del Negro P, Della Loggia R. In the croton oil ear test the effects of non steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) are dependent on the dose of the irritant. *Agents Actions*. 1986; 19(5):371-373. DOI: 10.1007/BF01971259
19. Nuñez Figueredo Y, Montero Alarcón C, Agüero Fernández S, Muñoz Cernuda A. Efecto antiinflamatorio preclínico del polvo seco de *Caléndula officinalis*. *Lat Am J Pharm*. 2007; 26(4):548-552.
20. Hammer KA, Carson CF, Riley TV, Nielsen JB. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Food Chem Toxicol*. 2006; 44: 616-625. DOI: 10.1016/j.fct.2005.09.001



- 21.** Graziano TS, Calil CM, Sartoratto A, Franco GC, Groppo FC, Cogo-Müller K. In vitro effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on growth and production of volatile sulphur compounds by oral bacteria. *J Appl Oral Sci.* 2016; 24(6):582-589. DOI: 10.1590/1678-775720160044
- 22.** Saxer UP, Stäuble A, Szabo SH, Menghini G. Effect of mouthwashing with tea tree oil on plaque and inflammation. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2003; 113(9):985-996.
- 23.** Takarada K. The effects of essential oils on periodontopathic bacteria and oral halitosis. *Oral Dis.* 2005; 11(s1):115-115. DOI: 10.1111/j.1601-0825.2005.01105\_52.x
- 24.** Maruyama N, Sekimoto Y, Ishibashi H, Inouye S, Oshima H, Yamaguchi H, Abe S. Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of geranium essential oil. *J Inflamm.* 2005; 2(1):1. DOI: 10.1186/1476-9255-2-1
- 25.** Ninomiya K, Hayama K, Ishijima SA, Maruyama N, Irie H, Kurihara J, Abe S. Suppression of Inflammatory Reactions by Terpinen-4-ol, a Main Constituent of Tea Tree Oil, in a Murine Model of Oral Candidiasis and Its Suppressive Activity to Cytokine Production of Macrophages *in Vitro*. *Biol Pharm Bull.* 2013; 36(5):838-844. DOI: 10.1248/bpb.b13-00033
- 26.** Brand C, Grimaldeston MA, Gamble JR, Drew J, Finlay-Jones JJ, Hart PH. Tea tree oil reduces the swelling associated with the efferent phase of a contact hypersensitivity response. *Inflamm Res.* 2002; 51(5):236-244. DOI: 10.1007/PL00000299
- 27.** Brand C, Townley SL, Finlay-Jones JJ, Hart PH. Tea tree oil reduces histamine-induced oedema in murine ears. *Inflamm Res.* 2002; 51(6):283-289. DOI: 10.1007/PL00000305