



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA
ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y
CITOTOXICIDAD DE *CAESALPINIA*
SPINOSA (MOLINA) KUNTZE “TARA”
FRENTE A *STREPTOCOCCUS MUTANS*
(ATCC 25175) Y *STREPTOCOCCUS*
SANGUINIS (ATCC 10556)

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN ESTOMATOLOGÍA

MAYRA DORIS CASTRO VERA

LIMA – PERÚ

2017

ASESOR

Dra. Sonia Sacaquispe Contreras

Departamento Académico de Medicina y Patología Oral

DEDICATORIA

A Dios, por haberme
dado salud para lograr
mis objetivos y
enseñarme que nunca
es tarde para retomar
mis sueños.

AGRADECIMIENTOS

- A mi amado esposo, por creer siempre en mis habilidades, por su alegría, aliento y apoyo incondicional.
- A mi amado hijito por ser mi motivo para ser una mejor persona cada día y darme una felicidad indescriptible con cada sonrisa.
- A mis amados padres por su apoyo incondicional, por los ejemplos de perseverancia y constancia, por el valor mostrado para salir adelante a pesar de las vicisitudes de la vida, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.
- A mí querida asesora, por su paciencia, comprensión, disposición y guía en la elaboración de la presente investigación.
- A mí querida Dra. Juana Del Valle por su apoyo, comprensión y disposición para realizar esta investigación.
- A mí querida amiga, Carmen Tinco por su apoyo incondicional para realizar y culminar esta tesis.
- A todas las personas que de manera directa e indirecta me apoyaron en la culminación de mis estudios.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

- Esta investigación fue desarrollada con recursos propios.

RESUMEN

Objetivo: Evaluar la actividad antibacteriana y citotoxicidad del extracto metanólico de *Caesalpinia spinosa (Molina) kuntze* “Tara” sobre *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556). **Materiales y Métodos:** Se realizaron 18 pruebas, independientes del extracto con una concentración de 0.5mg/ul y el control positivo (Clorhexidina al 0.12%). Se utilizó el método de difusión en agar pocillos con las soluciones experimentales en condiciones de anaerobiosis a las 24 y 48 horas a 37°C, para luego proceder a la lectura de los diámetros del halo de inhibición con un vernier. Asimismo, se halló la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto con el método de dilución y se determinó el efecto citotóxico (CC50) sobre la línea celular MDCK mediante la prueba de MTT. **Resultados:** El extracto en estudio tuvo efecto antibacteriano para las dos cepas a las 24 y 48 horas. La CMI del extracto se encontró en la concentración de 0.063 mg/ul para *S. mutans* y para *S. sanguinis* fue 0.02 mg/ul, además este extracto tuvo mayor efecto antibacteriano que la Clorhexidina al 0.12% frente *S. mutans* y *S. sanguinis* con una media de 25.6 mm y 21.6 mm respectivamente a las 24 horas y se mantuvo a las 48 horas. Asimismo la CC50 del extracto tuvo una concentración mayor a 17 mg/ul. **Conclusión:** Existe efecto antibacteriano del extracto metanólico de *Caesalpinia spinosa (Molina) kuntze* sobre *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*. El extracto metanólico de esta planta no fue citotóxico.

Palabras Claves: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, Toxicidad, Antibacteriano.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the antibacterial activity and cytotoxicity of *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "Tara" methanolic extract on *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) and *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556). **Materials and Methods:** Were performed 18 tests, independent of the extract with a concentration of 0.5mg / ul and the positive control (Chlorhexidine to 0.12%). The diffusion method was used in agar wells with the experimental solutions under anaerobic conditions at 24 and 48 hours at 37 ° C, and then proceeded to read the diameters of the inhibition halo with a vernier. The minimal inhibitory concentration (MIC) of the extract was also found with the dilution method and the cytotoxic effect (CC50) on the MDCK cell line was determined by the MTT test. **Results:** The extract under study had antibacterial effect for the two strains under study at 24 and 48 hours. The MIC of the extract was found in the concentration of 0.063 mg / ul for *S. mutans* and for *S. sanguinis* it was 0.02 mg / ul, in addition this extract had a greater antibacterial effect than Chlorhexidine to 0.12% against *S. mutans* and *S. sanguinis* with a mean of 25.6 mm and 21.6 mm respectively at 24 hours and was maintained at 48 hours. Likewise the extract CC50 had a concentration higher than 17 mg / ul. **Conclusion:** There is an antibacterial effect of the methanolic extract of *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. The methanolic extract of this plant was not cytotoxic.

Keywords: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, Toxicity, Anti-Bacterial Agents.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | | |
|--------------|--|-----------|
| I. | INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. | PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN | 2 |
| | II.1. Planteamiento del problema | 2 |
| | II.2. Justificación | 4 |
| III. | MARCO CONCEPTUAL | 5 |
| IV. | OBJETIVO | 24 |
| | IV.1. Objetivo General | 24 |
| | IV.2. Objetivos Específicos | 24 |
| V. | HIPOTESIS | 25 |
| VI. | METODOLOGÍA | 26 |
| | VI.1. Diseño del estudio | 26 |
| | VI.2. Población | 26 |
| | VI.3. Muestra | 26 |
| | VI.4. Criterios de selección | 27 |
| | VI.5. Variables | 28 |
| | VI.6. Técnicas y/o procedimientos | 30 |
| | VI.7. Plan de análisis | 37 |
| VII. | RESULTADOS | 38 |
| VIII. | DISCUSIÓN | 51 |
| IX. | CONCLUSIONES | 60 |
| X. | REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 61 |
| XI. | ANEXOS | 63 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Pág. |
|--|-------------|
| Tabla 1. Efecto antibacteriano del extracto metanólico de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175) y <i>Streptococcus sanguinis</i> (ATCC 10556) a las 24 horas. | 40 |
| Tabla 2. Efecto antibacteriano del extracto metanólico de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175) y <i>Streptococcus sanguinis</i> (ATCC 10556) a las 48 horas. | 42 |
| Tabla 3. Evaluación de la concentración mínima inhibitoria del extracto metanólico de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175) y <i>Streptococcus sanguinis</i> (ATCC 10556). | 44 |
| Tabla 4. Comparación <i>in vitro</i> del efecto antibacteriano de las sustancias en estudio sobre <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175) y <i>Streptococcus sanguinis</i> (ATCC 10556) a las 24 y 48 horas. | 46 |
| Tabla 5. Comparación <i>in vitro</i> del efecto antibacteriano del extracto metanólico de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze vs Clorhexidina sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175) y <i>Streptococcus sanguinis</i> (ATCC 10556) a las 24 y 48 horas. | 47 |

Tabla 6. Evaluación de la viabilidad celular de las células MDCK frente al extracto metanólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze (Citotoxicidad)

49

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | Pág |
|--|------------|
| Gráfico 1. Efecto antibacteriano del extracto metanólico de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) kuntze sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175) y <i>Streptococcus sanguinis</i> (ATCC 10556) a las 24 horas. | 41 |
| Gráfico 2. Efecto antibacteriano del extracto metanólico de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) kuntze sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175) y <i>Streptococcus sanguinis</i> (ATCC 10556) a las 48 horas. | 43 |
| Gráfico 3. Evaluación de la concentración mínima inhibitoria del extracto metanólico de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) kuntze sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175) y <i>Streptococcus sanguinis</i> (ATCC 10556) | 44 |
| Gráfico 4. Comparación in vitro del efecto antibacteriano del extracto metanólico de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) kuntze vs Clorhexidina sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175) y <i>Streptococcus sanguinis</i> (ATCC 10556) a las 24 y 48 horas. | 48 |
| Gráfico 5. Evaluación de la viabilidad celular de las células MDCK frente al extracto metanólico de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) kuntze (Citotoxicidad) | 50 |

ABREVIATURAS

| | | |
|-------------|---|--|
| ATCC | : | Colección americana de cultivos |
| BHI | : | Infusión cerebro corazón |
| CC50 | : | Concentración de una sustancia que disminuye la viabilidad de las células a un 50% |
| CHX | : | Clorhexidina |
| EMCS | : | Extracto metanólico de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) <i>Kuntze</i> |
| MTT | : | Reducción de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio bromuro |
| PBS | : | Buffer fosfato salino |
| SFB | : | Suero bovino fetal |
| DMSO | : | Dimetil Sulfóxido |
| MDCK | : | Línea celular de epitelio de riñón canino Madin-Darby |
| MIC | : | Concentración mínima inhibitoria |

I. INTRODUCCIÓN

Diversas investigaciones reportan que la mayor parte de las enfermedades orales están sumamente relacionadas con las más de 500 especies bacterianas que habitan en la cavidad oral.¹ Por lo cual la Organización Mundial de la Salud señala la importancia de incorporar a la salud pública los recursos y técnicas de la tratamientos tradicionales, puesto que logra aportar a la solución del problema de la salud del sector rural, aliviando el elevado costo y complicada adquisición de fármacos sintéticos o semi - sintéticos, que desplazaron los conocimientos ancestrales de varias plantas de se usaban como medicina tradicional,²⁻⁴ motivación por la que es indispensable recuperar estos conocimientos y recursos que pueden ser aprovechados por nuestra población gracias a la ventaja productiva y biodiversidad de ecosistemas que existen en el Perú.

Caesalpinia spinosa (Molina) kuntze "tara" es un árbol autóctono que se halla abundantemente distribuido en el Perú, se reporta su crecimiento de manera natural por los Andes y la costa peruana.⁵ Está compuesta por sustancias químicas (taninos, ácido gálico, etc.), a las cuales se les adjudica sus características medicinales, siendo utilizada como planta medicinal para aliviar la inflamación de la garganta, sinusitis, infecciones, dolor de diente, etc.⁶

La presente investigación tuvo como objetivo comprobar la existencia de propiedades antibacterianas y el efecto citotóxico del extracto metanólico de *Caesalpinia spinosa (Molina) kuntze* "tara" frente a dos cepas como *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) las cuales son de importancia odontológica.

II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

II.1. Planteamiento del problema

La cavidad oral forma un complejo ecosistema compuesto por especies bacterianas, las cuales se encuentran íntimamente relacionadas con las enfermedades orales más prevalentes.¹ Por esta razón es necesario controlar la sobrepoblación de estos microorganismos, por lo cual se han estudiado diferentes agentes antibacterianos, los cuales son compuestos clasificados según su origen natural, sintético o semi-sintético, que pueden tener una acción bacteriostática, bacteriolítica o bactericida sobre ellos.² En los últimos años se han incrementado las investigaciones de agentes antibacterianos basados en plantas medicinales de uso tradicional, elaborando extractos naturales para darles un respaldo científico y verificar que estos no sean nocivos para la salud de la población, ya que en países en vía de desarrollo su consumo es mayor porque tienen bajo costo, son efectivos y de fácil adquisición.³

Diversos estudios afirman que los extractos de estas plantas pueden mejorar síntomas de enfermedades bucales y controlar el crecimiento bacteriano,⁴ sin embargo para que sean usados es necesario conocer el efecto tóxico que pueden tener sobre las células, a pesar de esto pocos estudios presentan este importante hallazgo que permitirá elaborar un producto seguro para la población.

Estas plantas medicinales, como la *Caesalpinia Spinosa (Molina) kuntze*, presentan diversas ventajas como sus efectos antioxidantes, antiinflamatorias, coagulantes y antibacterianos, por lo que su uso es cada vez más conocido; siendo una alternativa natural para controlar y prevenir enfermedades orales.⁵

Por lo tanto podemos afirmar que esta investigación tiene un impacto teórico, debido a que en la actualidad existe poca información sobre la acción antibacteriana y citotóxica de la *Caesalpinia Spinosa (Molina) kuntze* en el campo odontológico, por lo cual al demostrar su acción y efecto citotóxico, se aporta al conocimiento científico. Además, tiene una importancia social, por la posible utilización como agente antimicrobiano al demostrar que no es toxica, el cual tendría menor costo gracias a la gran ventaja productiva de esta planta en el Perú y beneficiaría directamente al sector rural.

El propósito del presente estudio fue evaluar *in vitro* la acción antibacteriana y efecto citotóxico del extracto metanólico de *Caesalpinia spinosa (Molina) kuntze* frente a *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556).

II.2. Justificación

Considerando que existe poca información sobre la acción antibacteriana y ningún estudio sobre el efecto citotóxico de *Caesalpinia Spinosa (Molina) kuntze*, nos sentimos motivados a estudiar esta planta frente a dos microorganismos de importancia odontológica. Logrando así, aumentar los conocimientos en el campo odontológico preparando el camino para futuras investigaciones que deseen emplear esta metodología y los principios activos de esta planta para elaborar un producto antibacteriano, con la seguridad de no generar daño celular, lo cual permitirá su adquisición a un bajo costo gracias a la abundante producción de ésta planta en nuestro país; generando una alternativa de control y prevención de algunas enfermedades orales.

III. MARCO CONCEPTUAL

Desde la antigüedad el hombre ha utilizado plantas para el tratamiento de numerosas patologías apoyado en creencias populares y cultura tradicional que se ha transmitido de padres a hijos por generaciones; esto ha impulsado diversos estudios científicos que en base a la extracción de los principios activos de las plantas lograron reportar cuantiosas propiedades medicinales.⁷⁻¹⁰

Caesalpinia spinosa (Molina) Kuntze, nombre científico de la "tara", según el catálogo de las Angiospermas y Gimnospermas del Perú del Jardín Botánico de Missouri, esta especie que se encuentran en el Perú.¹¹ Su nombre fue otorgado en honor de Andrea Caesalpini (1524-1603), botánico y filósofo italiano; Spinosa, del latín spinosus-a-um, con espinas.⁵

Es un árbol oriundo del Perú, utilizada desde la época prehispánica en la medicina tradicional para aliviar malestares de la garganta, sinusitis, infecciones vaginales y micóticas, lavado de ojos inflamados, heridas crónicas, dolor de diente, dolor de estómago, diarreas, cólera, reumatismo y resfriados. Actualmente como primera materia en el mercado mundial de los hidrocóloides y antioxidantes alimenticios.^{6,12}

Características botánicas

La Tara, es un árbol que mide de dos a tres metros de altura, su tronco está conformado por una corteza gris espinosa, con ramas densamente pobladas además la copa no tiene una forma definida y es poco densa, las hojas tiene un aspecto de plumas, ovoides y brillante levemente espinosa de color verde oscuro y

miden 1.5 cm de largo, mientras que sus flores son de color amarillo con pigmentos rojizos, distribuidos en grupos de 8 cm a 15 cm de largo. Los frutos son vainas explanadas e indehiscentes de color naranja de 8 cm a 10 cm de largo y 2 cm de ancho aproximadamente, que contienen de 4 a 7 granos de semilla redondeada de 0.6 cm a 0.7 cm de diámetro de color pardo negruzco cuando están maduros.¹³ Se registra que la producción de un árbol de tara tiene una media de veinte a cuarenta kilogramos de vaina recolectados dos veces al año. Además, se observa que un árbol de tara da frutos a partir de los tres años cuando es sembrado a diferencia de la tara silvestre que comienza su crecimiento a los cuatro años. Esta planta tiene como media de vida cien años; teniendo como área de desarrollo diez metros cuadrados.¹³

Takhtajan (1980) describe su ubicación taxonómica de la siguiente forma:

Reino : Plantae

División : Magnoliophyta

Clase : Magnoliopsida

Subclase : Rosidae

Orden : Fabales

Familia : Fabaceae

Subfamilia: Caesalpinioideae

Género : *Caesalpinia*

Especie : *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze

Sinonimia vulgar: tara, taya, oro verde de los incas.¹³

Distribución geográfica

El país que tiene mayor variedad y área de bosques de tara es el Perú, con una representación del 80 % de la comercialización mundial. Esta planta crece de manera espontánea en la costa ya sea en los valles o en las lomas, en la vertiente occidental de los Andes y en los valles interandinos. El Perú tiene una gran diversidad de ecosistemas razón por la cual el suelo presenta diferente composición química, entre estas encontramos a los suelos silicios, arcillosos, arenosos, escasos en minerales calcáreas que son propicios para el cultivo de esta planta. Además se desarrolla, en la depresión del río Rímac, puede crecer hasta los 2,700 m; en la región del Santa hasta 2,800 m, en la cuenca del río Pongora llega hasta los 3,000 m, y en el valle de Urubamba entre 2,800 y 3,400 m.^{5,14}

Composición Química:

Hojas: Tienen dentro de sus componentes a las gomas, glicósidos, mucílagos, taninos (de los cuales el 12.7 % se presenta como taninos gálicos), antraquinonas, esteroides y flavonoides.¹⁵

Vainas: Su contenido de taninos hidrolizables difiere de acuerdo al suelo donde esta sea sembrada con un rango de 40 % a 60 %, la hidrólisis de estos taninos lleva a la disociación del ácido gálico; de esta forma se han aislado galato de etilo y 4 galatos del ácido químico correspondiendo a los ésteres metílicos de 4,5-di-O-galoilquínico y de 3,4,5-tri-O-galoilquínico, y a los ácidos 3,4-di-O-galoilquínico y 3,4,5-tri-O-galoilquínico.¹⁶

Semillas: Son hidrocoloide galactomanánico más conocidas como gomas, donde los elementos monoméricos galactosa y manosa se hallan en una asociación de 24,41:70,90 (1:2,9). Su peso molecular fue evaluado gracias a la viscosidad intrínseca que esta presenta y se halló una media de 351400 uma, además la goma da lugar a soluciones acuosas con propiedades de fluido pseudoplástico con una viscosidad promedio de 4000 cp.¹⁷

Principio Activo: Taninos

Las investigaciones reportan que los taninos pueden encontrarse en la semilla, hoja, corteza, vaina y en los frutos verdes de los árboles de varias especies, sin embargo es la tara quien tiene mayores porcentajes de taninos, razón por la cual es considerada la más relevante. Los taninos son un compuesto orgánico polihidroxifenólico o ésteres de un azúcar, con una variable de ácidos fenólicos que por lo general es el ácido gálico o ácido elágico. Los estudios realizados determinan que en la cascara de la vaina se concentran los mayores niveles de taninos (ácido tánico y el gálico), se describen niveles de 65%.^{14,5}

Los taninos de la tara tienen como principal componente en su estructura al ácido gálico, logrando así diferenciarse de otros compuestos del grupo taninos hidrolizables que está basado sobre un galotanino y un elagitanino. Su estructura en tres dimensiones podría estar relacionada a la posición del número largo de anillos galotánicos.^{18,19}

Salminen²⁰ reporta que los compuestos fenólicos de la tara mostrarían mayor apego hacia una sustancia de polaridad intermedia (acetona y metanol).

Propiedades terapéuticas

Se reporta una propiedad común en los taninos son: astringentes y coagulantes; por esta razón es utilizada en medicina sobre las mucosas y de los tejidos, formando una capa aislante y protectora de la irritación y dolor permitiendo la regeneración de los tejidos.^{12,14}

Los enjuagues que se utilizan en base al extracto de tara reportan la mejora de amígdalas inflamadas, (aquí sucede la precipitación de la glicoproteína de la saliva generando que está inutilice su habilidad de lubricación). Además, se reportan estudios de investigadores Asiáticos que desarrollaron curaciones con pastas o polvo de tara para las quemaduras y escoriaciones, comprueban dichas propiedades.¹⁸

ANTECEDENTES

Lopez²¹ demostró la actividad antimicrobiana *in vitro* de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze en su uso tradicional (té), sobre bacterias Gram (+) y Gram (-), *Candida albicans*, *Penicillium sp* y *Aspergillus sp*; determinó que especies, oriundas de Cajamarca, Ayacucho y Churín poseen un aumento de la acción antibacteriana sobre las bacterias Gram (+) y Gram (-). Las semillas oriundas de Likahuasi y Churín evidencian mayor acción antifúngica sobre a *Penicillium* y ninguna acción frente a *Aspergillus*. Mediante el tamizaje fitoquímico de la vaina y semilla se reportó la presencia de taninos, flavonoides y péptidos, los cuales le otorgan sus propiedades antibacterianas a esta planta, resaltando que la mayor concentración de taninos se encuentra en la vaina.

Liu et al.²² realizaron un estudio experimental con los extractos de *Eucalyptus* y *Caesalpinia spinosa* Molina (Kuntze) (vainas y semillas) para su elaboración utilizaron como solvente al alcohol-acetona en una proporción de 1:1, sobre *Shigella flexneri*, *Bacillus subtilis*, *Klebselia sp*, *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus*, con el método de difusión con disco. Reportaron que el extracto de la vaina de tara tuvo acción antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, más no para el extracto de la semilla, además el extracto de la vaina de tara mostró mayores halos de inhibición que las hojas de *Eucalyptus sp*.

Ferreira et al.²³ determinaron la actividad antifúngica con un extracto hexánico a base de *Caesalpinia spinosa* sobre *Fusarium solani* y *Phoma tarda* quienes afectan diversos cultivos, con la finalidad de poder utilizar este extracto para controlar la enfermedad de fusariosis además de las manchas de *Phoma* en las hojas de las plantaciones de café. Concluyendo que el extracto tienen acción antifúngica puesto que detuvieron el crecimiento micelial en el rango de 3,95% a 32,20 % para el *Phoma tarda* y de 7,29 % a 33,83 % para el *Fusarium solani*.

Kloucek et al.²⁴ realizaron un ensayo antibacteriano sobre nueve extractos, uno de estos fue el extracto etanólico al 80% de *Caesalpinia spinosa* Molina (Kuntze) sobre cepas Gram positivas y tres Gram negativas. Para todas las muestras se utilizó al etanol al 80% como solvente. Para la evaluación del efecto antibacteriano se usó la técnica de microdilución. Con respecto a los hallazgos se reportó que el extracto posee acción antibacteriana frente a *Enterococcus faecalis* determinando una concentración mínima inhibitoria de 0,5 µg/ml, además para *Bacteroides fragilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* fue de 16 µg/ml y para *Bacillus cereus* fue de 8 µg/ml.

Iannacone et al.²⁵ este estudio experimental donde se determinó la acción biocida de cuatro plantas peruanas, siendo la *Caesalpinia spinosa* (Fabaceae) una de ellas, para lo cual se elaboró un extracto acuoso donde se utilizó solo las hojas de dicha planta con una concentración de 20% sobre gorgojo adulto de *Stegobium paniceum* y *Sitophilus zeamais* Moytschulsky. Concluyeron que no hay efecto biocida significativo.

Kondo et al.¹⁶ evaluaron el efecto antibacteriano del extracto de *Caesalpinia spinosa* Molina (Kuntze) con cuatro solventes diferentes (etanólico, acetato de etilo, butanólico y acuoso) en presencia y ausencia de oxitocina para la cual utilizaron 26 muestras, sobre *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. Reportaron que el extracto de acetato de etilo de *C. spinosa* en presencia de oxitocina fue la más activa, por lo que fue sometida posteriormente a segmentación biodirigido, llegando al aislamiento de cuatro galatos del ácido químico, cuyas estructuras fueron determinadas por técnicas espectroscópicas. El compuesto más activo fue el (3, 4,5-tri-O-galloylquinicacid methyl ester) seguido del (3, 4,5-tri-Ogalloylquinic acid), los cuales intensifican de 2 a 500 veces la actividad de la oxacilina contra diferentes cepas de *S.aureus* meticilino resistentes.

Sampio²⁶ estudio que fue realizado en Brasil con frutos de *Caesalpinia ferrea* fue utilizado como antimicrobiano para curar algunas infecciones orales. Se evaluó la actividad antibacteriana del extracto de la *C. ferrea* sobre los microorganismos patógenos orales más comunes. Se determinó la concentración mínima inhibitoria para *Candida albicans*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S.oralis* y *Lactobacillus* casi fueron de 25.0, 40.0, 66.0, 100.0, 66.0 µg/mL, respectivamente.

La clorhexidina fue usada como control positivo y para el control negativo se usó solución salina. El extracto de *C. ferrea* inhibió tiene efecto antibacteriano sobre todos los microorganismos estudiados.

Escobar et al.³ esta investigación evaluó in vitro el efecto antibacteriano del extracto alcohólico al 25%, 50%, 75% y 100% de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze sobre *Corynebacterium diphtheriae*. Para lo cual utilizó la técnica de difusión. Se halló que la media de los halos formados para de *C. diphtheriae* obtenidos con las diferentes concentraciones varia de 34,11 a 43,55 mm. Se observa que al aumentar la concentración del extracto de 25% a 100%, se obtiene un mayor diámetro del halo de inhibición de *C. diphtheriae*. Se concluye que la tara tiene propiedades medicinales para tratar o prevenir infecciones del tracto respiratorio superior.

Añanca²⁷ determinó el efecto antibacteriano del extracto acuoso de vainas de *C. spinosa* (Molina) Kuntze, en concentraciones que corresponden a 17,5 ; 16,25 ; 15 ; 13,75 ; 12,5 ; 11,25 ; 10 ; 8,75 ; 7,5 ; 6,25 µg/ml, sobre *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Se encontró que se inhibió el crecimiento de *S. aureus* cuya concentración mínima inhibitoria fue de 13.7 µg/ml y la concentración mínima letal fue de 16.25 µm/ml. Se reportó que el extracto acuoso de *C. spinosa* “tara” tiene actividad antibacteriana “in vitro” contra *S. aureus* y *S.pyogenes*.

Huarino et al.²⁸ este estudio experimental in vitro, evaluó la acción antimicrobiana del extracto alcohólico de la *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze sobre flora mixta salival. Para el cual se empleó el método de difusión en disco con soluciones de 6,25; 12,5; 25, 50 y 75 mg/mL del extracto y compararlas Clorhexidina 0.12 % y Alcohol 70°. Se reportó que extracto sobre flora mixta salival muestra una mayor actividad directamente proporcional a su concentración

además el análisis del extracto con el tamizaje fitoquímico señaló alta presencia de taninos, esteroides, triterpenos, flavonoides y saponinas.

Montenegro²⁹ reportó el acción antimicrobiano *in vitro* del extracto alcohólico de la *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze sobre *Porphyromonas gingivalis*, atreves del método de difusión en disco, con las soluciones de 6,25; 12,5; 25, 50 y 75 mg/mL del extracto y compararlas con los controles positivo Clorhexidina 0.12 % y Alcohol 70°. Se concluye que el extracto tiene actividad antibacteriana sobre *Porphyromonas gingivalis*, sin embargo entre las cinco soluciones evaluadas no existe diferencia significativa.

Haro³⁰ realizó un estudio *in vitro* de la eficacia antibacteriana entre el extracto alcohólico de Tara 100% e hipoclorito de sodio 5,25% sobre el *E. faecalis*. Embebiendo discos con 50uL de cada solución y colocándolos en medios de cultivo Mueller Hilton previamente preparados con colonias jóvenes de *E. faecalis* ATCC 29212, incubando las muestras a 37°C de 24 a 72 horas. Resultados obtenidos en halos inhibitorios demostraron que ambas soluciones fueron capaces de producir inhibición del crecimiento bacteriano; siendo durante las primeras 24 h el NaOCl 5,25% más efectivo en comparación con el extracto de Tara 100%. Adicional a esto, se investigó el efecto de sustentividad de las soluciones en el transcurso de 48 y 72 h; encontrando que el extracto de Tara 100% posee un efecto antimicrobiano mayor y prolongado en contraste con el NaOCl 5,25%, el cual presentó un efecto antibacteriano menor.

Benites³¹ determino el acción antimicrobiana del extracto etanólico al 25%, 50%, 75% y 100% de *Caesalpinia spinosa (Molina) Kuntze* frente a *Candida albicans*, para la cual se utilizó el método de difusión con discos. Se concluyo que el extracto de *C. spinosa* tuvo efecto antibacteriano sobre *Candida albicans* además observo que a mayor concentración del extracto se incrementó el efecto antibacteriano, la concentración mínima inhibitoria se obtuvo al 25% y 50% del extracto y la mayor sensibilidad se halló al 75% y 100%.

Zarate³² evaluó la acción antimicrobiana del extracto acuoso de *Caesalpinia spinosa (Molina) Kuntze*, frente a *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* aisladas del Hospital Regional Docente de Trujillo. Se investigaron 80 muestras de orina de pacientes con infección de vías urinarias por *Escherichia coli* y 80 muestras de adultos con faringo amigdalitis por *Streptococcus pyogenes*, se aplicó a las cepas aisladas el extracto acuoso de *Caesalpinia spinosa (Molina) Kuntze*, para observar el efecto antibacteriano in vitro para dichas cepas. Se demostró que la acción antibacteriano del extracto comparado con amoxicilina presentó una alta sensibilidad, y comparado con *Cotrimoxazol* presentó el mismo efecto. Y en cepas de *Escherichia coli*, haciendo una comparación con el extracto acuoso de *C. spinosa* con gentamicina presentó el mismo efecto *in vitro*, pero menor efecto frente a Ciprofloxacino.

Camere³³ demostró la actividad antibacteriana del extracto metanólico de semilla y pulpa de la *Myrciaria dubia* frente a *S. mutans* y *S. sanguinis* para lo cual se usó la técnica de difusión en agar pocillos, además evaluó la citotoxicidad del extracto con la prueba de MTT para hallar la CC50 del extracto. Concluyendo que el efecto antibacteriano sobre el *S. mutans* obtuvo para el extracto de semillas halos de 21.36 mm, mientras que la pulpa tuvo 16.20 mm y *S. sanguinis*, se observó que los halos de inhibición fueron de 19.21 mm y 19.34 mm para los extractos de semilla y pulpa respectivamente.

Merino³⁴ determinó la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Bixa orellana* L. sobre *S. mutans* y *S. sanguinis* para lo cual utilizó el método de difusión en agar pocillos, además evaluó la citotoxicidad del extracto con la prueba de MTT para hallar la CC50 del extracto. Concluyendo que el efecto antibacteriano sobre el *S. mutans* para el extracto de hojas obtuvo halos de 19.97 mm y para *S. sanguinis*, se observó que los halos de inhibición fueron de 19.96 mm además el extracto metanólico de las semillas presentó un efecto de 15.11 mm y 16.15 mm para *S. mutans* y *S. sanguinis* respectivamente. Finalmente se halló la CC50 del extracto de hojas fue de 366.45 µg/ml y la CC50 de las semillas fue de 325.05 µg/ml.

Microorganismos

La cavidad oral humana forma un complejo ecosistema compuesto por una gran cantidad de especies bacterianas^{1,35}, siendo motivo de diversos estudios los cuales reportan que las bacterias están relacionadas al inicio de las principales enfermedades orales como caries dental y la enfermedad periodontal, señalando que la acumulación de comunidades bacterianas en las superficies dentales conocido como placa bacteriana (biofilm o biopelícula) son un factor indispensable para el desarrollo de estas afecciones orales.³⁵⁻³⁷

Streptococcus mutans, se encuentran morfológicamente como cocos Gram-positivos dispuestos en cadena, no móvil además esta bacteria es anaerobia facultativa y produce rápidamente ácido láctico con capacidad de cambiar un medio de pH 7 a pH 4.2 en aproximadamente 24 horas.^{35,38} Esta especie no existe en los recién nacidos, aparece tras la erupción del primer diente, es uno de los primeros en colonizar y adherirse a la biopelícula para multiplicarse allí.³⁶, estos microorganismos tienen como característica principal producir ácidos y polisacáridos a partir de los carbohidratos que consume el ser humano, siendo los polisacáridos quienes los ayudan a adherirse en la placa bacteriana y además de sus propiedades acidogénicas también son acidófilos (tolerantes al ácido), siendo esta la causa por la cual pueden sobrevivir y desarrollarse en un pH bajo, además pueden seguir produciendo ácido con un pH bajo, esta función es conocida como acidúricos.³⁵ propiedades por las cuales logran desmineralizar el esmalte dental, iniciando así la formación de la caries dental.³⁷

Actualmente se ha reconsiderado el papel de los *S. mutans* como agente específico de caries dental, como se explica en la “Hipótesis de la placa ecológica” propuesta por Marsh, plantea que la caries dental sería el resultado de los cambios ocurridos en el equilibrio de la microflora, conduciendo a un cambio ecológico³⁹ además otras evidencias científicas han determinado que la relación entre *S. mutans* y la caries dental en humanos puede ser considerada como de asociación mas no de causalidad esto debido a los factores de virulencia de este microorganismos que son: acidogénicas, acidúricas y acidófilas.^{40,41}

Streptococcus sanguinis, bacteria en forma de cocos, Gram positiva, anaerobia facultativa, inicialmente conocida como *Streptococcus sanguis*, es considerado como uno de los colonizadores tempranos del biofilm oral. Este microorganismo constituye aproximadamente el 15% de la microflora oral, lo que se traduce en altos recuentos de *S. sanguinis* en la saliva, siendo considerado como uno de los causantes más frecuentes de la endocarditis infecciosa, una infección grave endovascular debido a su capacidad de aislarse en otras zonas, puesto que si tiene la oportunidad se aloja en las válvulas del corazón provocando así dicha patología. También es α - hemolítica, habita en superficies blandas y duras, produce peróxido de hidrógeno, inicia su crecimiento a pH menor a 5.^{42,43} Este microorganismo carece de actividad dextranasa, sin embargo produce glucanos solubles e insolubles. Destruye la IgA1 que con carácter secretor en la cavidad oral fija los microorganismos, bloquea sus adhesinas, evita los fenómenos adhesivos y facilita su eliminación hacia el tubo digestivo; la acción de esta IgA1 modifica las acciones protectoras y, en el caso concreto de la película adquirida, deja, “nuevos espacios libres” para la adhesión bacteriana. En conclusión esta

bacteria utiliza diferentes mecanismos de vinculación y sirve como un enlace para la colonización de otros microorganismos y la formación de la biopelícula en superficies dentales.^{35,42}

Se han desarrollado sustancias que ayudan a controlar el crecimiento excesivo de los microorganismos, los cuales son de origen sintético o semi sintético. Según estudios realizados a estos agentes antibacterianos se describen 3 efectos sobre los cultivos bacterianos: a) Efecto bacteriostático; este inhibe el crecimiento bacteriano, pero las células bacterianas no mueren, debido a la unión del agente a los ribosomas y, de esta manera, inhiben la síntesis de proteínas; b) Efecto bactericida; este mata a las bacterias pero no generan lisis celular; c) Efecto bacteriolítico; en este hay una muerte de las bacterias y además, hay lisis celular^{35,43,44}. Es indispensable recordar que las bacterias forman parte de un complejo ecosistema donde muchas de estas bacterias son protectoras, siendo este un punto importante para desarrollar agentes antibacterianos que no causen un daño irreversible al biofilm, sin afectar a las bacterias beneficiosas³⁷.

CLORHEXIDINA

Es una sustancia desinfectante con una base fuerte dicatiónica pH superior a 3,5 con dos cargas positivas en cada extremo del puente de hexametileno. Es esta naturaleza dicatiónica la que la hace extremadamente interactiva con los aniones, lo que es relevante para su eficacia, seguridad, efectos secundarios locales y dificultad para formularla en productos.⁴⁵

Este compuesto se une fuertemente a la membrana bacteriana, si es utilizado en bajas concentraciones genera un efecto bacteriostático que causa un aumento de la permeabilidad con filtración de los componentes intracelulares incluido el potasio. Por el contrario si se utilizan concentraciones elevadas ocasiona la precipitación del citoplasma bacteriano y muerte celular conocido como el efecto bactericida. En la cavidad oral esta sustancia se adhiere rápidamente a las superficies, incluidos los dientes con película adquirida, proteínas salivales y a la hidroxiapatita.⁴⁶

La clorhexidina absorbida se libera gradualmente en 8 a 12 horas sin perder sus propiedades, así mismo a las 24 horas se observa restos de clorhexidina en bajas concentraciones lo que impide la adhesión microbiana durante este tiempo. Los estudios parecen indicar que la acción inhibitoria es únicamente debida a la clorhexidina unida a la superficie de los dientes. Es posible que la molécula se adhiera a la superficie por un catión, dejando los otros libres para interactuar con las bacterias que intentan colonizar la superficie del diente.^{45,47}

MÉTODOS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

a) Difusión: Esta técnica está basada en método de Kirby-Bauer, que puede realizarse a través de discos o pozos. En el primer caso se utiliza discos de papel filtro de 6mm de diámetro al cual se inocula la sustancia en estudio para colocarla en la placa con la bacteria previamente sembrada. A diferencia de la técnica con pozos donde se prepara las placas con el agar y la bacteria en estudio, posteriormente se preparan los pozos donde se colocara una cantidad conocida de la sustancia. Podemos definir a este método como, la concordancia entre la concentración del compuesto necesaria para inhibir un microorganismo y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo propicio y sembrado homogéneamente. Siendo una de sus ventajas que los resultados son altamente reproducibles, motivo por el cual es sumamente utilizado en las investigaciones.⁴³

b) Dilución: Este método es utilizado para definir la concentración mínima inhibitoria que se define como la concentración más baja de sustancia experimental que puede inhibir el crecimiento registrable de un microorganismo después de incubar por 24 horas. Este método también se utiliza para evaluar la concentración mínima bactericida que se describe como la concentración más baja que puede prevenir el crecimiento de un organismo después de subcultivar en un medio libre del compuesto evaluado.^{2,43}

c) Bioautografía: Esta técnica se describe como la diferenciación de los métodos de difusión en agar, donde el analito es atraído dentro de la placa de cromatografía delgada TLC.^{2,43}

CITOTOXICIDAD

La citotoxicidad celular está descrita como la alteración de la función celular básica que resultan en el perjuicio que consigue ser descubierto, donde las células mueren o tienen su metabolismo afectado.⁴⁸

Los ensayos de citotoxicidad son ampliamente utilizados en estudios de investigación para pronosticar la acción tóxica de los fármacos y los elementos químicos, manipulando como modelos experimentales cultivos primarios y órganos aislados como líneas celulares establecidas. Permiten la medición rápida y exacta de la inhibición del crecimiento celular en respuesta a productos químicos ensayados. Pruebas de citotoxicidad se realizan a menudo al comienzo de las investigaciones; facilitan la elección de las concentraciones apropiadas del compuesto ensayado para experimentos adicionales. Por ejemplo, el método de captación del rojo neutro, enlazamiento al azul de Kenacid y por último el de reducción del Bromuro de 3 /4,5 dimetil-2-tiazoil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT).

49,50

Comenzaremos describiendo el ensayo de captación de rojo neutro, que se determina por la liberación de un pigmento en este caso rojo neutro, el cual se libera cuando se da la muerte celular, siendo esta una medida de la toxicidad de un elemento a corto o largo plazo. Teniendo en cuenta que un compuesto es citotóxico, no solo por su mecanismo de acción sino cuando interfiere en el desarrollo normal celular. Lo cual da como resultado la disminución de la velocidad de desarrollo celular expresado por el número de la disminución de la velocidad del desarrollo celular evidenciado en el número de células presentes en

el cultivo.⁵¹ Otro de los ensayos para determinar la citotoxicidad de un compuesto es el enlazamiento al azul de Kenacid, esta técnica mide el cambio del contenido de proteínas totales, lo cual se expresa con la multiplicación celular. Cuando una sustancia es citotóxica aqueja por lo menos a uno de los procesos comprometidos con la proliferación celular entre estos tenemos la síntesis del ADN, la actividad normal de las organelas como mitocondrias, lisosomas, o causar una laceración de la membrana o en el metabolismo de proteínas.⁵²

Finalmente entre las técnicas más utilizadas para determinar la citotoxicidad tenemos al ensayo de reducción del MTT, se utiliza para establecer la viabilidad celular, siendo este un método simple que mide el número de células en el cultivo por medio de la reacción que se da en las mitocondrias de las células vivas que se expresa con la formación de una sustancia coloreada. Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolico) conocido como MTT, es absorbido por las células y reducido por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial (SDH) a su forma insoluble formazan, el cual queda encadenado en las células y puede ser liberado a través de la solubilización de las células. Siendo esta la razón por la cual la cantidad de MTT reducido puede ser cuantificada a través de la técnica colorimétrica, ya que se produce como consecuencia de la reacción un cambio de coloración del amarillo al azul.^{49,53}

IV. OBJETIVO

IV.1. Objetivo General

Evaluar *in vitro* el efecto antibacteriano y citotóxico del extracto metanólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) kuntze “tara” a [0.5 mg/ul] sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556).

IV.2. Objetivos Específicos

1. Determinar el efecto antibacteriano del extracto metanólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) kuntze a [0.5 mg/ul] sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) a las 24 y 48 horas.
2. Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) del extracto metanólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) kuntze frente a las cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) a las 24 y 48 horas.
3. Comparar el efecto antibacteriano entre los grupos experimentales del extracto metanólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) kuntze sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) a las 24 y 48 horas.
4. Determinar el efecto citotóxico (CC50) del extracto metanólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) kuntze frente a la línea celular MDCK (*Madin-Darbi canine Kidney*).

v. HIPÓTESIS

El extracto metanólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) kuntze “tara” tiene acción antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) y no tiene citotoxicidad frente a línea celular MDCK (*Madin-Darbi canine Kidney*) en la concentración de 0.5mg/ul.

VI. METODOLOGÍA

VI.1. Diseño del estudio

El presente estudio es de tipo experimental *in vitro*.

VI.2. Población

Placas petri que contenían las cepas *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556).

Microplaca que contenían la línea celular MDCK

VI.3. Muestra

Se realizó una prueba piloto para hallar el tamaño de la muestra, en donde se aplicó la siguiente fórmula (comparación de medias):

$$n = \frac{2 (z_{\alpha} + z_{\beta})^2 s^2}{d^2}$$

Donde:

n = número de sujetos necesarios para cada una de las muestras.

z_{α} = valor de z correspondiente al riesgo α fijado.

z_{β} = valor de z correspondiente al riesgo β fijado.

s^2 = varianza de la variable cuantitativa que tiene el grupo de referencia.

d = valor mínimo de la diferencia que se desea detectar.

Nivel de significancia de 95%

La muestra está conformada por:

n=18 placas petri que contenían las cepas *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).

n=18 placas petri que contenían las cepas *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556).

VI.4. Criterios de selección

VI.4.1. Criterios de inclusión

- Extracto metanólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) kuntze “tara” sin contaminación.
- Placas petri que no tienen contaminación de cualquier otro microorganismo.
- Placas petri que están inoculadas con cepas de *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556)
- Placas petri que están inoculadas con cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).
- Condiciones controladas de línea celular MDCK (medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, 25 µg/L de gentamicina y 200 mM L-glutamina a 37°C y 5% CO₂).

VI.4.2. Criterios de exclusión

- Extracto metanólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) kuntze “tara” contaminado.
- Placas petri que tienen contaminación de cualquier otro microorganismo.
- Microplaca que no esté sellada.

VI.5. Variables

Variable Dependiente:

Efecto antibacteriano frente a cepas de *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), es una variable cuantitativa, continua, medida en escala numérica, definida como capacidad de una sustancia de inhibir el desarrollo y crecimiento de determinada bacteria, siendo valorizados como mm.

Efecto citotóxico del extracto metanólico *Caesalpinia spinosa* (Molina) *kuntze* “tara” frente a línea celular MDCK, es una variable cuantitativa, continua, medida en escala numérica, definida como capacidad de una sustancia para medir la viabilidad celular. siendo valorizado como $CC_{50}=\text{mg/ul}$

Variable Independiente:

Sustancia experimental, variable cualitativas, nominales, politómicas se definen como sustancia que tiene efecto antibacteriano y antiséptico.

Microorganismos, variable, cualitativas, nominales, dicotómicas se definen como organismo microscópico del cual se evaluará efectos de inhibición.

Operacionalización de Variables:

| Variable | Definición Operacional | Indicadores | Tipo | Escala de medición | Valores |
|-------------------------------|---|---|--------------|--------------------|---|
| Efecto antibacteriano | Capacidad de una sustancia de inhibir el desarrollo y crecimiento de determinada bacteria | Método de Kirby Bauer Halos de inhibición del crecimiento bacteriano | Cuantitativo | De razón | mm de inhibición |
| Efecto citotóxico | Capacidad de una sustancia para medir la viabilidad celular | Ensayo de MTT | Cuantitativo | De razón | CC ₅₀ =mg/ul |
| Sustancia experimental | Sustancia que tiene efecto antibacteriano y antiséptico | Solución colocada en placas de Agar | Cualitativo | Nominal | Extracto metanólico de <i>Caesalpinea spinosa</i> (Molina) <i>kuntze</i> 0.5mg/ul |
| Microorganismos | Organismo microscópico del cual se evaluará efectos de inhibición | Microorganismo asignado | Cualitativo | Nominal | - <i>Streptococcus mutans</i> - <i>Streptococcus sanguinis</i> |

VI.6. Técnicas y/o procedimientos

Método: Observación estructurada

Capacitación:

Se realizó un entrenamiento previo en la facultad de Biología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, para ejecutar el sembrado de las cepas en las placas petri con los medios de cultivo selectivo para las bacterias en estudio.

Calibración:

Cuando se midieron los halos de inhibición que demuestran la actividad antimicrobiana del extracto de la Tara. Se obtuvo una correlación entre la toma de datos entre el microbiólogo y el investigador, con un coeficiente de correlación (0.9) en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas.

Instrumentos:

Se usaron fichas de recolección de datos, donde se tomó nota de los cambio en el diámetro del halo de inhibición de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) frente al extracto metanólico de *Caesalpinea spinosa* (Molina) kuntze en sus diferentes diluciones. Medido con un calibrador o Vernie.

Para la evaluación del efecto citotóxico del extracto metanólico de *Caesalpinea spinosa* (Molina) kuntze frente a línea celular MDCK se utilizó lector de ELISA (Biorad).

Obtención del factor experimental

Se obtuvieron 200 gr de vainas de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara” de una casa comercial la cual cuenta con registro sanitario acogido al D.S. 010-97-SA.Art.70 (sin conservantes), procedente de Huaral. **(Figura 2)**

Preparación extracto metanólico

Las vainas de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara” fueron lavadas con agua destilada estéril y secadas a temperatura ambiente, luego se procedió a separar las semillas de las vainas para pulverizar solo las vainas con ayuda de un molino y almacenado en botella hermética. El extracto fue realizado mezclando la vaina pulverizada con metanol puro (Merck® peruana) a una razón 1:2 (P/V) (100 gr de tara: 200 ml metanol) e incubados a oscuridad y a temperatura ambiente durante 10 días agitándolo todos los días. Posteriormente, los extractos fueron filtrados y veces en papel Whatman N°4 y el metanol se evaporó con ayuda de un rotavapor durante 4 horas. Se comprobó la esterilidad del extracto en placas petri con agar BHI durante 48 horas. El procedimiento fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas. **(Figura 3-6)**

Cepas bacterianas para el estudio

Al ser un estudio experimental, en el cual se trabajan con microorganismos anaerobios facultativos, se trabajó cepas *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) anaerobias estándar ATCC (American Type Culture Collection, EE.UU). Los microorganismos

fueron importados a través de laboratorios GenLab S.A.C y cultivados en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas siguiendo las instrucciones del fabricante. **(Figura 9)**

Evaluación de la Actividad Antibacteriana

Para la evaluación se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas y se usaron los siguientes métodos:

Difusión en agar

Una vez reactivas las cepas se cosecharon y se diluyeron en un tubo de ensayo con 6 ml de suero fisiológico hasta obtener una dilución 0.5 en la escala de McFarland. La actividad antibacteriana se analizó por el método de difusión en pozo (perforación en gel de agar). Se utilizó 18 placas de agar con medio BHI, inoculadas de manera independiente con 0.5 ml de cada una de las bacterias a evaluar. Las bacterias utilizadas para la inoculación estuvieron en una suspensión de 0.5 de la escala de McFarland. Las placas conteniendo las bacterias fueron secadas durante 3 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, con ayuda de un sacabocados, se realizó perforaciones de 8 mm de diámetro en cada una de las placas descritas anteriormente. A cada pocillo se le adicionó 100µl del extracto metanólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze. Como control positivo se utilizó 100µl de Clorhexidina de 0.12% y como control negativo PBS tratado en las mismas condiciones que el extracto. Todo el procedimiento

fue realizado dentro de una cabina de flujo laminar tipo II para mantener las condiciones de esterilidad y bioseguridad. Las placas fueron incubadas en condiciones de anaerobiosis controlada, a 37°C durante 24 y 48 horas. Posteriormente, se procedió a medir los diámetros de los halos de inhibición con ayuda de un Vernier, las medidas fueron consideradas en milímetros (mm). **(Figura 10-13)**

Mínima Concentración Inhibitoria

Para evaluar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto de *Caesalpinia spinosa (Molina) kuntze* “tara” se utilizó el método de dilución.

Preparación de las diluciones

Se utilizaron 8 tubos estériles para obtener las diferentes concentraciones del extracto metanólico de *Caesalpinia spinosa (Molina) kuntze* para enfrentarlas a *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*.

En el primer tubo se colocó 4ml del extracto puro 0.5mg/μl, del tubo 2 al 8 se colocó 2ml de BHI. Del tubo inicial se extrajeron 2ml (extracto puro) y se vertieron en el tubo 2 se mezcló en el Vortex y luego se extrajo 2ml para verterlos en el tubo 3 y así sucesivamente hasta llegar al tubo 8, de tal manera que se obtuvieron diluciones de 1:1, quedando al final 2ml que fue desechado. Obteniendo las siguientes diluciones: D₂: 0.25 mg/ul D₃: 0.125 mg/ul D₄: 0.063 mg/ul D₅: 0.0313 mg/ul D₆: 0.02 mg/ul D₇: 0.008 mg/ul D₈: 0.004 mg/ul. Estas diluciones fueron colocadas en 12 placas que contenían las bacterias en estudio. Posteriormente, con ayuda de un

sacabocados, se realizaron perforaciones de 8 mm de diámetro en cada una de las placas descritas anteriormente. A cada pocillo se le adicionó 100µl de las diluciones del extracto metanólico de *Caesalpinia spinosa (Molina) kuntze* “tara”. Todo el procedimiento fue realizado dentro de una cabina de flujo laminar tipo II para mantener las condiciones de esterilidad y bioseguridad. Las placas fueron incubadas en condiciones de anaerobiosis controlada, a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, se procedió a medir los diámetros de los halos de inhibición con ayuda de un Vernier, las medidas fueron consideradas en milímetros (mm). **(Figura 14-16)**

Conteo de colonias

Se utilizó 8 tubos que contenían las diluciones antes descritas del extracto de *C. spinosa (Molina) kuntze* para adicionar 10µl de *S. mutans* mezclado en el Vortex, luego se procedió a realizar el sembrado de las diluciones del extracto que contenían la bacteria en 8 placas Petri estériles con BHI, el mismo procedimiento se realizó para *S. sanguinis*. Las placas fueron incubadas en condiciones de anaerobiosis controlada, a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, se realizó el conteo de colonias donde se determinó la ausencia o presencia de colonias bacterias en las diluciones estudiadas. Todo el procedimiento fue realizado en cabina de flujo laminar tipo II para mantener las condiciones de esterilidad y bioseguridad. Posteriormente fueron incubadas a 37°C en jarra de anaerobiosis por 24 horas. **(Figura 18)**

Línea celular

La línea celular MDCK fue obtenida de la ATTC (Colección americana de cultivos, EEUU). Las células fueron cultivadas en medio esencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco BRL, Grand EE.UU), suplementado con suero bovino fetal al 10% (SFB), 25 µg/L de gentamicina y 200 mM L-glutamina. Las células fueron cultivadas a 37°C en una atmosfera húmeda al 5% de CO₂ en condiciones de esterilidad.

Prueba de citotoxicidad (Prueba MTT) para evaluar la CC₅₀ de *Caesalpinia spinosa* (Molina) kuntze “tara”.

La CC₅₀, se define como la concentración de una sustancia que disminuye la viabilidad de las células a un 50% y será determinada mediante la prueba de MTT.

La citotoxicidad del extracto *Caesalpinia spinosa* (Molina) kuntze “tara” fue evaluada utilizando una prueba colorimétrica, basada en la reducción de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio bromuro (MTT) por las enzimas mitocondriales. La prueba fue realizada en una microplaca para cultivo celular de 96 pocillos estéril en cada pocillo, se cultivó 1x10⁴ células/pocillo en 200 µL de medio (8 mm de diámetro; Falcon Plastics, Oxnard). Las muestras fueron incubadas a 37 °C en una atmosfera húmeda al 5% de CO₂ durante 24 horas. Posteriormente, se procedió a adicionar a la monocapa celular, el extracto *Caesalpinia spinosa* (Molina) kuntze a diferentes concentraciones, las cuales van en un rango de 0 a 40 mg/ul. Se procedió a poner, en cada ensayo, un control positivo de viabilidad celular

(medio de cultivo pero sin ningún tipo de extracto). El cultivo fue incubado a 37°C durante 6 días. La morfología de las células fue inspeccionada diariamente y observada al microscopio por si se detectase alguna alteración.

Posteriormente, se adicionó 20µL de solución de MTT (3mg/mL en PBS 1X) a cada pocillo. Las muestras fueron incubadas durante 3 horas a 37 °C. El medio fue cuidadosamente removido y se obtuvieron los cristales de formazan, los cuales fueron diluidos con 200µL DMSO (Dimetil Sulfóxido). Finalmente, la viabilidad celular fue calculada como el porcentaje de la absorbancia obtenida en cada pocillo versus el control de células no tratadas. Estos valores (570nm) fueron medidos en un lector de ELISA (Biorad). El CC50 se determinó utilizando un programa de computadora Pharm/PCS (Tallarida and Murray, 1987). Para confirmar los resultados obtenidos con la prueba de MTT, las monocapas fueron evaluadas microscópicamente para evidenciar cambios morfológicos. Se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas. (**Figura 21-22**)

VI.7. Plan de análisis

Los datos obtenidos fueron tabulados de manera automatizada en el programa estadístico SPSS versión 18.0. Para el análisis univariado, se procedió a obtener la estadística descriptiva (media, desviación estándar, valor máximo, valor mínimo) de las variables en estudio, registradas en una tabla de frecuencia.

Se determinó la distribución normal mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Para los datos que presentaron distribución normal, se utilizó la prueba t-student. Además se realizó la prueba de Tukey para hacer comparaciones múltiples.

VI.8. Consideraciones éticas

El presente estudio no presentó implicancias éticas, debido a que es una investigación de tipo experimental *in vitro*, que consistió en evaluar el efecto antibacteriano del extracto metanólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara” sobre cultivos de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*.

Se procedió a realizar una solicitud al comité de ética para obtener la exoneración del presente trabajo de investigación experimental *in vitro*.

VII. RESULTADOS

Se determinó el efecto antibacteriano del extracto metanólico de *C. spinosa (Molina) kuntze* para las cepas de *Streptococcus mutans* los resultados mostraron un promedio de halo inhibitorio de 25.61 mm. Para el caso de *Streptococcus sanguinis* fue de 21.60 mm. Asimismo, el control positivo (Clorhexidina 0.12%) obtuvo para *Streptococcus mutans* 24.69 mm y para *Streptococcus sanguinis* 20.73 mm de halo de inhibición. Todo esto a las 24 horas. **(Tabla 1)**

Posteriormente se volvió a evaluar los resultados a las 48 horas para ambas cepas. Determinando que extracto metanólico de *C. spinosa (Molina) kuntze* para las cepas de *Streptococcus mutans* mostró un promedio de halo inhibitorio de 25.64 mm. Para el caso de *Streptococcus sanguinis* fue de 21.63 mm. Asimismo, el control positivo (Clorhexidina 0.12%) obtuvo para *Streptococcus mutans* 25.02 mm y para *Streptococcus sanguinis* 20.76 mm de halo de inhibición. **(Tabla 2)**

Al evaluar la concentración mínima inhibitoria del extracto metanólico de *C. spinosa (Molina) kuntze* para *Streptococcus mutans* se encontró en la dilución de 0.06 mg/ul con un promedio de 14.15 mm de halo de inhibición y para *Streptococcus sanguinis* fue la dilución de 0.02mg/ul con un promedio de 13.7 mm de halo de inhibición. **(Tabla 3)**

Se realizó una comparación múltiple *in vitro* del efecto antibacteriano de las sustancias en estudio sobre *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) a las 24 y 48 horas para la cual se utilizó la prueba Tukey, encontrando que no existe diferencias estadísticamente significativas ($p=1.00$), para cada grupo individualmente. **(Tabla 4)**

Se realizó una comparación individualmente de las sustancias en estudio, *C. spinosa* (Molina) kuntze vs. Clorhexidina sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) a las 24 y 48 horas para la cual se utilizó la prueba Tukey, se encontró diferencias estadísticamente significativas al comparar el extracto y control positivo a las 24 horas para las dos cepas ($p=0.00$), resultado que se repitió a las 48 horas ($p=0.00$). Esto significa que el extracto tiene mayor efecto antibacteriano que clorhexidina 0.12%. **(Tabla 5)**

La citotoxicidad del extracto metanólico de *C. spinosa* (Molina) kuntze se determinó utilizando la línea celular MDCK. Para evaluar la citotoxicidad se utilizó concentraciones crecientes del extracto desde 0.5 a 40 mg/ul y la viabilidad celular se determinó por el método de MTT. La viabilidad relativa de las células incubadas con el extracto se calculó tomando como referencia los cultivos no tratados (sin extracto, control, 0 mg/ul). Los resultados indican que el extracto mostró un efecto citotóxico al 50% (CC50) en una concentración mayor a 17 mg/ul del extracto. Estos valores fueron confirmados mediante microscopia, observando disminución del número de células y efecto citopático (CPE). **(Tabla 6)**

Tabla 1. Efecto antibacteriano del extracto metanólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) a las 24 horas.

| Microorganismo | Grupo | Media | Desviación estándar | Mínimo | Máximo |
|----------------------------------|-------|-------|---------------------|--------|--------|
| <i>Streptococcus mutans</i> * | EMCS | 25.61 | .20 | 25.30 | 25.90 |
| | CHX | 24.97 | .65 | 24.00 | 25.60 |
| <i>Streptococcus sanguinis</i> * | EMCS | 21.60 | .20 | 21.30 | 21.90 |
| | CHX | 20.73 | .56 | 20.20 | 21.50 |

* Medición de los halos de inhibición en mm

EMCS: Extracto Metanólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) kuntze

CHX: Clorhexidina al 0.12%

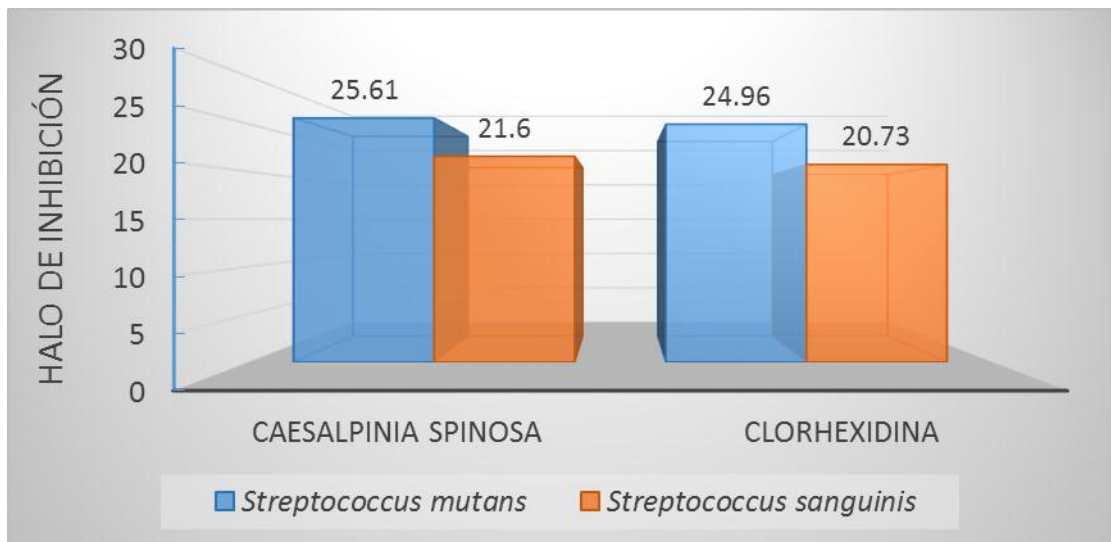


Gráfico 1. Efecto antibacteriano del extracto metanólico de *Caesalpinia spinosa* sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) a las 24 horas.

Tabla 2. Efecto antibacteriano del extracto metanólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) a las 48 horas.

| Microorganismo | Grupo | Media | Desviación estándar | Mínimo | Máximo |
|----------------------------------|-------|-------|---------------------|--------|--------|
| <i>Streptococcus mutans</i> * | EMCS | 25.64 | .17 | 25.40 | 25.90 |
| | CHX | 25.02 | .57 | 24.20 | 25.60 |
| <i>Streptococcus sanguinis</i> * | EMCS | 21.63 | .17 | 21.30 | 21.90 |
| | CHX | 20.76 | .54 | 20.20 | 21.50 |

* Medición de los halos de inhibición en mm

EMCS: Extracto Metanólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze

CHX: Clorhexidina al 0.12%

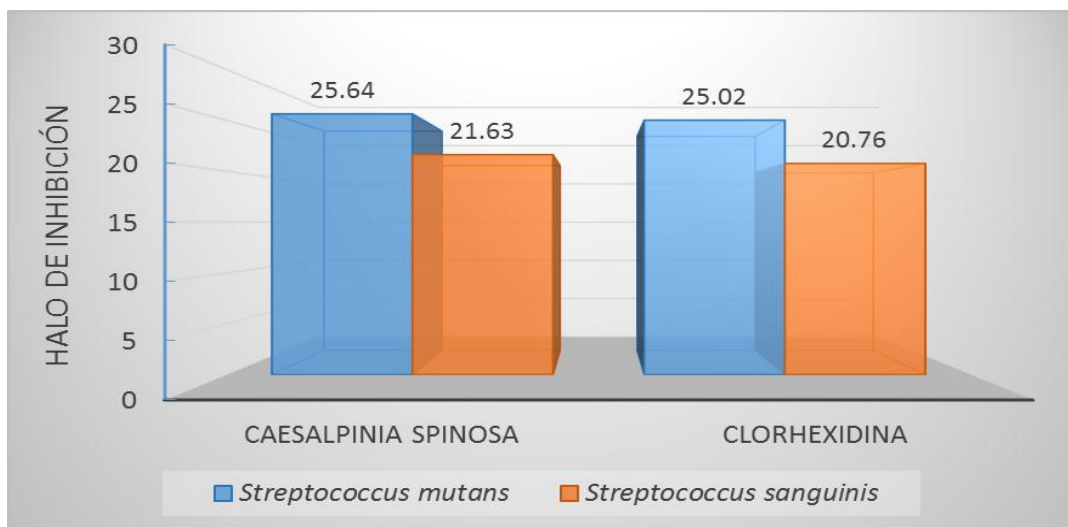


Gráfico 2. Efecto antibacteriano del extracto metanólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) a las 48 horas.

Tabla 3. Evaluación de la concentración mínima inhibitoria del extracto metanólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556).

| Microorganismos | Concentraciones (mg/ul) | | | | | | | |
|----------------------------------|-------------------------|------|-------|-------|-------|------|-------|-------|
| | 0.5 | 0.25 | 0.125 | 0.063 | 0.031 | 0.02 | 0.008 | 0.004 |
| <i>Streptococcus mutans</i> * | 25.61 | 21.6 | 18 | 14.15 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus sanguinis</i> * | 21.6 | 20 | 17.8 | 16.1 | 15.1 | 13.7 | 0 | 0 |

* Medición de los halos de inhibición en mm

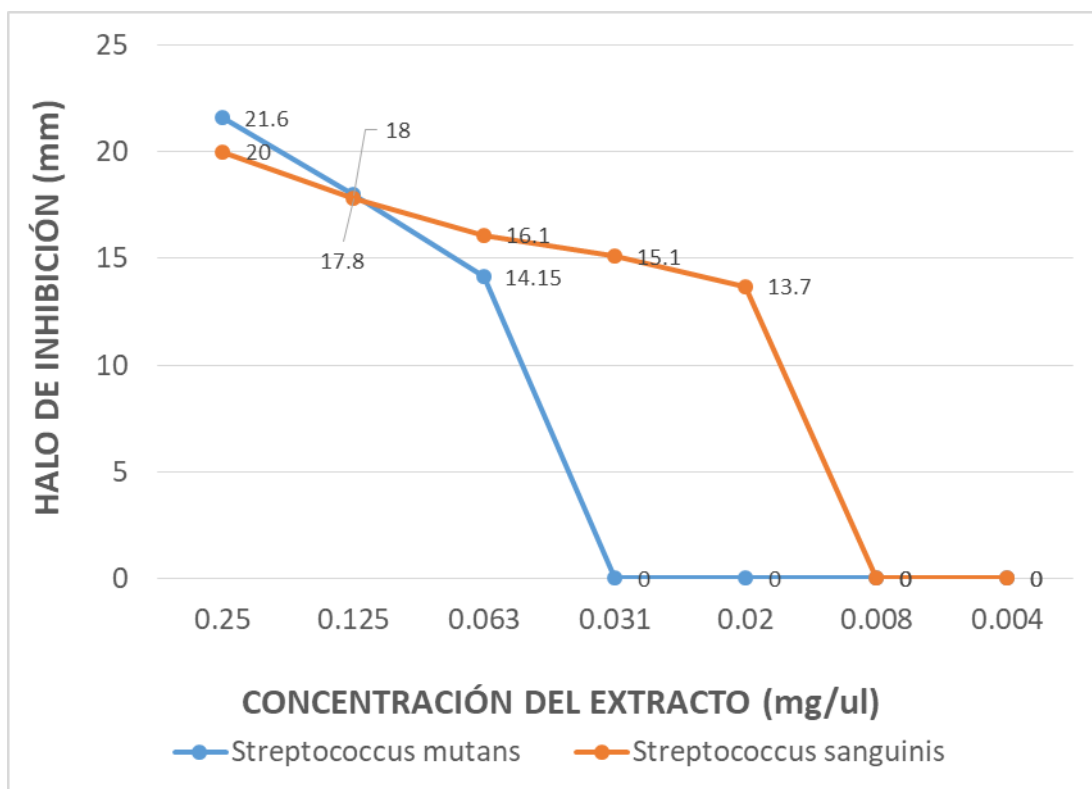


Gráfico 3. Evaluación de la concentración mínima inhibitoria del extracto metanólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556).

Tabla 4. Comparación *in vitro* del efecto antibacteriano de las sustancias en estudio sobre *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) a las 24 y 48 horas.

| Grupo | Bacteria | 24 HORAS* | 48 HORAS* | p** |
|-------------------------------|---------------------|------------------|------------------|------------|
| EMCS 0.5 mg/ul | <i>S. mutans</i> | 25.61 | 25.64 | 1 |
| | <i>S. sanguinis</i> | 21.61 | 21.63 | 1 |
| CLORHEXIDINA 0.12% | <i>S. mutans</i> | 24.97 | 25.02 | 1 |
| | <i>S. sanguinis</i> | 20.73 | 20.76 | 1 |
| PBS | <i>S. mutans</i> | 0 | 0 | 1 |
| | <i>S. sanguinis</i> | 0 | 0 | 1 |

* Medición de los halos de inhibición en mm

** $p > 0.05$ = No es estadísticamente significativo (Prueba Tukey)

EMCS: Extracto Metanólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze

CHX: Clorhexidina al 0.12%

Tabla 5. Comparación *in vitro* del efecto antibacteriano del extracto metanólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze vs Clorhexidina sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) a las 24 y 48 horas.

| Microorganismo | Grupo | Media | Desviación estándar | p** |
|--|-------|-------|---------------------|-----|
| <i>Streptococcus mutans</i> * 24 Horas | EMCS | 25.61 | 0.20 | 0 |
| | CHX | 24.96 | 0.65 | |
| <i>Streptococcus mutans</i> * 48 Horas | EMCS | 25.64 | 0.17 | 0 |
| | CHX | 25.02 | 0.57 | |
| <i>Streptococcus sanguinis</i> * 24 Horas | EMCS | 21.60 | 0.20 | 0 |
| | CHX | 20.73 | 0.56 | |
| <i>Streptococcus sanguinis</i> * 48 Horas | EMCS | 21.63 | 0.17 | 0 |
| | CHX | 20.76 | 0.54 | |

* Medición en mm

** p<0.05= Estadísticamente significativo (Prueba Tukey)

EMCS: Extracto Metanólico de *Caesalpinia spinosa*

CHX: Clorhexidina al 0.12%

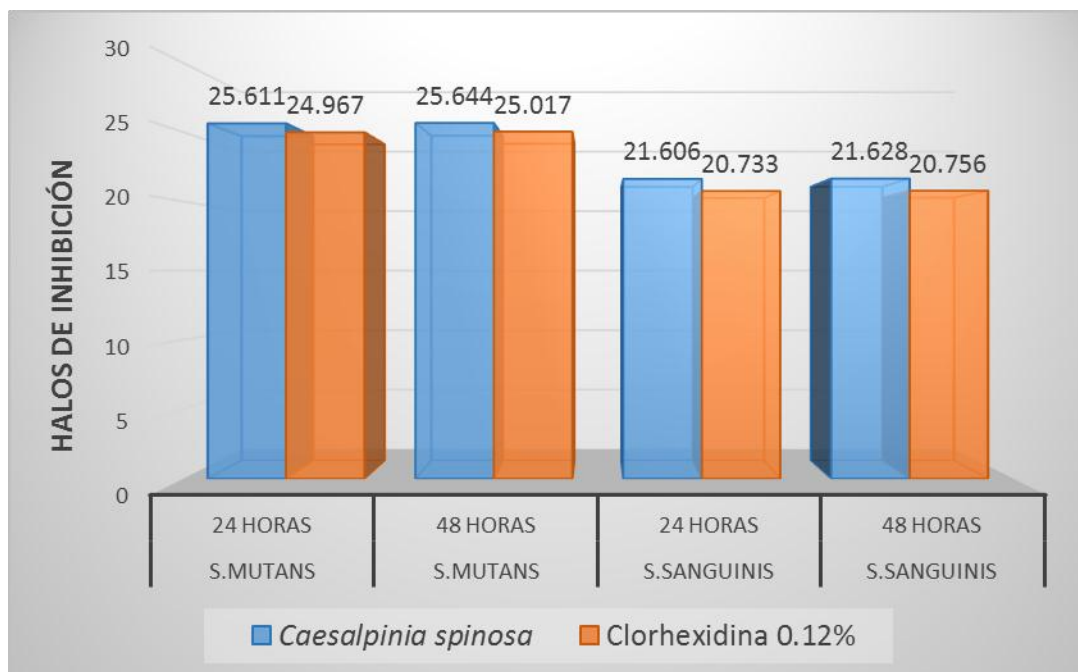


Gráfico 4. Comparación *in vitro* del efecto antibacteriano del extracto metanólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze vs Clorhexidina sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) a las 24 y 48 horas.

Tabla 6. Evaluación de la viabilidad celular de las células MDCK frente al extracto metanólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze (Citotoxicidad)

| Extracto metanólico (mg/ul) | Valores de densidad óptica (nm) | Viabilidad celular (%) |
|--|--|-----------------------------------|
| 0 | 3.284 | 100% |
| 0.5 | 3.284 | 100% |
| 1 | 3.342 | 100% |
| 2.5 | 3.284 | 100% |
| 5 | 2.875 | 87% |
| 10 | 2.819 | 85% |
| 15 | 2.324 | 71% |
| 20 | 1.447 | 44% |
| 25 | 1.04 | 32% |
| 30 | 0.835 | 25% |
| 35 | 0.77 | 23% |
| 40 | 0.705 | 21% |

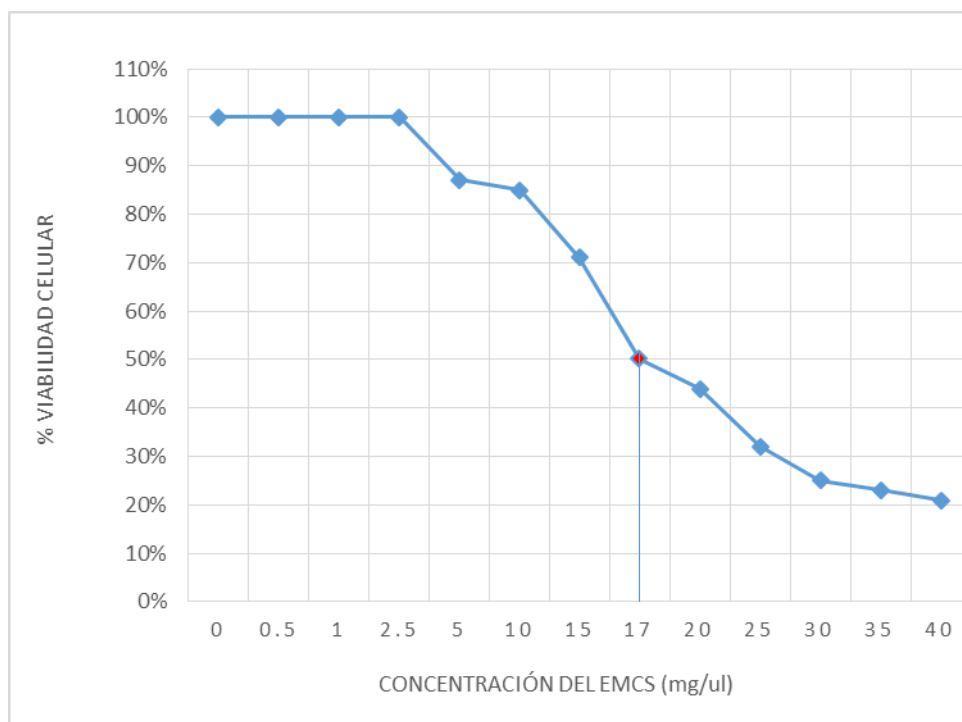


Gráfico 5. Evaluación de la viabilidad celular de las células MDCK frente al extracto metanólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze (Citotoxicidad)

VIII. DISCUSIÓN

Las enfermedades orales más comunes como: caries dental y periodontitis, son consideradas como problemas de salud pública, debido a su alta prevalencia en la población mundial; por ello, se han planteado distintas alternativas para controlar y prevenir dichas padecimientos. Una de estas alternativas, en la actualidad, se centra en la fitoterapia; es decir, en el uso de plantas medicinales que puedan ofrecer un tratamiento con medicina natural como alternativa segura, económica y de fácil adquisición sin dañar el equilibrio de la microflora oral.

En nuestro país, existen una diversidad de plantas con propiedades medicinales; algunas con más soporte científico y otras con referencias propiamente culturales. La *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “Tara”, es una planta del Perú, utilizada desde la época prehispánica en la medicina natural.^{5,12} Según Guevara⁶ llegamos a ocupar el primer lugar en la producción de Tara en el mercado mundial; sin embargo, aún no se está aprovechando esta ventaja productiva y las propiedades medicinales de esta planta para mejorar la salud bucal de la población; por lo cual, se condujo este estudio que tuvo como objetivo comprobar *in vitro* la existencia de las propiedades antibacterianas del extracto metanólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze frente a *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) utilizando el método de difusión en pozos; además, se evaluó el efecto citotóxico del extracto frente a células MDCK mediante la prueba de MTT; con la finalidad de tener mayor conocimiento de sus propiedades y crear una línea de investigación enmarcada en la creación de un producto como agente antibacteriano.

En este contexto, se condujeron varios estudios; siendo uno de los primeros López²¹, quién encontró que la tara contiene altas concentraciones de taninos, flavonoides, péptidos y compuestos fenólicos a quienes se les atribuye su efecto antibacteriano; lo cual fue respaldado, en posteriores estudios, conducidos por De la Cruz⁵, Huarino²⁸ y Montenegro²⁹ entre otros; quienes encontraron un porcentaje alto de taninos en las vainas de esta planta en comparación con las hojas y semillas. Además nuestra revisión bibliográfica muestra que las investigaciones realizadas a esta planta presentan el uso de diferentes solventes y concentraciones como es el caso Sampio²⁶ quien utilizó un extracto metanólico evaporado al 80%, con una concentración de 0.5 mg/ul; Iannacone²⁵ utilizó un extracto acuoso con una concentración del 20 %, reportando un efecto no significativo bajo esta concentración. Benites³¹ utilizó un extracto alcohólico con concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100%., Huarino²⁸ y Montenegro²⁹ utilizaron un extracto alcohólico con concentraciones de 75 %; 50 %, 25 %; 12,5 %; 6,25 %, entre otros. Sin embargo Salminen²⁰ reporta que los compuestos fenólicos de la tara presentarían mayor afinidad hacia un solvente de polaridad intermedia (tal como la acetona y metanol).

Basados en estos sustentos científicos, esta investigación utilizó las vainas de *C. spinosa (Molina) Kuntze*, por su alto contenido de taninos a quienes se les atribuye el principio activo de la planta,^{3,5,21} además el extracto se elaboró con metanol evaporado al 70% debido a que este solvente permite extraer la mayoría de los taninos de la planta; con el extracto terminado se evaluaron las propiedades antibacterianas para la cual existen varios métodos; sin embargo, el más utilizado

en los estudios *in vitro* es el de difusión en agar, debido a que sus resultados son altamente reproducibles y se puede realizar a través de discos o pozos^{2,5}.

Las investigaciones realizadas a esta planta utilizaron en su gran mayoría la técnica de difusión en agar con discos, como es el caso de Escobar³, que demostró el efecto antibacteriano del extracto alcohólico de *C. spinosa (Molina) Kuntze* de 25%, 50%, 75% y 100% sobre cultivos de *C. diphtheriae*, encontrando que el promedio de los diámetros de inhibición obtenidos con las diferentes concentraciones ensayadas varía de 34,11 a 43,55 mm, concluyendo que a mayor concentración se evidencia mayor efecto antibacteriano. Asimismo Huarino²⁸ y Montenegro²⁹ evaluaron el extracto alcohólico de *C. spinosa (Molina) Kuntze* sobre flora salival mixta y *Porphyromonas gingivalis* respectivamente, para lo cual ambos utilizaron el método de difusión con discos en concentraciones desde 6,5mg/ml hasta 75 mg/ml obteniendo para la primera investigación halos de inhibición de 12mm hasta 17,6mm, mientras que el segundo encontró halos de 7mm hasta 12.5mm. A pesar de que estos dos autores hicieron investigaciones similares; es decir, utilizaron la misma concentración, solvente y método, pero con especies de bacterias diferentes; sus estudios llegaron a distintas conclusiones; mientras que el primero reporta que a mayor halo, mayor concentración; el segundo menciona que no hay diferencia significativa entre los halos de inhibición y las concentraciones estudiadas. De acuerdo a lo reportado en este estudio y en la mayoría de investigaciones revisadas, se coincide con Huarino²⁸ que; a mayor concentración del extracto mayores halos de inhibición, así mismo los halos de inhibición que se hallaron para *S. mutans* fue 21.6 mm y 20.73 mm

para *S. sanguinis*, este efecto antibacteriano fue superior a los halos de inhibición formados por el control positivo (0.12% Clorhexidina).

Cuadro 1. Comparación del efecto antibacteriano del extracto de *C. spinosa*.

| Autor | Extracto | Bacterias | Método | Conclusiones |
|--------------------------|--|---|---|---|
| Escobar (2008) | <i>Caesalpinia spinosa</i> (Alcohólico) 25%,50%,100% | <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | Difusión con discos | A medida que se aumenta la concentración del extracto, se obtiene un mayor diámetro del halo de inhibición. |
| Huarino (2012) | <i>Caesalpinia spinosa</i> (Alcohólico) 75 % ; 50 % , 25 % ; 12,5 % 6,25 % | Flora mixta salival | Difusión con discos | A mayor concentración mayor halo de inhibición. |
| Montenegro (2015) | <i>Caesalpinia spinosa</i> (Alcohólico) 75 % ; 50 % , 25 % ; 12,5 % 6,25 % | <i>Porphyromonas gingivalis</i> | Difusión con discos | Existe efecto antibacteriano aunque a mayor concentración no se observa aumento del halo de inhibición. |
| Haro (2015) | <i>Caesalpinia spinosa</i> (Alcohólico) | <i>Enterococcus faecalis</i> | Difusión con discos | Este extracto posee un efecto antimicrobiano mayor y prolongado en contraste con el NaOCl 5,25%. |
| Zárate (2015) | <i>Caesalpinia spinosa</i> (Acuoso) | <i>Streptococcus pyogenes</i> | Difusión con discos | El efecto antibacteriano del extracto comparado con amoxicilina presentó una alta sensibilidad y en comparación con cotrimoxazol presentó el mismo efecto. |
| Benites (2016) | <i>Caesalpinia spinosa</i> (Alcohólico) 25%, 50%, 75% y 100%. | <i>Candida albicans</i> | Difusión con discos | El efecto inhibitorio varía al utilizar el extracto a diferentes concentraciones, y este efecto se incrementa en relación directamente proporcional a las concentraciones utilizadas en el estudio. |
| Castro (2017) | <i>Caesalpinia spinosa</i> (Metanólico) 70% | <i>Streptococcus mutans</i> <i>Streptococcus sanguinis</i> | Difusión con pozos Prueba de MTT | -A mayor concentración del extracto mayores halos de inhibición. -El efecto antibacteriano del extracto se mantiene hasta las 48 horas. -El extracto no tiene efecto citotóxico con las concentraciones utilizadas. |

Como puede observarse la mayoría de investigaciones desarrollaron la técnica de difusión con discos; sin embargo, Alvares⁵⁴ y Stella² señalaron que este método tiene algunas desventajas, la más relevante es que el papel filtro Whatman se compone de celulosa, la cual permite que la superficie del disco sea hidrofílica, interviniendo directamente con algunos compuestos de los productos naturales absorbiéndolos en la superficie del disco e impidiendo la difusión. Cruz Carrillo⁵⁵ comparó ambos métodos (disco y pozo), llegando a la conclusión que la técnica con pozos muestra halos de inhibición más grandes. Asimismo otros estudios señalan que la técnica con pozos concentra y difunde mayor cantidad del extracto en el agar dando mejores resultados.^{2,44} Apoyados de estas investigaciones, este estudio utilizó la técnica de difusión en agar con pozos para determinar el efecto antibacteriano del extracto metanólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara” por su mayor precisión y sensibilidad.

No se encontraron estudios realizados a esta planta con el método de difusión con pozos, por este motivo no se ha podido comparar el resultado de los halos de inhibición encontrados en esta investigación.; sin embargo, coincidimos con la mayoría de las investigaciones antes realizadas que señalan la existencia de propiedades antibacterianas del extracto de tara provenientes de la vaina de esta planta y que a mayor concentración del extracto existe un mejor efecto antibacteriano. Esta investigación además encontró que el efecto antibacteriano, se mantiene hasta las 48 horas, siendo este hallazgo un aporte para futuras investigaciones donde se evalué mayores tiempos de inhibición a los observados en esta investigación.

Otra de las metas de este estudio fue determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto, para lo cual se utilizaron los métodos antibacterianos de dilución, los cuales se pueden realizar en agar o caldo. El método de dilución en caldo utiliza tubos o microplacas que contienen concentraciones crecientes del extracto, mientras que la del agar utiliza placas con una determinada concentración del extracto y luego se inoculan los microorganismos.

Cuadro 2. Comparación de la concentración mínima inhibitoria de diferentes extractos

| Autor | Extracto | Método | Concentración | Bacteria | (CMI) |
|----------------------|---|--------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|--------------|
| Añanca (2009) | <i>C. spinosa</i> (Acuoso) | En caldo Con tubos | 17,5ug/ml hasta 6,25 µg/ml | <i>Staphylococcus aureus</i> | 13.7 µg/ml |
| | | | | <i>Streptococcus pyogenes</i> | 16.25µg/ml |
| Sampio (2009) | <i>C. spinosa</i> (Acuoso) | En caldo Con microplacas | 400 hasta 10 ug/ml | <i>Candida albicans</i> , | 25 µg/ml |
| | | | | <i>S. mutans</i> , | 40 µg/ml |
| | | | | <i>S. salivarius</i> , | 66 µg/ml |
| | | | | <i>S.oralis</i> | 100 µg/ml |
| | | | | | |
| Camere (2015) | <i>Myrciaria dubia</i> (Metanolico) | En caldo Con microplacas | 500- 0 µg/ml | <i>S.mutans</i> | 125µg/ml |
| | | | | <i>S. sanguinis</i> | 125µg/ml |
| Merino (2015) | <i>Bixa orellana L.</i> (Metanolico) | En caldo Con microplacas | 500- 0 µg/ml | <i>S.mutans</i> | 31.25µg/ml |
| | | | | <i>S. sanguinis</i> | 125 µg/ml |
| Castro (2017) | <i>C. spinosa</i> (Metanolico) | En caldo Con tubos | 0.25mg/ul hasta 0.004 mg/ul | <i>S.mutans</i> | 0.063mg/ul |
| | | | | <i>S. sanguinis</i> | 0.02 mg/ul |

Se ha reportado que la principal ventaja del uso del método de dilución en caldo radica en un aumento de sensibilidad para cantidades pequeñas, lo cual es de vital importancia al momento de hallar la concentración mínima inhibitoria.² Para este estudio, se utilizó el método de dilución en caldo para determinar la concentración mínima inhibitoria. El caldo con el que se trabajó fue BHI (Brain Heart Infusion), el cual se caracteriza principalmente para el cultivo de microorganismos de difícil crecimiento y microorganismos de crecimiento rápido entre los que se incluyen a bacterias aerobias.⁵⁶

Finalmente, esta investigación tuvo como uno de sus objetivos principales determinar el efecto citotóxico de este extracto para su posterior utilización como colutorio o como agregado en productos que requieran el perfil antibacteriano. Para determinar la citotoxicidad encontramos al ensayo de captación del rojo neutro, el enlazamiento al azul de kenacid y la prueba de MTT (bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico),⁵² los cuales son los métodos más utilizados para esta evaluación. En el presente estudio, se utilizó el ensayo de reducción del MTT debido que es un método simple y se usa para determinar la viabilidad celular, esto es dado por el número de células presentes en el cultivo.^{33,49} El extracto en estudio no fue citotóxico frente a la línea celular MDCK, puesto que su viabilidad celular disminuye al 50% (CC50) a una concentración de 17 mg/ul. Al realizar la búsqueda de estudios sobre el efecto citotóxico de esta planta no se encontró literatura, sin embargo, se encontraron investigaciones de las propiedades antioxidantes de *C. spinosa* concluyendo que esta planta tiene una buena actividad antioxidante en diferentes ensayos in vitro

(DPPH, TEAC, radical hidroxilo, radical superóxido). Sin embargo, encontramos numerosas investigaciones que determinan el efecto citotóxico de otros extractos, entre estos tenemos a Del Valle⁴⁹, Camere³³ y Medina³⁴, quienes evaluaron la citotoxicidad de diferentes extractos metanolicos naturales con el método de MTT y sobre la línea celular de MDCK, calculando la viabilidad celular con el porcentaje de la absorbancia obtenida en cada pocillo versus el control de células no tratadas. Estos valores fueron medidos en un lector de ELISA (Biorad), del mismo modo en este estudio se realizaron procedimientos similares, determinando que la concentración en estudio no es citotóxica, debido a que la CC50 se encontró en la concentración de 17 mg/ul.

Esta investigación confirma la alta actividad antibacteriana de la *Caesalpinea spinosa* (Molina) Kuntze “tara” sobre *S. mutans* y *S. sanguinis*, además señala la concentración máxima que se puede utilizar sin causar daño celular; asimismo, se observó que el efecto antibacteriano se mantiene estable hasta las 48 horas. Lo encontrado, abre un abanico de posibilidades de investigaciones futuras; en las cuales, se puedan evaluar el efecto de esta planta en diferentes tiempos para ver la estabilidad del mismo, además observar qué tipo de efecto antibacteriano tiene sobre estas bacterias puesto que es de suma importancia no dañar biofilm, que como sabemos tiene un efecto protector sobre el huésped; para así continuar con estudios que permitan conducir a la innovación con el desarrollo de un nuevo producto como agente antibacteriano, con mejores efectos, menor costo gracias a la ventaja productiva de esta planta en nuestro país y con la seguridad de no causar daño a la salud de población.

IX. CONCLUSIONES

1. El extracto metanólico de *Caesalpineia spinosa* Molina (Kuntze) presentó efecto antibacteriano para *Streptococcus mutans* con una media de 25.6 mm de halos de inhibición y para *Streptococcus sanguinis* de 21.6 mm a las 24 horas. Mantuvo el efecto hasta 48 horas, sin cambios significativos.
2. La concentración mínima inhibitoria del extracto para *Streptococcus mutans* fue de 0.063 mg/ul y para *Streptococcus sanguinis* fue de 0.02 mg/ul.
3. El extracto metanólico de *Caesalpineia spinosa* (Molina) Kuntze presentó mayores halos de inhibición que Clorhexidina al 0.12% frente a *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis* con una media de 25 mm y 21 mm respectivamente a las 24 y 48 horas.
4. El extracto metanólico de *Caesalpineia spinosa* (Molina) Kuntze no presenta citotoxicidad en la concentración de 0.5 mg/ul la cual fue analizada en esta investigación.
5. El extracto metanólico de *Caesalpineia spinosa* es citotóxico a partir de la concentración de 17 mg/ul.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Signoretto C, Bianchi F, Burlacchini G, Sivieri F, Spratt D, Canepari P. Drinking habits are associated with changes in the dental plaque microbial community. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(2):347-56.
2. Stella L, Marin D. Methodologies for evaluating the In vitro antibacterial activity of natural compounds of plant origin. *Rev Scientia Technica.* 2009; 42:263-68.
3. Escobar L, Chávez M. Effect of alcoholic extract of *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze on the *Corynebacterium diphtheriae* viability. *Rev Med Vallejana.* 2008; 5 (1):28-35.
4. Bussmann R, Glenn A, Sharon D, Chait G, Díaz D, Pourmand K, et al. Proving that Traditional Knowledge Works: The antibacterial activity of Northern Peruvian medicinal plants. *J Ethnobiol Ethnomed.* 2011; 9:67-96.
5. De la Cruz P. Aprovechamiento Integral y Racional de la tara *Caesalpinia spinosa*. *Rev. Inst. investig. Fac. minas metal cienc. Geogr.* 2004; 7(14):31-5.
6. Guevara J, Guevara J, Guevara D, Béjar V, Huamán A, Valencia A, et al. Evaluación del cocimiento de diferentes biovariedades de *Caesalpinia spinosa* (tara) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* sensibles y resistentes a Oxacilina. *An Fac med.* 2014; 75(2):177-80.
7. Kleryson F. Fitoterapy: An option in odontological treatment. *Rev Saúde* 2010; 4(1): 18- 24.

8. Pamo O. Características de los trabajos publicados sobre las propiedades de las plantas en revistas médicas peruanas. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2009; 26(3): 314-23.
9. Colvard M, Cordell G, Villalobos R, Sancho G, Soejarto D, Pestle W, et al. Survey of medical ethnobotanicals for dental and oral medicine conditions and pathologies. *J Ethnopharmacol*. 2006; 107: 134-142.
10. Calixto M. Plantas medicinales usadas en odontología Parte I. *Kiru*. 2006; 3(2): 80-5.
11. Bussmann R, Glenn A, Meyer K, Kuhlman A, Townesmith A. Herbal mixtures in traditional medicine in Northern Perú. *J Ethnobiol Ethnomed*. 2010; 6:1-10.
12. López A, Oré R, Miranda C, Trabucco J, Orihuela D, Linares J, et al. Capacidad antioxidante de poblaciones silvestres de “tara” (*Caesalpinia spinosa*) de las localidades de Picoy y Santa Fe (Provincia de Tarma, departamento de Junín). *Scientia Agropecuaria*. 2011; 2: 25-29.
13. Castro N, Yépez A, Abram A. Comparación de tres métodos para determinar el porcentaje de taninos con el método de la norma ASTM D6401 aplicado para la “Tara”, “Quinual”, “Mimosa” y “Pino”. *Rev Soc Quím Perú*. 2013; 79(4):381-7.
14. Balaguer L, Arroyo R, Jimenez P, Dolores M, Villegas L, et al. Forest Restoration in a Fog Oasis: Evidence Indicates Need for Cultural Awareness in Constructing the Reference. *Plos One*. 2011; 6(8): 1-9.
15. Greulach A, Adams J. *Las plantas: Introducción a la botánica moderna*. 3ra ed. México DF. LIMUSA. 2000:60.

16. Kondo K, Takaishi Y, Shibata H, Higuti T. Ilsmrs (Intensifier of beta-Lactam Susceptibility in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*) from Tara *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze. J Phytomedicine 2006; 13:209-12.
17. Siccha A, Lock O, Molina M. Determinación Cuantitativa de Galactomananos en las Gomas de Tara, Charán y Uña de Gato, por Cromatografía de Gases. Bol Soc Quim del Perú. 1994; 39-43.
18. Santander S, Aoki M, Hernandez J, Pombo M, Moins-Teisserenc M, Mooney N, et al. Galactomannan from *Caesalpinia spinosa* induces phenotypic and functional maturation of human dendritic cells. J Immunopharmacol. 2011; 2: 652-60.
19. Villanueva C. La tara Oro Verde de los Incas. 1° ed. Lima: AGRUM; 2007.
20. Salminen, J. Effects of sample drying and storage, and choice of extraction solvent and analysis method on the yield of Birt leaf hydrolysable tannins. J. Chem. Ecol. 2003; 29: 1289-130.
21. Lopez F. Acción antimicrobiana *Caesalpinia tintórea* (Molina) Kuntze o Tara de diferentes regiones del Perú. Rev CLEIBA. 1998; 1(1):27-31.
22. Liu H, Lengual L, León G, La Torre C, Huapaya J, Chauca J. Evaluación de la Actividad Antibacteriana *in vitro* de los Extractos de *Caesalpinia spinosa* “tara” y *Eucalyptus sp.* “eucalipto”. Rev Horiz Med. 2002; 2(1-2):40-44.
23. Ferreira J, Cardoso M, Estevao De Souza P. Inhibitory Effect of *Caesalpinia spinosa* Leaflets Crude Extract of *Fusarium solani* and *Phoma tarda*. J Scient Biolgl. 2005; 27(2): 185-188.

24. Kloucek P, Polezny Z, Svobodova B, Vlkova E, Kokoska I. Antibacterial Screening of Some Peruvian Medicinal Plants Used in Callería District. *J of Ethnopharmacol.* 2005; 99(2):309-312.
25. Iannacone J, Ayala H, Román A. Efectos Toxicológicos de Cuatro Plantas sobre el Gorgojo del Maíz *Sitophilus zeamais* Motschlsky y sobre el Gorgojo de las Galletas *Stegobium paniceum* en Perú. *Rev Gayana.* 2005; 69(2):234-240.
26. Sampio C. In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. *J. Ethnopharmacol.* 2009; 124(2):289-294.
27. Añanca E. Efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso de vainas de *Caesalpinia spinosa* (tara) en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. [Tesis para optar el Título de Químico Farmacéutico]. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna, 2009.
28. Huarino M. Efecto Antibacteriano de *Caesalpinia Spinosa* (Tara) Sobre Flora Saliva Mixta. [Tesis para optar el Título de Cirujano Dentista]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, 2011.
29. Montenegro A. Actividad antibacteriana de *Caesalpinia spinosa* (tara) sobre *Porphyromonas gingivalis*. [Tesis para optar el Título de Cirujano Dentista]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, 2014.
30. Haro R. Estudio in vitro de la eficacia antibacteriana entre el extracto alcohólico de *Caesalpineia spinosa* (Tara) al 100% e Hipoclorito de Sodio al 5,25% sobre *Enterococcus faecalis* [Tesis para optar el Título de Cirujano Dentista]. Universidad Central del Ecuador. Quito, 2015.

31. Benites C. Efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (Tara) sobre *Candida albicans* ATCC 90028. [Tesis para optar el Título de Médico Cirujano]. Universidad Privada Antenor Orrego. Trujillo, 2015.
32. Zarate A. Efecto in vitro antibacteriano del extracto acuoso de *Caesalpinia spinosa* “Tara” sobre cepas de *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* aisladas de pacientes del Hospital Regional Docente de Trujillo en el año 2014. Rev. Pueblo cont. 2015;26 (1):15-23.
33. Camere R. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano y citotóxico del extracto metanólico de semilla y pulpa de la *Myrciaria dubia* (camu camu) sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556). [Tesis para optar el Título de Cirujano Dentista]. Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas. Lima, 2015.
34. Medina D. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano y citotóxico del extracto metanólico de *Bixa orellana* L. (achiote) sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556). [Tesis para optar el Título de Cirujano Dentista]. Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas. Lima, 2015.
35. Liébana J. Microbiología Oral. 2^a ed. Madrid: Mc Graw-Hill; 2002.
36. Nakano K, Inaba H, Nomura R, Nemoto H, Takeda M, Yoshioka H, Matsue H, Takahashi T, Taniguchi K, Amano A and Ooshima T. Detection of Cariogenic *Streptococcus mutans* in Extirpated Heart Valve and Atheromatous Plaque Specimens. J. Clin. Microbiol. 2006; 44(9): 3313–17.

37. Palomer L. Caries dental en el niño. Una enfermedad contagiosa. *Rev chil pediatr.* 2006; 77(1): 56-60.
38. Negroni. *Microbiología estomatológica. Fundamentos y guía práctica* 2a ed. Buenos Aires, Argentina: Panamericana; 2009. p 237-9.
39. Marsh P. Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. *BMC Oral Health.* 2006; 6(1):14.
40. Lemos J, Burne R. A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiology.* 2008; 154(11): 3247-55.
41. Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res.* 2008; 42(6):409-18.
42. Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Chabert A, Jackson E, Arthaud C, Garraud O, McNicol A. *Streptococcus sanguinis*-induced cytokine and matrix metalloproteinase-1 release from platelets. *BMC Immunology.* 2014; 15 (1):1-13.
43. Koneman E. *Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas en color.* 6° ed. Buenos Aires: Panamericana; 2008.
44. Montoya H. *Microbiología básica para el área de la salud y afines.* 2da ed. Bogota: Universidad de Antioquia 2008. 222.
45. Lee T, Hu C, Lee S, Chou M, Chang Y. Cytotoxicity of chlorhexidine on human osteoblastic cells is related to intracellular glutathione levels. *J Int Endod* 2010; 43: 430–35.
46. Bascones Martínez A, Mudarra Morante S, Perea Pérez E. Antisépticos en el tratamiento de la enfermedad periodontal. *Av Periodon Implantol.* 2002; 14(3): 101-114.

47. Silva de Freitas F, Braga J, Garcia S, Amaral R. Effect of chlorhexidine gel containing saccharin or aspartame in deaf children highly infected with mutans streptococci. *Braz J Oral Sci.* 2011, 10 (1): 7-11.
48. Iwona Zwolak. Comparison of five different in vitro assays for assessment of sodium metavanadate cytotoxicity in Chinese hamster ovary cells (CHO-K1 line). *Toxicol Ind Health.* 2015. 31(8): 677–90.
49. Del Valle J, Pumarola T, Alzamora L. Antiviral activity of maca (*Lepidium meyenii*) against human influenza virus. *Asian Pac J Trop Med.* 2014; 7(1): 415-20.
50. Anand G, Ravinanthan M, Basaviah R, Shetty A. In vitro antimicrobial and cytotoxic effects of *Anacardium occidentale* and *Mangifera indica* in oral care. *J Pharm Bioallied Sci.* 2015; 7(1): 69-74.
51. Reinecke S, Helling B. Lysosomal response of earthworm (*Eisenia foetida*), coelomocytes to the fungicide copper oxychloride and relation to life-cycle parameters. *Environ Toxicol Chem.* 2002; 21:26-31.
52. Lodish H, Berk A, Zipursky L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Biología Celular y Molecular.* 4 ed. New York: Freeman and Company; 2002.
53. Vega M, Verde J, Cárdenas A, Morales A, Núñez M, Rivera M, Serrano L, Rivas C. Actividad antibacteriana y citotóxica de *Leucophyllum frutescens* (Berl) I.M. Johnston del Norte de México contra *Staphylococcus aureus* de aislados clínicos. *Rev Mex Cienc Farm.* 2013; 44 (2):24-30.
54. Alvarez M, Izasa M, Echeverry H. Efecto antibacteriano in vitro de *Austrocyathium inulaefolium* H.B.K (*Salvia amarga*) y *Ludwigia polygonoides*. *Biosalud.* 2005; 14:46-55.

55. Cruz-Carrillo A, Rodríguez N, Rodríguez C. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*. Rev. U.D.CA Act & Div. Cient 2010; 13 (2): 117-24.
56. Seth A, Wilkinson A. A comparison of brain heart infusion blood agar sterilized by filtration and heat on the growth of *Nisseria gonorrhoeae*. J Clin Pathol 1976; 29 (12): 1091-93.

XI. ANEXOS

Figura 1. *CAESALPINIA SPINOSA MOLINA (KUNTSE)*



C. spinosa (Árbol)

Fuente: <http://www.elhogarnatural.com/Arboles/Caesalpinia1.jpg>



C. spinosa (vaina y semillas)

Fuente: <http://img.webme.com/pic/d/davidmauriciog/tara47.jpg>

Figura 2. OBTENCIÓN DE *CAESALPINIA SPINOSA*



Comprado en supermercado



Registro sanitario y fecha de vencimiento

Figura 3. LIMPIEZA Y SEPARACIÓN DE *C. SPINOSA*



Lavado de Tara con agua destilada



Secado a temperatura Ambiente



Separación de vainas y semillas

Figura 4. ELABORACIÓN DEL EXTRACTO DE *C. SPINOSA MOLINA (KUNTZE)*



Pesado del polvo de *Caesalpinia spinosa* Molina (Kuntze)



Colocación del metanol al polvo de *C. spinosa* Molina (Kuntze)

Figura 5. FILTRADO Y EVAPORIZACIÓN DEL EXTRACTO



Proceso de filtrado



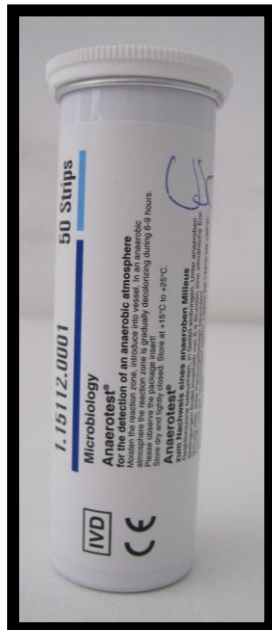
Evaporación del metanol

Figura 6. EXTRACTO METANÓLICO DE *CAESALPINIA SPINOSA MOLINA (KUNTZE)*

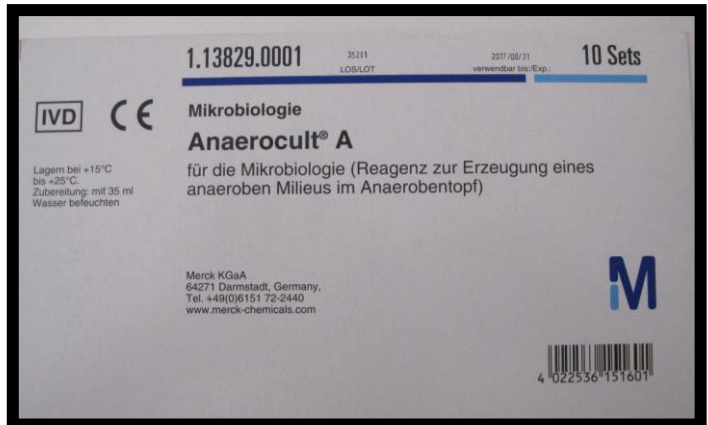


Extracto sólo de las vainas de *Caesalpinia spinosa* Molina (Kuntze)

Figura 7. PRINCIPALES MATERIALES PARA REALIZAR LA INVESTIGACIÓN



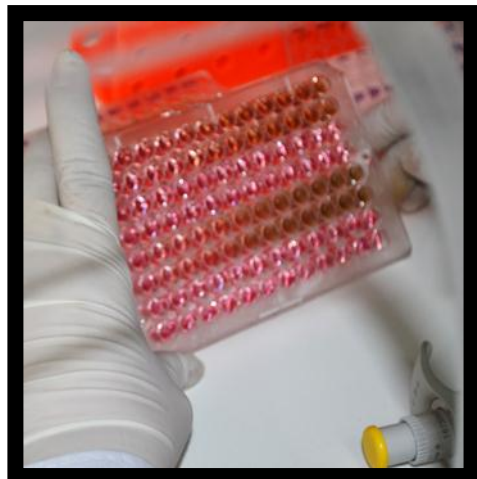
Anaerotest



Anaerocult A



Placa Petri



Microplaca

Figura 8. EQUIPOS PARA REALIZAR LA INVESTIGACIÓN



Cabina de flujo laminar
Tipo III



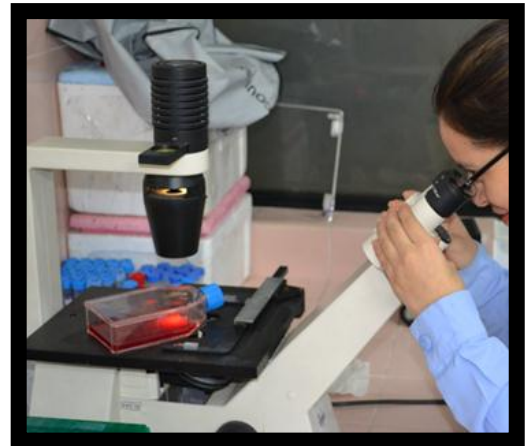
Incubadora y jarra de
anaerobiosis



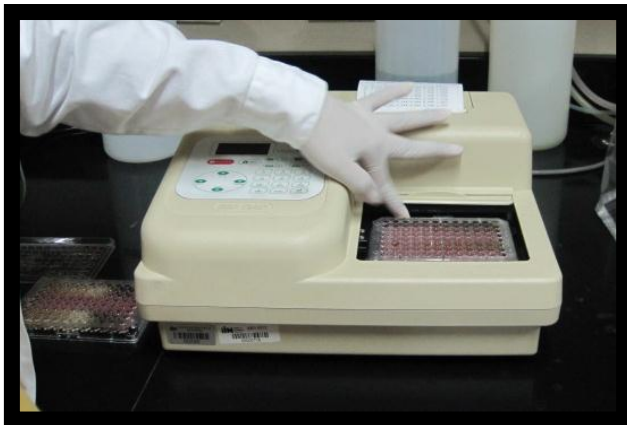
Cabina de flujo laminar
tipo II



Incubadora



Microscopio



Lector de ELISA (Biorad)

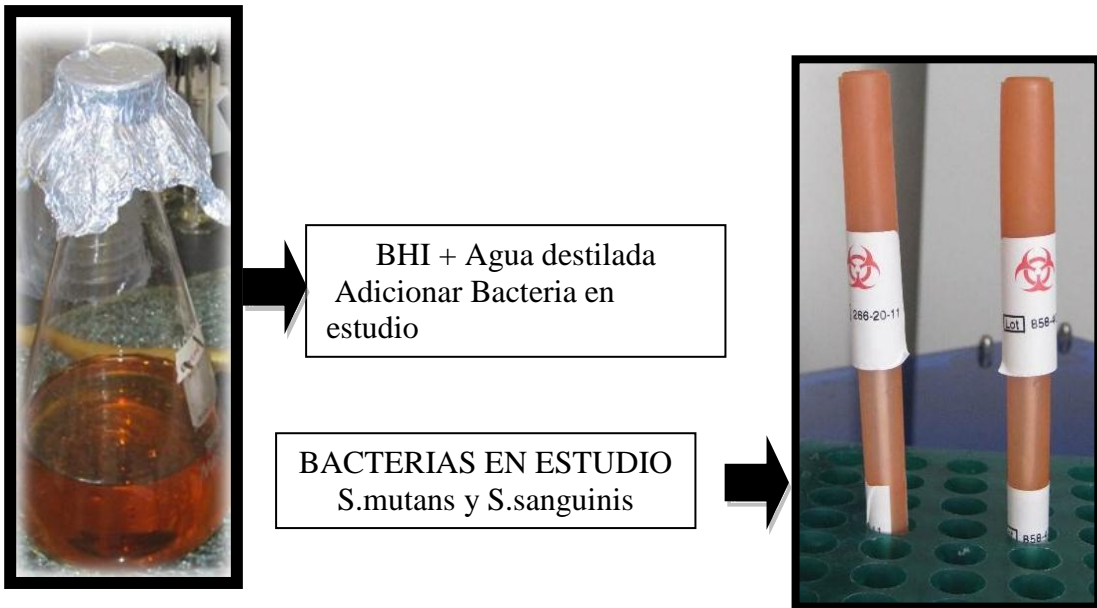


Autoclave

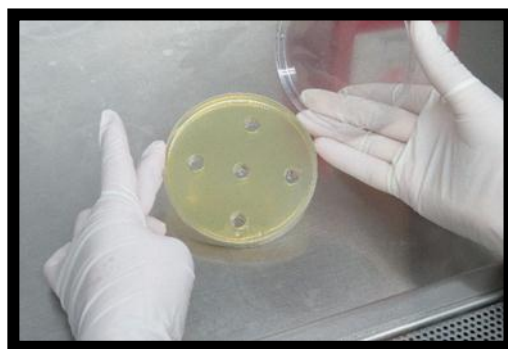


Balanza digital

Figura 9. PREPARACION DE PLACAS PARA EVALUAR EL EFECTO ANTIBACTERIANO Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA



Plaqueado y Secado en Cabina de flujo laminar tipo II



Preparación de pocillos (9 mm)

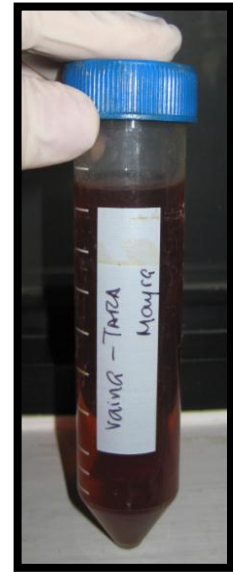
Figura 10. PRUEBA DEL EFECTO ANTIBACTERIANO



CONTROL (-)



CONTROL (+)



EMCS



Colocación de sustancias de estudio

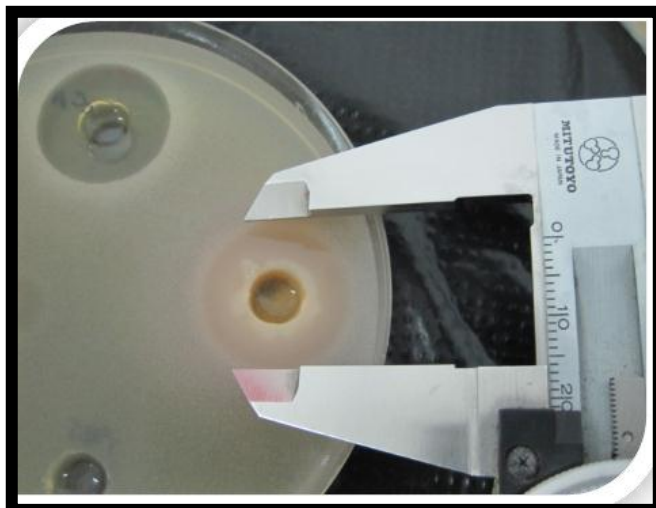
Campana de anaerobiosis +
Anaerocult + Anaerotest
a 37°C



Figura 11. MEDICIÓN DE HALOS DE INHIBICIÓN A LAS 24 Y 48 HORAS



Streptococcus mutans



Streptococcus sanguinis

Figura 12. EFECTO ANTIBACTERIANO: *Streptococcus mutans*

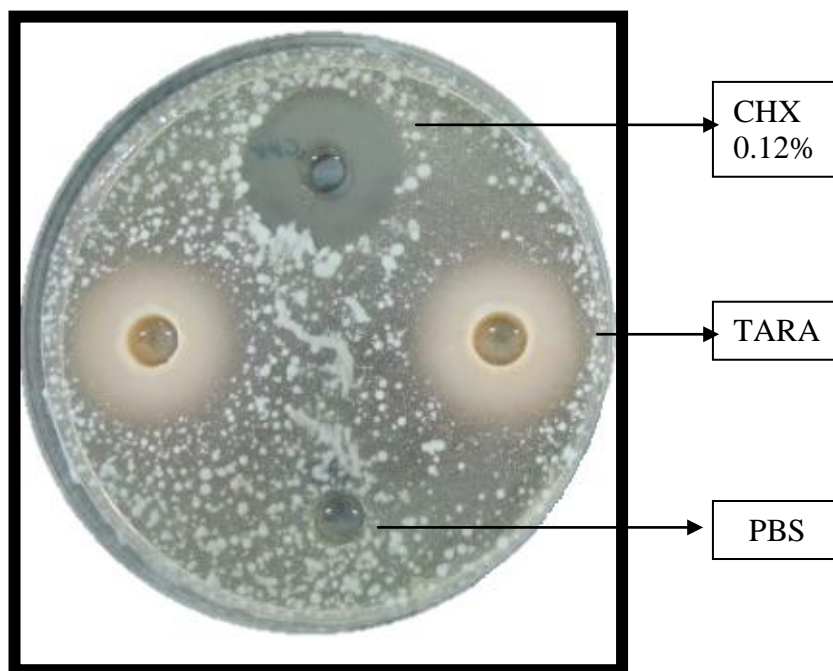
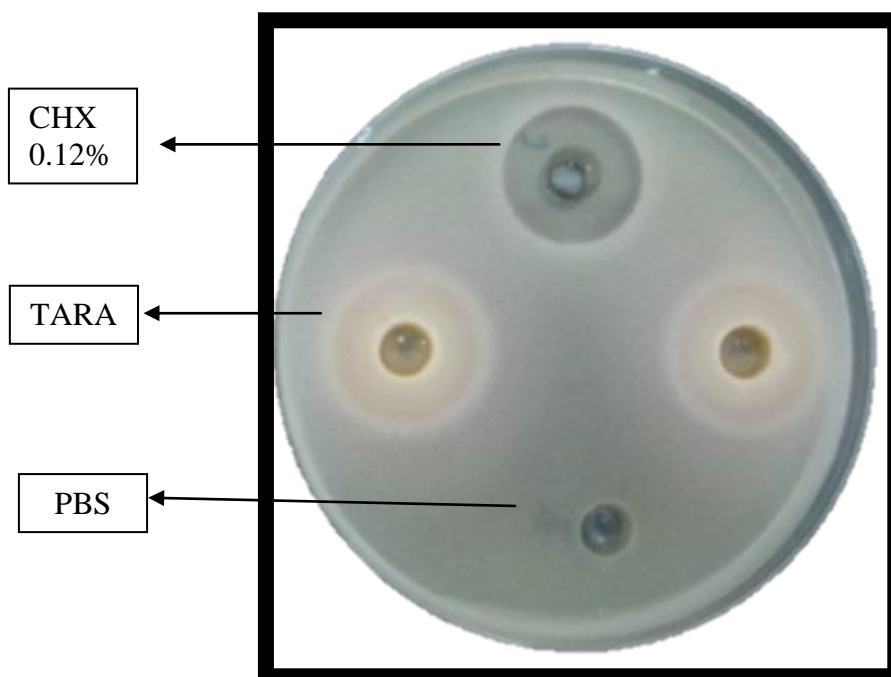


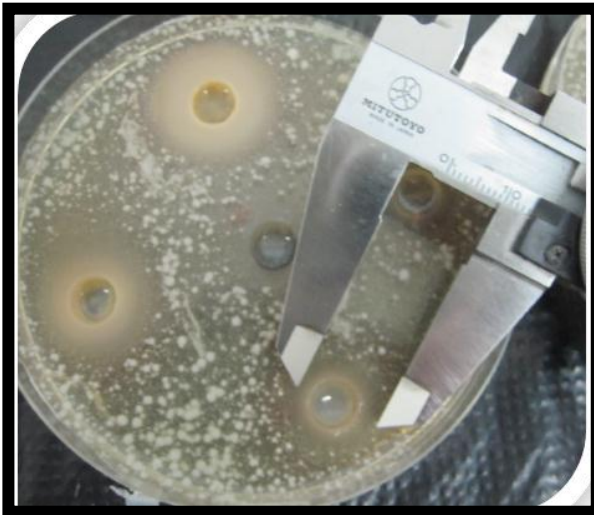
Figura 13. EFECTO ANTIBACTERIANO: *Streptococcus sanguinis*



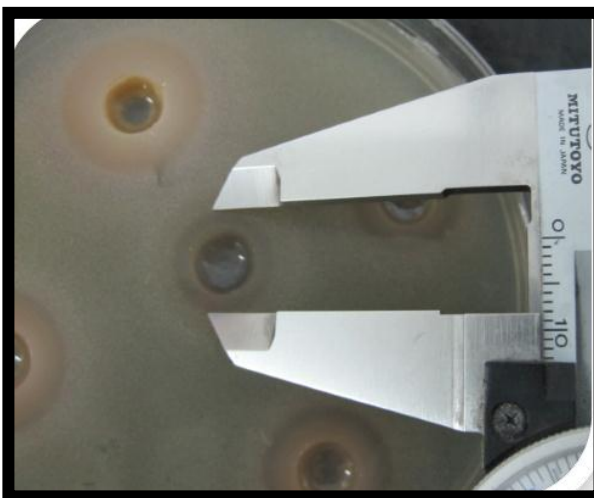
CAMPANA DE
ANAEROBIOSIS +
ANAEROCULT +
ANAEROTEST A 37°C



Figura 15. MEDICIÓN DE HALOS DEL MIC A LAS 24 Y 48 HORAS



Streptococcus mutans



Streptococcus sanguinis

Figura 16. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (*S. mutans*)

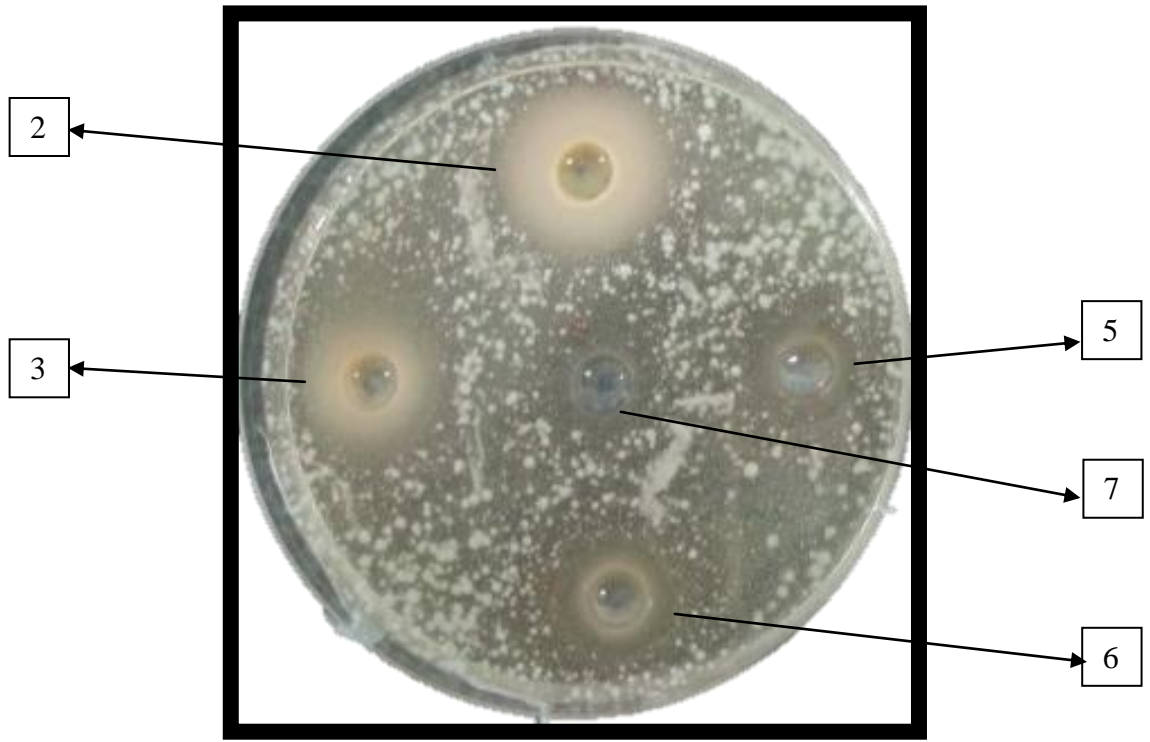


Figura 17. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (*S. sanguinis*)

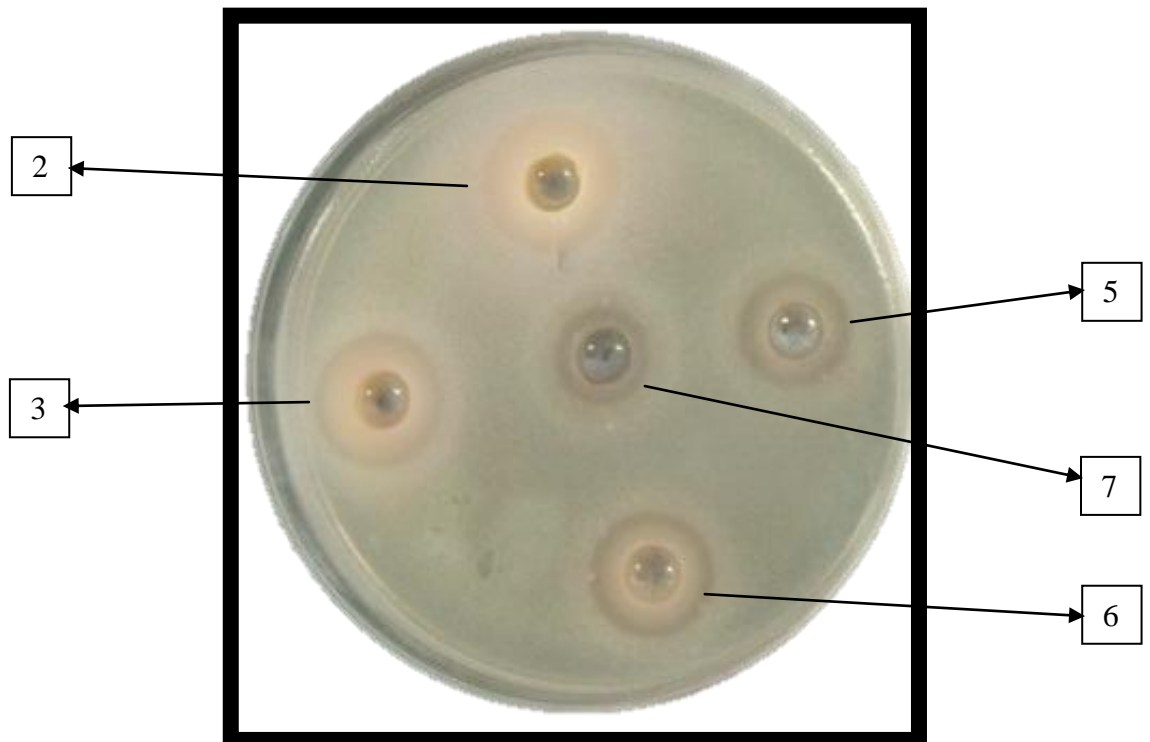


Figura 18. VERIFICACIÓN DE LA CONCENTRACION MÍNIMA INHIBITORIA

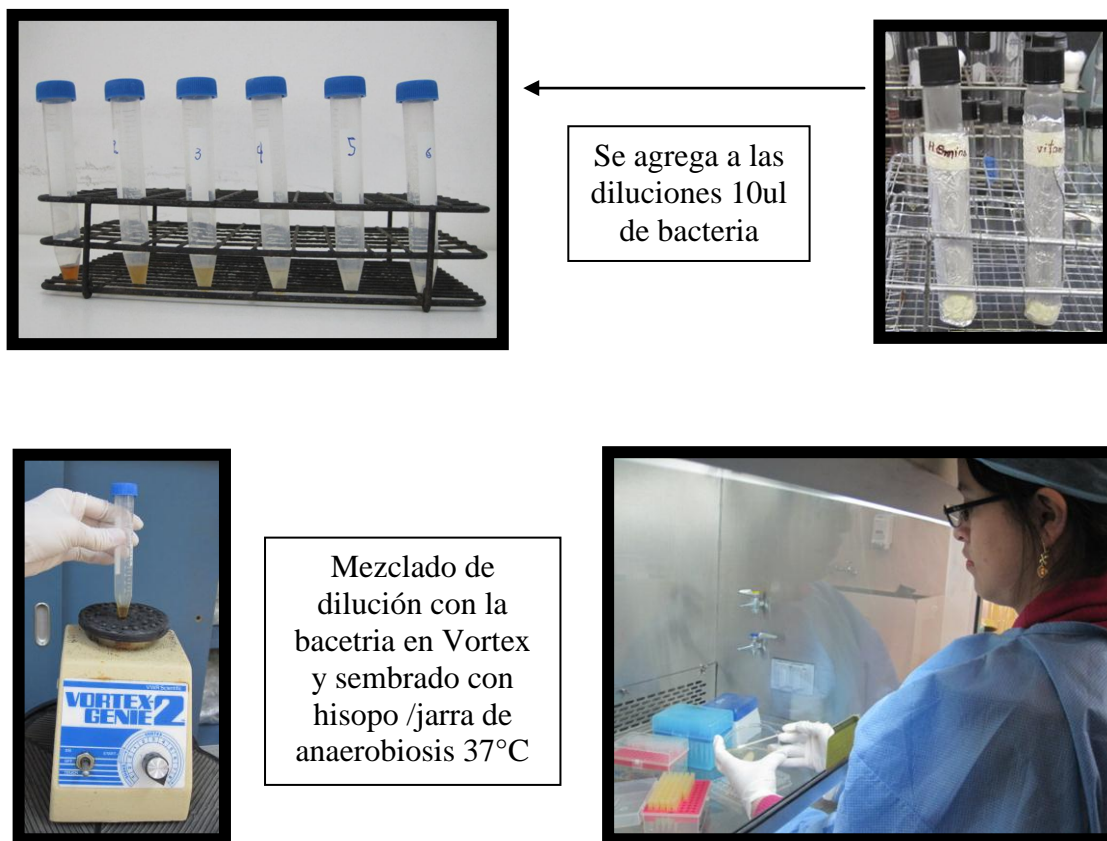
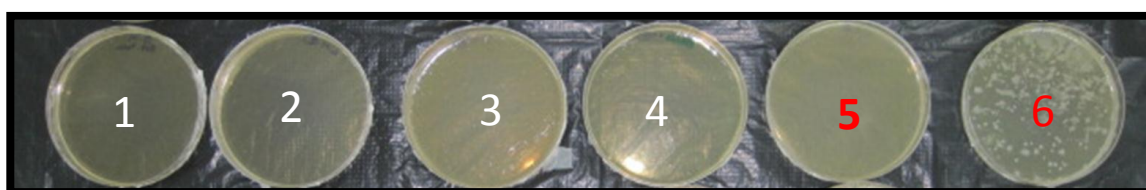


Figura 19. CONTEO DE COLONIAS A LAS 24 Y 48 HORAS (*S. mutans*)



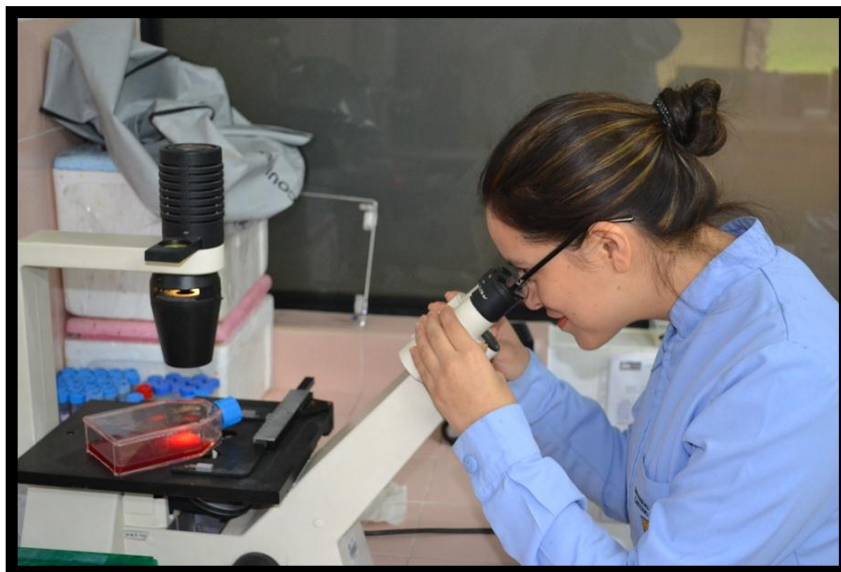
Presencia de bacteria en la dilución 5 y 6

Figura 20. CONTEO DE COLONIAS A LAS 24 Y 48 HORAS (*S. sanguinis*)

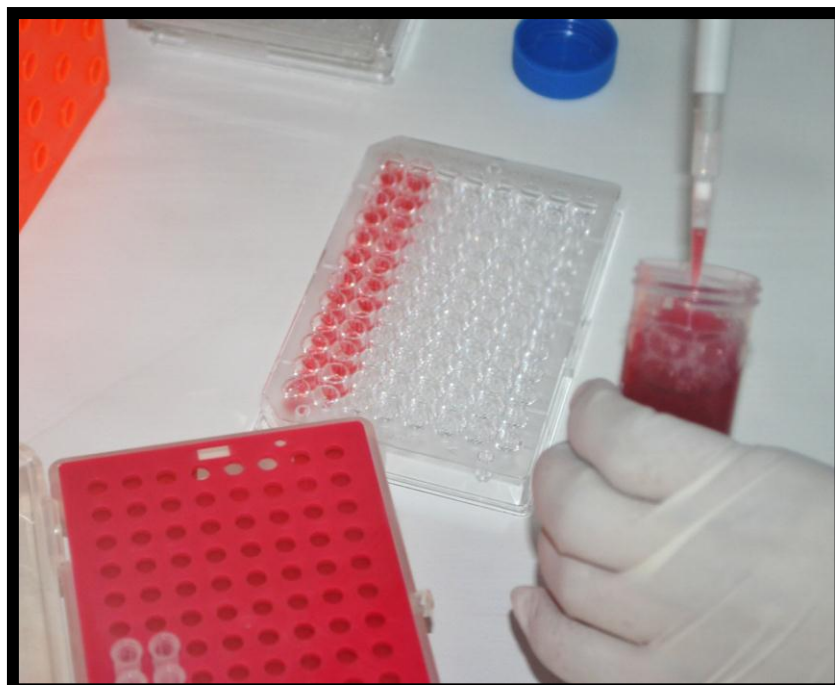


Presencia de bacteria en la dilución 7 y 8

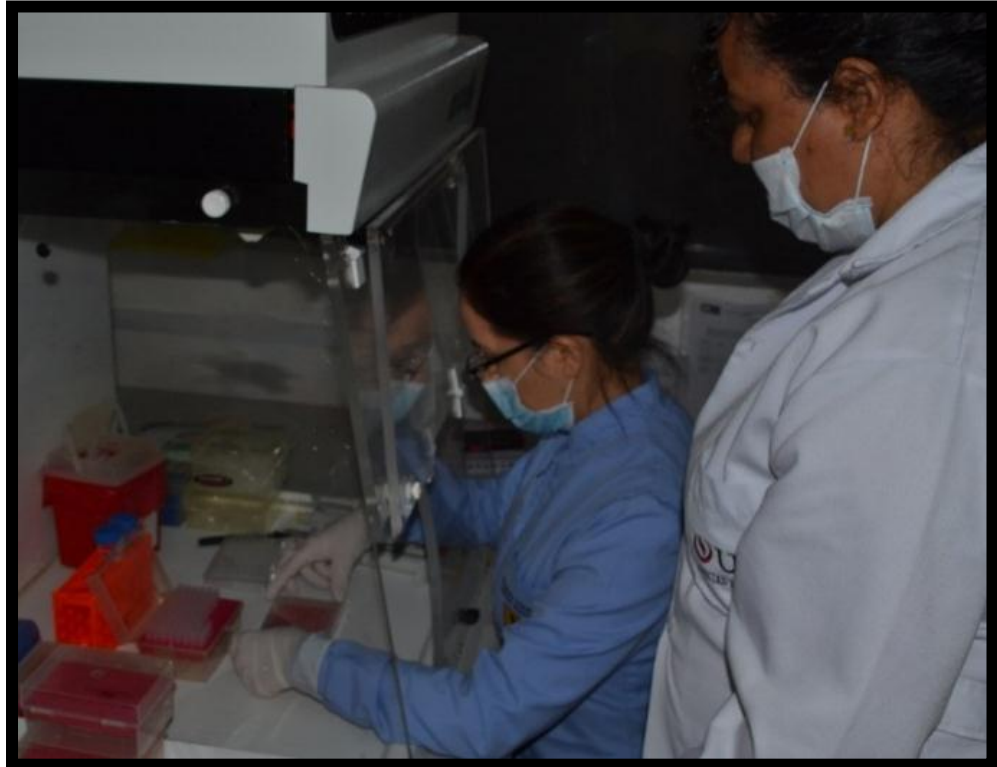
Figura 21. CITOTOXICIDAD DEL EXTRACTO DE *C. SPINOSA*



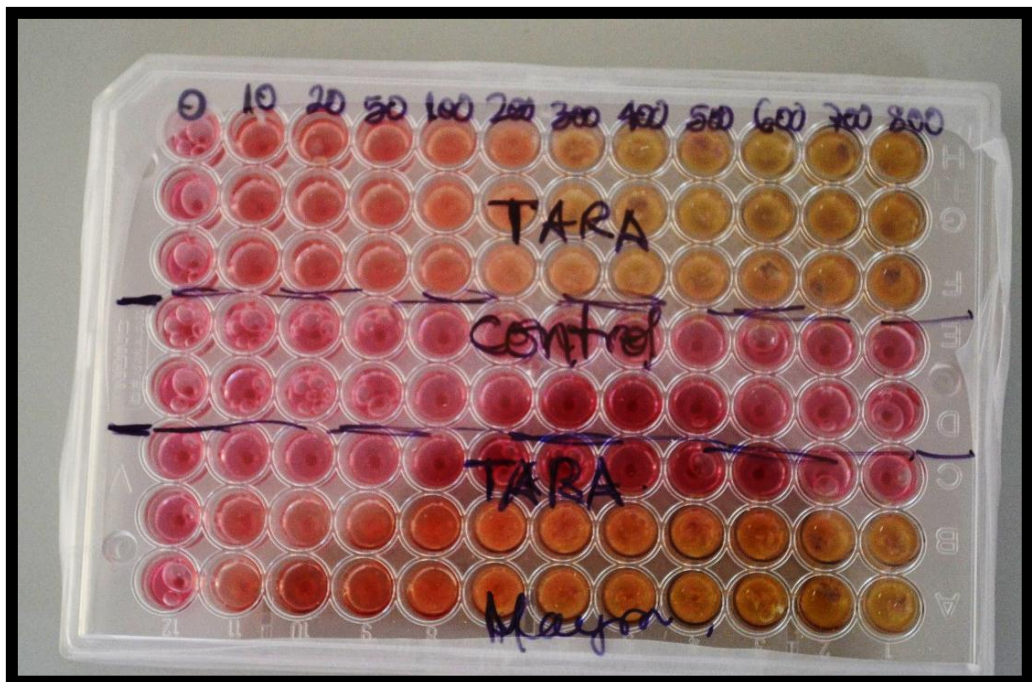
Viabilidad celular



Cultivaron 1×10^4 células/pocillo 200 μ L de medio



Colocación de diluciones del extracto de *C.spinosa*



Microplaca de 96 pocillos con el extracto y control

Figura 22. INCUBACIÓN Y LECTURA DE MICROPLACA



Lectura de citotoxicidad en Lector de ELISA (Biorad)

Caesalpinia spinosa 0.5mg/ul

Bacteria: *Streptococcus mutans* ATCC 25175

| PLACA PETRI | 24 HORAS | | | 48 HORAS | | |
|----------------|--------------|-----|------|--------------|-----|------|
| | CHX 0.12% | PBS | EMCE | CHX 0.12% | PBS | EMCE |
| 1 | | | | | | |
| 2 | | | | | | |
| 3 | | | | | | |
| 4 | | | | | | |
| 5 | | | | | | |
| 6 | | | | | | |
| 7 | | | | | | |
| 8 | | | | | | |
| 9 | | | | | | |
| 10 | | | | | | |
| 11 | | | | | | |
| 12 | | | | | | |
| 13 | | | | | | |
| 14 | | | | | | |
| 15 | | | | | | |
| 16 | | | | | | |
| 17 | | | | | | |
| 18 | | | | | | |
| 19 | | | | | | |
| 20 | | | | | | |

Caesalpinia spinosa 0.5mg/ul
10556)

Bacteria: *Streptococcus sanguinis* (ATCC

| PLACA PETRI | 24 HORAS | | | 48 HORAS | | |
|----------------|--------------|-----|------|--------------|-----|------|
| | CHX 0.12% | PBS | EMCE | CHX 0.12% | PBS | EMCE |
| 1 | | | | | | |
| 2 | | | | | | |
| 3 | | | | | | |
| 4 | | | | | | |
| 5 | | | | | | |
| 6 | | | | | | |
| 7 | | | | | | |
| 8 | | | | | | |
| 9 | | | | | | |
| 10 | | | | | | |
| 11 | | | | | | |
| 12 | | | | | | |
| 13 | | | | | | |
| 14 | | | | | | |
| 15 | | | | | | |
| 16 | | | | | | |
| 17 | | | | | | |
| 18 | | | | | | |
| 19 | | | | | | |
| 20 | | | | | | |

