

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
UNIDAD ACADÉMICA DE ODONTOLOGÍA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



EFFECTO ANTIMICROBIANO *in vitro* DE EXTRACTOS DE HOJAS DE
***Cnidocolus chayamansa* McVaugh CONTRA CEPA DE REFERENCIA DE**
Streptococcus mutans

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN ODONTOLOGÍA

Presenta:

DAVID RAFAEL CORTÉS CARRILLO

Directores de Tesis

M.S.P. SAÚL HERNÁN AGUILAR OROZCO

DRA. EUGENIA DEL SOCORRO GUZMÁN MARÍN

Tepic, Nayarit, diciembre de 2010



DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION

Tepic, Nayarit, 6 de diciembre de 2010.
Oficio No.142/10.

C.D. Cortes Carrillo David Rafael
Candidato a Maestro en Odontología
Presente.

En virtud de haber recibido información de los revisores asignados por esta Comisión acerca de que el trabajo de tesis de Maestría titulado: **Efecto antimicrobiano in vitro de extractos de hojas de Cnidocolus chayamansa McVaugh contra cepa de referencia de Streptococcus mutans**, en la cual participan como Directores: M.S.P. Saúl Hemán Aguilar Orozco y Dra. Eugenia Guzmán Marín, ha sido revisada y se han extendido en forma escrita las recomendaciones que ellos han considerado necesarias, en nuestra calidad de cuerpo colegiado, estamos otorgando autorización para que se proceda a la impresión de dicho trabajo.

Una vez concluidos los trámites administrativos correspondientes, le serán notificados lugar, fecha y hora, donde se llevará a cabo el examen de grado defendiendo su tesis con réplica oral.

ATENTAMENTE
"POR LO NUESTRO A LO UNIVERSAL"

M.C. Rogelio Díaz Peña

Por la Comisión Asesora Interna de la División de Estudios
de Posgrado e Investigación.



C.c.p.- Interesado
C.c.p.- Archivo

"Aunque esta tesis hubiese servido para exámen de grado y hubiese sido aprobado por el sínodo, solo el autor es responsable de doctrinas emitidas en ella."

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a Dios por la gran oportunidad que me dio para aprender y crecer tanto a nivel profesional como personal durante estos dos años.

Agradezco a la Unidad Académica de Odontología de la Universidad Autónoma de Nayarit que me brindó la oportunidad para realizar estudios de maestría. A los maestros Saúl Aguilar Orozco y Yadira Aguilar Orozco por su invaluable apoyo, comprensión y por compartir sus conocimientos y sobre todo su amistad con cada uno de nosotros.

Asimismo agradezco los maestros José Luis Villamil Urzaiz, Celia del Carmen Godoy Montañez y al Dr. Florencio Rueda Gordillo; autoridades de mi Facultad por todas las facilidades y apoyo que me brindaron para alcanzar esta meta.

A la Dra. María del Socorro Marín Guzmán y a la Maestra Sandra Hernández Solís les agradezco mucho su paciencia e interés al guiarme en este proyecto.

A mi madre un ser excepcional que a pesar de sus limitaciones, siempre estuvo en el momento y en el lugar preciso para iluminarme con sus consejos y que fueron el motor que impulsaba mi rumbo y me daban dirección en momentos difíciles

A José, Lupita y Laura gracias por estuvieron siempre dispuestos a compartir conmigo su apoyo y comprensión, siempre les estaré agradecido. Que Dios los bendiga

A ti Marina gracias por estar conmigo en las buenas y en las malas, por dar mucho de ti con tus consejos y tu apoyo incondicional. Gracias por creer en mí.

A Silvia te agradezco todo tu afecto, ayuda y tu tiempo que disponías para escucharme, aconsejarme para no darme por vencido.

A todos, muchas Gracias

Este trabajo se realizó en el Dpto. de Investigación en Microbiología Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán, haciendo uso de sus instalaciones, material y equipos, bajo la dirección de la M en C. Sandra Elena Hernández Solís..

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* de extractos metanólico y acuoso de hojas de *Cnidocolus chayamansa* McVaugh contra la cepa de referencia de *Streptococcus mutans* con el fin de proponer alternativas de bajo costo y de origen natural que permitan disminuir la caries dental en poblaciones de alto riesgo.

El diseño del estudio realizado fue de tipo descriptivo, prospectivo, longitudinal y experimental. La muestra fue la cepa de referencia de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).

Las variables estudiadas son el crecimiento de la cepa de referencia de *Streptococcus mutans* y las concentraciones de los extractos metanólico y acuoso de *Cnidocolus chayamansa*.

Como grupo testigo se consideró la cepa de *Streptococcus mutans* tratada con gluconato de clorhexidina a una concentración de 0.12 mg/mL y como control negativo el medio de crecimiento bacteriano de infusión cerebro corazón (BHI).

Los bioensayos se realizaron con la técnica de microdilución; prueba estandarizada por la Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), empleando diluciones seriadas de los extractos de *Cnidocolus chayamansa* que se retaron con el inóculo bacteriano estandarizando a una turbidez equivalente al 0.5 del nefelómetro de MacFarland.

Los resultados obtenidos en el presente estudio y de acuerdo con los procedimientos y las diluciones del extracto utilizado, se observó que el extracto acuoso con diluyentes agua y buffer de fosfatos (BPS) no inhibieron el crecimiento y desarrollo del *Streptococcus mutans* sin embargo, sí se observó inhibición de la cepa cuando se pusieron en contacto con el extracto metanólico con diluyente metanol y gluconato de clorhexina por ser elementos de alta molaridad.

Debido al efecto negativo de inhibición del extracto acuoso con diluyente agua y PBS, no permitió el análisis estadístico. Sin embargo el análisis se efectuó cualitativamente.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO	Página
I. INTRODUCCIÓN	3
II. MATERIAL Y MÉTODOS	19
III. RESULTADOS	31
IV. DISCUSIÓN	32
V. CONCLUSIONES	35
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
VII. ANEXOS	40

I. INTRODUCCIÓN

Planteamiento del problema

La boca generalmente presenta una microflora abundante, con una variedad de especies y formas que tienen su asentamiento en la placa dentobacteriana que se deposita en todas las superficies dentarias y mucosas de la cavidad bucal.

Entre las bacterias presentes en la microflora que originan las patologías bucales más comunes como la caries y la enfermedad periodontal están los microorganismos pertenecientes al género de *Streptococcus*, *Lactobacillus*, y *Actinomyces*, los géneros de *Staphylococcus*, *Neisseria* y *Actinobacillus* son otros agentes patógenos que intervienen en la presencia de la caries pero en diferentes etapas.

Para reducir los microorganismos patógenos de la microflora, se emplean diferentes medios, uno de ellos es la acción mecánica de barrido sobre las superficies dentales a través de un cepillo con algún dentífrico, otra forma es empleando soluciones antisépticas que se obtienen por procesos físico-químicos, y que entre sus desventajas esta que producen reacciones secundarias a los tejidos blandos y duros de la cavidad bucal, ejemplo de esto serían las pigmentaciones dentarias e irritaciones de la mucosa, además sus efectos varían, de un individuo a otro y su costo es elevado. Actualmente se ha retomado la búsqueda de nuevas alternativas de tratamientos a través de productos naturales.

Con base en lo anterior, se propuso buscar nuevas alternativas de un antiséptico de bajo costo que permitan que un mayor número de la población pueda acceder a éste sin problemas, que no dañe los tejidos y que sea de origen natural, por lo que se propone determinar el efecto antimicrobiano de *Cnidocolus chayamansa* planta propia de la región sureste de México que es utilizada por la medicina tradicional maya para el tratamiento de diferentes enfermedades.

Marco teórico

La flora bucal que se encuentra en la cavidad bucal, tiene como característica dominante su heterogeneidad relacionada con los numerosos grupos de microorganismos que colonizan los espacios, compartimientos y superficies de los órganos dentarios. La composición de la flora varía de una zona a otra dependiendo de sus requerimientos de oxígeno y nutrientes (Paciello, Osorio y Zanotti 2001, Pérez, Duque de Estrada e Hidalgo 2007).

Se han aislado cerca de 340 especies distintas entre las cuales se encuentran las bacterias, hongos, protozoos y de las cuales solo 20 de las especies son realmente patógenas.

La flora mantiene una relación de comensalismo o sinergismo con el huésped, pero puede volverse patógena cuando se rompe el equilibrio como sucede con las bacterias relacionadas con la caries dental que se pueden encontrar en la placa bacteriana (Ortega, 2004).

La OMS define la placa dentobacteriana como una entidad organizada proliferante, enzimáticamente activa que representa un agente etiológico fundamental en la caries y enfermedad periodontal. Está constituida por una población bacteriana englobada en una matriz que se encuentra adherida en sí y a las superficies bucales y dentales. Entre las bacterias más comunes que se encuentran en la placa dental y que se asocian al inicio y desarrollo de la caries dental están el género *Streptococcus* (sus serotipos c, e y f, *sanguis*, *sobrinus* y *cricetus*), *Lactobacillus* y *Actinomyces*. Los estreptococos son bacterias de forma esférica que pertenecen al filo firmicutes y al grupo de las bacterias ácido lácticas crecen en cadenas o en pares, no presentan movimiento y no forman esporas. Se clasifican en cuatro grupos: *pyogenes*, *agalactiae*, β -hemolíticos y *viridans*. Este último se divide a su vez en cuatro subgrupos, *milleri*, *oralis*, *salivarius* y *mutans* siendo este último el más importante ya que están relacionados con la caries junto con otras bacterias presentes en la cavidad bucal (Ortega, 2004).

Streptococcus mutans es una bacteria grampositiva, anaerobia facultativa, acidofílica ya que requiere de medio ácido con pH bajo para sobrevivir, posee la capacidad de ser acidogénico por metabolizar los azúcares a ácidos y también se caracterizan por ser acidúricos ya que sintetizan ácidos a pesar de encontrarse en un medio con tales condiciones. Metaboliza el disacárido sacarosa para producir polisacáridos extracelulares factor que permite la adherencia de otros microorganismos y formar colonias complejas de bacterias.

Otra bacteria presente en la caries es el *Lactobacillus* o también llamada bacteria del ácido láctico, es un género de bacterias grampositivas anaerobias denominadas así debido a que la mayoría de sus especies convierte lactosa y otros monosacáridos en ácido láctico. Como se mencionó con anterioridad, estas bacterias son las que se encuentran presentes en la caries dental, que se define como una enfermedad multifactorial e infecciosa, la cual se caracteriza por la desintegración de los tejidos calcificados de los dientes por la acción de los microorganismos sobre los carbohidratos fermentables que provienen de la dieta y como resultado, se produce la desmineralización de los componentes inorgánicos y la alteración de la estructura orgánica. Esta patología es uno de los padecimientos más frecuentes y comunes a nivel mundial. Según Bhaskar considera la caries como la enfermedad más común del ser humano; Domínguez, la describe como procesos destructivos localizados en los tejidos duros dentarios con evolución en forma progresiva e irreversible; Pindborg menciona que la caries dental es una enfermedad infecciosa y transmisible, Baume y Franke describen que inicia como una lesión microscópica que al final alcanza las dimensiones de una cavidad macroscópica y Fusayama clasifica la caries de acuerdo con la ruta de invasión en centripeta y centrifuga (Barrancos, 2006).

Teorías Etiológicas

A través de los tiempos han surgido varias teorías que tratan de explicar la naturaleza etiológica de la caries, y se pueden resumir en dos grupos: las endógenas que tratan de explicar que la caries es provocada por agentes que

proviene del interior de los dientes y las exógenas que atribuyen la aparición de la patología a factores externos.

Factores etiológicos

Los factores etiológicos de la caries pueden ser: primarios como los microorganismos, la dieta y el huésped (saliva, diente e inmunización) y los secundarios o modulares como la edad, tiempo, salud general, nivel socioeconómico, variables de comportamiento nivel de estudio, experiencias anteriores de caries, grupo epidemiológico. Para que se produzca la caries dental deben interactuar todos los factores antes mencionados (Henostroza, 2003).

La prevención de la caries se puede realizar a través de diferentes medios, estos pueden ser: medidas preventivas de aplicación masiva como los programas de educación para la salud.

Otra estrategia que se puede implementar son las medidas de aplicación y atención individual que consisten en el control de placa, control mecánico, uso de antisépticos bucales (Barrancos, 2002).

Actualmente ha crecido el interés por el uso de agentes antisépticos, como una forma de controlar la placa dentobacteriana y disminuir las patologías relacionadas con la presencia de ésta. Se han probado muchos compuestos de uso tópico como enjuagues bucales, dentífricos, goma de mascar o geles.

En términos generales los antisépticos son sustancias químicas que aplicadas sobre tejidos vivos, impiden el desarrollo o eliminan los microorganismos patógenos y no patógenos aunque no garantiza la supresión de esporas ni virus. Se diferencian de los desinfectantes en que éstos últimos son usados sobre superficies en objetos inanimados.

Los antisépticos bucales tienen varias desventajas, una es el costo elevado, y otra su composición química que pueden producir cambios o efectos colaterales en los tejidos bucales. Por lo que se está considerando el uso de extractos

vegetales en forma de antisépticos para usarlos en vez de los productos sintéticos.

Una opción de extracto vegetal es *Camelia sinensis* con el que se elabora el té verde, que es un arbusto de hoja perenne. El té verde tiene una larga historia de uso, aproximadamente 5,000 años en China. El té verde, el té negro y el té oolong todos se derivan de la misma planta. Numerosos estudios científicos demuestran sus propiedades antioxidantes las cuales refuerzan las defensas y protegen el cuerpo de los radicales libres.

En nuestro medio hay algunas plantas medicinales que se pudieran usar para elaborar infusiones para disminuir padecimientos bucales como ejemplo se citan al *Cnidoscopus Chayamansa* que tiene diferentes aplicaciones en la medicina tradicional maya (Arellano *et al*, 2003).

Características de la planta *Cnidoscopus chayamansa* McVaugh

Entre la variedad de plantas de la flora endémica de Yucatán se encuentra un grupo con propiedades medicinales que algunas personas llamadas hierbateros, curanderos o médicos tradicionales las han utilizado con fines terapéuticos. Casi todas las plantas tienen uno o varios nombres comunes en idioma maya, y pueden tener uno o más usos.

La planta estudiada en esta investigación, cuyo nombre científico es *Cnidoscopus chayamansa* McVaugh, conocida comúnmente con el nombre de "chay", o "chaya" y en maya e chaykol, xchay, k'ek'enchay, generalmente se utiliza como planta medicinal y alimento por sus altas propiedades nutritivas (Arellano *et al*. 2003).

La planta es un arbusto, de hoja perenne y forma lobulada; su crecimiento es rápido llegando a medir de 3 a 8 metros de altura, sus hojas son anchas alternadas y simples de color verde oscuro, de superficie adherente. Cada hoja mide cerca de 12 a 15 centímetros de ancho, fijadas en un peciolo largo, delgado y caroso (tallo de la hoja). Presentan inflorescencias de color blanco que suelen estar ramificadas. Las semillas maduras y frutas son raras y desconocidas. (Kuti, Torres, 1996, Kuti, Kuti 1999, Oboh, 2005)

Hay dos especies comunes comestibles de chaya: *Chayamansa cnidoscolus* que se encuentra en su mayoría en la península de Yucatán en México hasta Honduras y en Cuba y *Cnidoscolus aconitifolius* que se encuentra principalmente en el sur de México y Costa Rica. Botánicamente, tanto *Cnidoscolus aconitifolius* y *Cnidoscolus chayamansa* son similares morfológicamente, excepto en la forma de su hoja (Kuti, Kuti, 1999).

No presentan diferencias significativas en la composición nutricional y contenido mineral entre las dos especies de chaya; las diferencias en la composición relativa de ácidos grasos, proteínas y aminoácidos son mínimas, aun después de cocidas, reduciendo ligeramente su composición y valor nutricional (Kuti, Kuti, 1999).

Se ha utilizado como medicina tradicional maya en el tratamiento de enfermedades crónicas como la diabetes, el cáncer y otras patologías sistémicas; ayuda a la circulación de la sangre, afecciones de la cavidad bucal, lengua y dientes. Además posee propiedades antiinflamatorias, también se le considera una fuente de alimento por sus altas propiedades nutritivas (Díaz, 1974, Arellano *et al.* 2003).

Valor Nutricional de *Cnidoscolus chayamansa* McVaugh

Los vegetales desempeñan un papel importante en la nutrición humana. Las partes comestibles de las plantas proporcionan importantes fuentes de nutrición de las proteínas, vitaminas (A y C), minerales (calcio, hierro y fósforo), niacina, riboflavina y tiamina entre las poblaciones que no pueden pagar los alimentos caros ricos en estos nutrientes (Mahabir, Gulliford, 1997, Oboh, 2005).

Las partes comestibles de las dos especies de chaya son las hojas y los brotes. Son fuentes importantes de vitaminas, proteína, fibra, Ca, K, Fe, ácido ascórbico y β -caroteno (Kuti, Kuti, 1999).

Las hojas de *Cnidoscolus chayamansa* son popularmente utilizadas en la preparación de alimentos en sus formas elaboradas o sin procesar, en

algunas regiones de África y de México donde son un recurso ampliamente accesible para su consumo en estos países del tercer mundo (Kuti, Torres, 1996, Kuti, Kuti, 1999, Oboh, 2005, Loarca-Piña, Mendoza, Ramos-Gómez, Reynoso, 2010).

Diversos estudios han determinado su composición mineral, nutrientes y efecto antioxidante de la hoja, documentando así su alto valor nutricional, asimismo se evaluó su efecto en las técnicas de elaboración de los alimentos a saber: escaldado remojo, a la abrasión con sal o sin sal, con el objetivo de conocer si se mantienen o alteran sus propiedades nutritivas (Oyagbemi, Odetola, 2010).

Su contenido de metabolitos de glucósidos tóxicos de Cianuro no la hace apta para consumo en forma cruda, su preparación previa antes del consumo inactiva el ácido cianhídrico tóxico, así como los glucósidos presentes en la hoja cruda (Kuti, Torres, 1996, Kuti, Kuti, 1999, González-Laredo, Flores de la Hoya, Quintero-Ramos, Karchesy, 2003).

Efectos terapéuticos de la planta *Cnidocolus chayamansa* McVaugh

Las plantas medicinales consideradas como remedios herbales tradicionales, se han utilizado en muchas partes del mundo (Oboh, 2005). En los últimos años se han revalorizado como sustancias de interés médico, veterinario, cosmético y agroquímico (Torrico, Gabay, Suarez y Compagnone, 2003).

Su estudio científico pretende reducir los riesgos de su utilización incontrolada, además de comprobar su actividad farmacológica y ampliar su espectro, así como también estandarizar su dosis (Torrico, Gabay, Suárez y Compagnone, 2003).

En las últimas tres décadas trastornos crónicos como la diabetes y la hipertensión se han convertido en las principales causas de morbilidad y mortalidad de adultos (Mahair, Gulliford, 1997, Barbosa-Filho *et al.* 2005).

En todo el mundo 177 millones de personas sufren de diabetes y es probable que en 2030 se duplique esta cantidad, afectando mayormente a la población de los países en desarrollo (Barbosa-Filho *et al.* 2005).

En este sentido, la hiperglicemia puede ser tratada inicialmente con fármacos hipoglucemiantes; sin embargo algunos de estos medicamentos tienden a producir algunos efectos secundarios, además son relativamente costosos para países en vías de desarrollo, por lo tanto, se requiere de alternativas farmacológicas que ayuden al tratamiento de la diabetes. En este contexto se ha usado la medicina tradicional como una alternativa, que involucra el manejo de plantas con finalidades terapéuticas en los países que se encuentran en vías de desarrollo. (Barbosa-Filho *et al.* 2005, Figueroa-Valverde *et al.* 2009)

Existen reportes sobre el manejo de medicina tradicional con plantas para el control de la diabetes. En la etnobotánica se reporta la existencia en el mundo de 1,200 plantas con potencial antidiabético (Alarcón-Aguilera *et al.* 2002, citados en Barbosa-Filho *et al.* 2005). De estas, 300 especies se han reportado en la literatura (Pérez *et al.* 1984; citado en Barbosa-Filho *et al.* 2005) Ejemplo de esto es el empleo de las hojas de *Cnidocolus chayamansa* que se utilizan en infusiones en regiones del sur y sureste de México para el control de *diabetes mellitus*. Con relación a esto, actualmente se están realizando estudios y experimentos administrando preparados de *Cnidocolus chayamansa* en modelos de ratas o conejos diabéticos con el objeto de determinar la eficacia de la planta de *Cnidocolus chayamansa* sobre los niveles de glucosa.

En conclusión, la administración de *Cnidocolus chayamansa* demostraron que la planta de *Cnidocolus chayamansa* induce un aumento hipoglucémico así mismo en otros estudios se pudo observar que ejerce variaciones en los niveles de triacilglicéridos y colesterol (Torrico, Garay, Suárez y Compagnone, 2003, Figueroa-Valverde *et al.* 2009).

También se ha informado acerca de las propiedades antidiabéticas del extracto de la hoja de *Cnidoscolus aconitifolius* en ratones diabéticos (Oyagbemi, Odetola, 2010).

A pesar de que las infusiones de *Cnidoscolus Chayamansa* han sido propuestas como un medicamento a base de hierbas para tratar la diabetes, los resultados reportados no son concluyentes y los estudios deber continuarse hasta confirmar sus propiedades (Loarca-Piña, Ramos-Gómez, Reynoso, 2010).

Se ha informado de varios cientos de plantas examinadas para su uso en trastornos y enfermedades del hígado, causadas principalmente por los productos químicos tóxicos, consumo excesivo de alcohol, dosis altas de paracetamol, tetracloruro de carbono, agentes quimioterapéuticos, etc. (Oyagbemi, Odetola, 2010).

Con base a esto se ha estado investigando los efectos hepatoprotectoras, del *Cnidoscolus chayamansa* y *Cnidoscolus aconitifolius* así como su utilización en el tratamiento de la ictericia, esta última reportada por Mendieta y del-Amo (1981) y Díaz Bolio (1975). (Oyagbemi, Odetola, 2010).

Con relación a la actividad antibacteriana de la planta *Cnidoscolus chayamansa* los estudios son escasos, sin embargo hay un estudio realizado por Awoyinka *et al*, 2007. del efecto de los extractos de una especie *Cnidoscolus* sobre bacterias grampositivas y gramnegativas. Cabe aclarar que los resultados obtenidos no son concluyentes y se necesitan más estudios para confirmar la actividad antibacteriana de la planta (Oyagbemi, Odetola, 2010).

Oyagbemi *et al* (2008) reportaron los efectos positivos de *Cnidoscolus aconitifolius* sobre la anemia y desnutrición proteico energética.

La desnutrición esta generalmente asociada con la anemia y los cambios en la fragilidad osmótica y la vida útil de los eritrocitos (Oyagbemi, Odentola, y Azeez, 2008).

Un estudio realizado por Oyagbemi, Odentola, y Azeez, evaluó el efecto benéfico de la suplementación dietética con la hoja de *Cnidoscopus aconitifolius* sobre la anemia y los cambios en la fragilidad de los eritrocitos en ratas desnutridas. A la administración de una dieta rica en *Cnidoscopus aconitifolius* y harina de soya mostró una recuperación y aumento en el recuento de plaquetas y leucocitos en la muestra de estudio (Oyagbemi, Odentola, y Azeez, 2008).

(Kuti y Konuru, 2004) reportaron, que las hojas de la planta *Cnidoscopus chayamansa* poseen propiedades antioxidantes, por su alto contenido en polifenoles y con relación a sus efectos antimutagénicos estos se están investigando actualmente (Loarca-Piña, Mendoza, Ramos-Gómez, Reynoso, 2010).

Marco referencial

La cavidad oral del ser humano es el nicho ecológico con mayor biodiversidad, de microorganismos, con características únicas por estar en contacto con el medio (Barrancos, 2002). Según Perea, en 2001 se estimaba que existían aproximadamente 500 especies de microorganismos en la cavidad oral, hoy se calcula que están presentes 700 especies (Perea, 2004).

La mayoría de estos microorganismos se consideran comensales, un pequeño grupo de ellos se comporta como patógenos oportunistas en la propia cavidad oral, otros pueden causar infecciones sistémicas (Perea, 2004). y se encuentran en la placa dentobacteriana de las superficies dentarias, en el surco gingival, las mucosas, el dorso de la lengua y la saliva (Itzhak, 2002).

La forma natural de crecimiento de las bacterias en la cavidad oral es la placa dentobacteriana que son las responsables de la caries y de las enfermedades periodontales (Serrano-Granger y Herrera, 2005).

La presencia de los microorganismos se modifica en cantidad y calidad a lo largo de la vida del individuo y estas variaciones están relacionados con distintos acontecimientos, como: aparición de los dientes, empleo de una prótesis, pérdida de estructura dentaria y cuando el individuo queda totalmente desdentado.

Entre las bacterias más comunes de la flora bucal se encuentran el *Streptococcus (mutans, salivarius, sanguis, milleri y mitis)* *Lactobacillus* y *Actinomyces* (Perea, 2004).

Una forma de eliminar o reducir las bacterias presentes en la cavidad oral es la aplicación o uso de antisépticos. Varios productos han sido utilizados y algunos hasta formulados específicamente para este fin, como detergentes, fenol, agua oxigenada, gluconato de clorhexidina y otros agentes antisépticos y antimicrobianos de uso específico para las cavidades y conductos como: las soluciones de hidróxido de calcio e hipoclorito de sodio, el cloruro de benzalconio actualmente en desuso (Tedesco, 2005). En la literatura científica existen varios estudios que respaldan la eficiencia de los antisépticos utilizados en odontología por ejemplo, la clorhexidina la cual es un aldehído que ha demostrado buenos resultados como desinfectante.

Un estudio de tipo experimental, aleatorio realizado en niños con alta incidencia de caries en un colegio de Madrid a quienes se aplicó un barniz de clorhexidina y timol al 1%, reportó que los efectos de estos antisépticos fueron efectivos disminuyendo los índices de microorganismos (Rioboo y García, 2004).

Otros antisépticos ampliamente utilizados en odontología son los compuestos halogenados como el hipoclorito de sodio, pero su desventaja frente a otros desinfectantes es su alta toxicidad y no puede ser utilizado directamente sobre los tejidos bucales blandos y su uso está limitado a la irrigación de los conductos radiculares de los dientes con endodoncia.

En la actualidad existe una tendencia en los países del mundo occidental a volver hacia el conocimiento empírico de las plantas medicinales, buscar sus orígenes, principios activos, propiedades curativas, evadiendo los efectos adversos de muchos fármacos que se emplean hoy en día (Mendieta y Del Amo, 1981).

Como resultado va surgiendo un campo terapéutico que se abre paso en el mundo contemporáneo: la medicina verde (MSAP, 1992).

Como antecedentes tenemos que los extractos vegetales se han utilizado en productos para la higiene bucal durante muchos años o incluso siglos (Moran *et al.* 1991).

Son diversos los estudios efectuados con extractos vegetales que se han utilizado para la higiene bucal como *Matricaria chamomilla* L, cuyo nombre común o vulgar es la manzanilla. En un estudio realizado de la flora bacteriana en pacientes tratados ortodónticamente aplicando enjuagues bucales de *Matricaria chamomilla*, reveló una disminución de la flora bacteriana y baja formación de placa dentobacteriana alrededor de los brackets (Sainz y Ruiz, 2002).

Otra alternativa es el uso de la *Camelia sinensis* comúnmente llamado té verde. A pesar de que el té se ha consumido desde hace miles de años, las investigaciones científicas para documentar los potenciales beneficios para la salud de esta antigua bebida, no tuvieron lugar sino hasta hace dos décadas. Investigaciones realizadas con *Camelia sinensis* han demostrado que el té verde contiene altos niveles de unas sustancias químicas llamadas polifenoles, que poseen propiedades antioxidantes, anti cancerígenas e incluso antibióticas. En los últimos años se han llevado a cabo estudios sistemáticos de *Camellia sinensis* en los cuales se ha demostrado las acciones y propiedades que poseen los extractos de té. También se ha incrementado notoriamente los estudios *in vitro*, de estas sustancias naturales, que presentan propiedades antimicrobianas (Moroni *et al.* 2007).

Otra propiedad característica es que posee propiedades anticariogénicas ya que puede ayudar a endurecer la estructura inorgánica de los dientes, y por lo tanto, a reducir la pérdida de estos, según el reporte de un estudio realizado (Sainz y Ruiz 2002, Moroni *et al.* 2007).

En los estudios anteriores se probó la eficacia antimicrobiana de los enjuagues con base en infusión de plantas secas y procesadas, sin embargo también se pueden obtener e identificar los metabolitos activos de la plantas por medio de procedimientos de laboratorio y después ser aplicados en forma de tinturas o extractos sobre cepas estudiando sus propiedades antibacterianas.

Un estudio realizado por Baños *et al.*, en el Instituto Politécnico Nacional utilizando la tintura de *Amica montana* y *Calendula officinalis* demostraron la eficacia antimicrobiana sobre el *Streptococcus mitis*, sin embargo concluyen que será necesario realizar más investigaciones con más medicamentos y otras especies de cepas (Baños, 2004).

En otro estudio realizado por Neira *et al.* (2005) con extractos etanólicos de *Psidium guineense* (choba) frente a *Streptococcus mutans* demostró su actividad antimicrobiana, pero atribuyendo este efecto a los metabolitos secundarios, taninos, flavonoides, herpenos y aldehídos presentes en el fruto de esta especie.

Por su parte Mayta-Tovalino y Sacsquispe-Contreras (2010) demostraron a través de un estudio, el efecto antibacteriano del extracto etanólico del propóleo de Oxapampa - Peru en concentraciones al 30%, a 10% no se observaron diferencia significativas.

Un estudio similar realizaron Moreno, Martínez y Figueroa (2007) para demostrar las propiedades bacteriostáticas y bactericidas de diferentes propóleos (cuatro extractos de propóleos argentinos, cinco colombianos y uno cubano) frente a *Streptococcus mutans*. De todos los propóleos estudiados el

colombiano presentó mejor efecto bacteriostático a las 24 horas de incubación; los demás propóleos presentaron este efecto después de 48 horas. Al final, los extractos de propóleos colombianos demostraron ser superiores en su efecto.

Con base en estos estudios realizados con infusiones y extractos vegetales y propóleos se propuso investigar la hojas de *Cnidoscopus chayamansa*, planta endémica de la entidad de Yucatán que tiene propiedades semejantes a las anteriores.

En México las plantas medicinales han sido utilizadas desde tiempos remotos para fines terapéuticos, su uso tan extendido en diferentes grupos étnicos del país representa la única fuente de información con la que se cuenta y nos permite conocer la forma en que solucionaban sus problemas de salud (Mendieta y Del Amo, 1981).

La cultura maya se sabe que empíricamente utilizaba diversas plantas para aliviar, calmar o curar sus enfermedades. Un ejemplo de esas plantas utilizadas, es una especie llamada *Cnidoscopus chayamansa* McVaugh, que pertenece a la familia *Euphorbiaceae*, del género *Cnidoscopus*, conocida comúnmente como "chaya", se emplean las hojas de esta planta para el tratamiento de enfermedades crónico degenerativas como la diabetes, hipertensión e incluso se le atribuyen propiedades curativas contra el cáncer, de aquí que se le conozca como la "planta maravillosa" (Díaz, 1974).

La chaya proporciona enormes ventajas al organismo humano, entre sus beneficios está la regulación de la presión, mejora la circulación sanguínea, facilita la digestión, recupera la visión, desinflama las venas y hemorroides, combate el estreñimiento, ayuda a la expulsión de orina y leche materna, baja el nivel de colesterol y ácido úrico, previene la tos, reduce el peso, descongestiona y desinfecta los pulmones, previene la anemia, mejora la memoria y las funciones del cerebro, combate la artritis, la diabetes y posee propiedades antibacterianas (Díaz, 1974).

Con relación a las propiedades antioxidantes y antibacterianas de la planta del género *Cnidoscolus*, una investigación realizada en unidad de bioquímica de la Universidad de Babcock, estudió ocho compuestos bioactivos obtenidos de extractos acuoso y etanólico de material vegetal seco de *Cnidoscolus aconitifolius*. En total, tres componentes activos fueron positivos para ambos extractos, fenoles, saponinas y glucósidos cardiacos. En el extracto acuoso se determinaron flobataninas y alcaloides en el extracto etanólico.

La actividad antimicrobiana de la planta se efectuó sobre *Salmonella typhi* y *Staphylococcus aureus* utilizando para esto el extracto etanólico. Los resultados obtenidos fueron que *Salmonella typhi* mostró cierta sensibilidad al extracto etanólico (1.5 ± 0.5 mm) a diferencia de las los extractos acuosos y secos, pero presento más sensibilidad ($P < 0.05$) al cloranfenicol (17 ± 0.1 mm). Sin embargo, el extracto acuoso de material vegetal fresco, el extracto etanólico de material vegetal seco y el cloranfenicol mostraron 2.0 ± 0.5 , 3.0 ± 0.1 y 11.5 ± 0.1 mm de bioactividad, respectivamente, contra *Staphylococcus aureus*.

Con relación al extracto acuoso de material vegetal seco no hubo indicios de actividad antimicrobiana para ambas cepas de bacterias (Awoyinka, Balogun y Ogunnuwo, 2007).

Justificación

El último informe de la OMS presentado en Ginebra, Suiza en 2004; señala que las enfermedades bucodentales siguen representando un problema de salud pública de alcance mundial que afecta tanto a la población adulta como a la infantil de países industrializados y con tendencia más marcada en las comunidades pobres de los países en desarrollo.

Entre las enfermedades bucodentales más comunes del que hace referencia la OMS están la caries dental y se estima que cinco millones de personas la padece, la periodontitis (enfermedad periodontal), los cánceres de boca y faringe. Con relación a la caries y a la enfermedad periodontal para su tratamiento y control se utilizan medios mecánicos y farmacológicos. Los

medios mecánicos consisten en la eliminación de los tejidos afectados a través de la instrumentación y con relación a los medios farmacológicos incluyen a los antisépticos bucales, elaborados con diversas sustancias y vehículos. Sin embargo el elevado costo de los antisépticos bucales para el control bacteriano, como la clorhexidina, limita su adquisición a los pacientes de escasos recursos económicos. Si las bacterias más comunes que inician la caries se pudieran combatir con el uso de enjuagues bucales, preparadas con base en una planta común de nuestro medio, cultivable en terrenos familiares, con propiedades similares a los antisépticos bucales sintéticos más eficaces, la población en general y principalmente la de escasos recursos económicos, podrían tener mayor posibilidad de registrar bajos índices de caries, enfermedad periodontal y por consiguiente, mejorar su salud bucal.

El presente estudio propone evaluar las propiedades antimicrobianas de la planta *Cnidocolus chayamansa* McVaugh contra *streptococcus mutans* bacterias que inician las caries en la cavidad bucal y proponer nuevas alternativas de tratamiento de bajo costo que beneficien a la población de escasos recursos, sin que produzcan daños colaterales indeseables a los tejidos del organismo.

Objetivo General:

Determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* de los extractos de hojas de *Cnidocolus chayamansa* McVaugh contra *Streptococcus mutans*



II. MATERIAL Y MÉTODOS

El diseño del estudio es descriptivo, prospectivo, longitudinal y experimental.

La muestra de estudio fue la cepa de referencia de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) lote 266126 de los laboratorios MicroBiologics Inc. La muestra para este estudio se tomó con una asa calibrada de 1 en 100, de la placa en donde se sembró la cepa de referencia.

Las unidades de observación tienen que presentar las características de pureza y morfología de la bacteria *Streptococcus mutans*. Estas se determinaron con pruebas de identificación de las bacterias tinción de Gram, pruebas de catalasa y pruebas bioquímicas.

Los criterios de eliminación en este caso fueron los cultivos bacterianos contaminados durante la preparación de los medios.

Las variables estudiadas son la cepa de referencia de *Streptococcus mutans* y concentraciones del extracto metanólico y acuoso de *Cnidocolus chayamansa* McVaugh. (Anexo 1)

El grupo testigo es la cepa de *Streptococcus mutans* tratada con solución de gluconato de clorhexidina a una concentración de 0.12 mg/mL y como control negativo el medio para el crecimiento bacteriano: infusión cerebro corazón (BHI: Brain Heart Infusión)

Materiales e instrumentos

Cepa de referencia de las bacterias a estudiar, extractos crudos de *Cnidocolus chayamansa*, agua destilada estéril, solución salina 0.85%, agar soya tripticaseína (TSA), Infusión cerebro corazón (BHI), alcohol metanólico al 96%, membranas de millipore de 0.22 µm, gluconato de clorhexidina.

Balanza digital, matraces de bola esmerilado, sistema refrigerante de rosario esmerilado, placas de plástico de 96 pocillos con tapas estériles, placas de Petri estériles, tubos de ensayo de 5 mL, asa bacteriológica calibrada de 1 en 100,

estufa, autoclave, rejillas, mechero de Bunsen, cámara o jarra de anaerobiosis, equipo de rotovapor Bauchi, hojas de registro, lápices, computadora, matraces, equipo de liofilizado.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Obtención del material vegetal

Las hojas de *Cnidoscolus chayamansa*, fueron recolectadas en las localidades rurales de San Pedro Chimay y San José Tesip que pertenecen al municipio de Mérida. Para la selección de las hojas viables se consideraron aquellas que presentaron un color verde intenso sin presencia de áreas cafés o amarillas y secas que indicaran su degradación, las hojas obtenidas fueron tomadas de la parte media de las ramas excluyendo aquellas que estaban al inicio y en la parte terminal de las ramas, todas las hojas fueron separadas del tallo a nivel de su base cuidando de no lesionarlas. El total recolectado fue de dos kilos; posteriormente fueron lavadas con agua y puestas a secar sobre papel periódico a la sombra y temperatura ambiente hasta obtener un peso seco constante; debido a la humedad del medio durante el secado se requirió el empleo de un deshumidificador portátil con capacidad de 7.0 L/24hrs por periodos de 12 hrs. El secado de las hojas duró aproximadamente dos meses, ya secas las hojas se molieron en un procesador con capacidad de 1.5 L y se depositó en un recipiente ámbar con sello hermético para continuar con la extracción vegetal en los laboratorios de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán. (Figuras 1,2,)

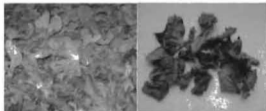


Figura 1 .Hojas de *Cnidoscolus chayamansa* secas



Figura 2. Obtención del material molido

Procedimiento para la obtención de extractos

Para la obtención de los extractos metanólico y acuoso se procedió a pesar el material sólido; el peso total fue de 184 g que se dividió en dos partes iguales quedando dos porciones de 92 g cada una. (Figura 3) Posteriormente se procedió a la maceración del material por 48 horas, colocando 92 g del material sólido en 460 mL de disolvente (metanol 96°) en un matraz balón de 1000 mL con esmeril 24/40 y en otro matraz la misma cantidad de sólido con 600 mL de agua destilada.(Figura 4) Cada matraz fue provisto con un sistema de refrigerante de rosario con esmeril 24/40 de 3 cm de largo en posición de reflujo, ambos matraces se colocaron en canastas de calentamiento de 1000 mL; la mezcla se calentó a temperatura de reflujo regulada por un reostato durante 4 horas y para mantener la temperatura constante se conectó a un recirculador provisto de agua destilada a una temperatura constante de -13°C como medio refrigerante (Figura 5)

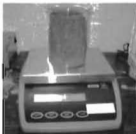


Figura 3. Pesado del material



Figura 5. Inicio de la extracción



Figura 4. Macerado del material

Se dejó enfriar el concentrado obtenido y se procedió a la separación (filtrado) del material sólido utilizando un matraz de Kitazato provisto de un embudo Buchner y filtro Whatman No 4, conectados a un equipo de vacío, al final de este procedimiento se obtuvo 40 mL de concentrado metanólico y 28 mL del concentrado acuoso (Figura. 6 y 7),



Figura 6. Obtención de los concentrados.



Figura 7. Separación del sólido

Para la eliminación de los disolventes se empleó un equipo de rotovapor (marca Bauchi , modelo R210) conectado a una bomba de vacío y a un recirculador para mantener una presión reducida y una temperatura de vapor de $45^{\circ}\text{C} \pm$ respectivamente durante 4 horas.(Figura 8)

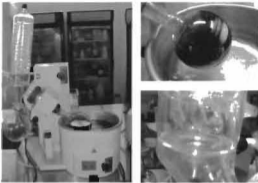


Figura 8. Eliminación de los disolventes con el rotovapor.

Finalmente se procedió al liofilizado del concentrado, colocando los extractos obtenidos en vasos precipitados de 150 mL y se depositaron en el equipo de liofilizado a una temperatura de -40°C una vez alcanzada esta temperatura se activó el vacío del equipo para la extracción completa de los disolventes y el secado del extracto de *Cnidoscopus chayamansa* McVaugh (Figura 9)



Figura 9. Procedimiento de liofilizado para el secado del extracto Bioensayos con cepa de referencia de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)

Los bioensayos y la evaluación del efecto antimicrobiano del extracto de *Cnidoscopus chayamansa* sobre el *Streptococcus mutans* se realizó en el Departamento de Microbiología Oral y Biología Molecular de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán.

La cepa de *Streptococcus* utilizada para este estudio son de referencia (ATCC 25175) lote 266126 de los laboratorios MicroBiologics Inc. (Figura 10)



Figura 10. Cepa de referencia
Streptococcus mutans ATCC 25175

La recuperación de la cepa se inició con la rehidratación de la cepa liofilizada en tubos con caldo agar soya tripticaseína (TSA); los tubos se colocaron en una cámara de anaerobiosis y se incubaron en estufa a 36-37°C, por 48 horas para su crecimiento y desarrollo (Figura 11), después se realizó el sembrado de la cepa en placas de agar sangre. (Figura 12)

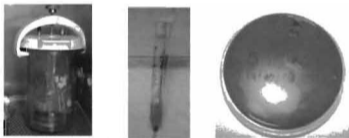


Figura 12. Recuperación de las bacterias y sembrado en placas de agar sangre

Estandarización de pruebas

Obtenidas las colonias se realizaron una serie de pruebas para confirmar y establecer la pureza de la cepa, las pruebas realizadas fueron: tinción de Gram, esta se realizó con el fin identificar el tipo de bacteria (Figura 13) la prueba de la catalasa para probar la presencia de la enzima catalasa y diferenciar entre los grupos de bacterias que en el caso del *Streptococcus mutans* el resultado fue negativo; y por último se realizaron las pruebas

bioquímicas de fermentación de azúcares (manitol y sorbitol) que arrojaron respuestas positivas, una vez concluidas las pruebas, se procedió a resembrar las bacterias en cajas de petri que contenían preparados estériles de agar sangre, agar *mitis salivarius* y agar cerebro corazón (BHI) medios idóneos para el crecimiento del *Streptococcus mutans* (Medios de cultivo Medina, Moreno, Velazco, Gutiérrez 2005) y se colocaron en la cámara de anaerobiosis para su crecimiento y se incubaron en la estufa a 37°C por 48 hrs, posteriormente se congelaron para ser usadas en el estudio.

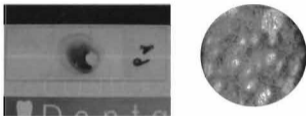


Figura 13. Prueba de tinción de Gram

PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS

Para la preparación de la solución de trabajo, se pesó 9.6 mg de cada extracto (metanólico y acuoso) en un recipiente limpio y se disolvieron: el extracto metanólico con metanol y el extracto acuoso con diluyentes de agua destilada y buffer de fosfatos (PBS, NaCL 137 Mm, KCl 2.7 Mm, Na 2HPO4 4.3 Mm y KH2PO4 1.4 mM con pH 7.4) obteniendo soluciones de trabajo de 960 mg/mL, que se esterilizaron por filtración con membranas de millipore de 0.22 μ m. (Figura 14)



Fig 14. Preparación de los extractos

PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Se descongeló la cepa de *Streptococcus mutans* y se sembraron con una asa bacteriológica estéril en agar de soya de tripticaseína (TSA), agar sangre y *mitis salivarius* posteriormente se introdujeron en una cámara de anaerobiosis y se incubaron en estufa a 37°C por 24 horas. (Fig 15)

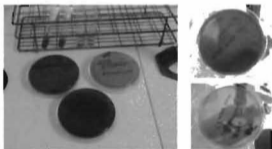


Fig. 15. Reactivación de las cepas

Transcurrido este tiempo, las placas presentaron crecimiento de colonias de *Streptococcus mutans* de las cuales se tomaron algunas colonias y se suspendieron en infusión cerebro corazón (Brain Heart Infusión: BHI) y

nuevamente se incubaron en anaerobiosis a 37°C por 24 horas. Después se preparó el inóculo para los bioensayos estandarizando a una turbidez equivalente al 0.5 del nefelómetro de MacFarland (concentración aproximada de 1.5×10^9 UFC/mL) en una solución salina fisiológica estéril (0.85%). (Figura16)

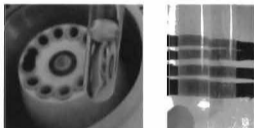


Fig.16.Obtención de la pastilla y estandarización del inóculo

PREPARACIÓN DE LAS PLACAS CON LAS DILUCIONES DE TRABAJO.

El método empleado para este estudio fue el de microdilución utilizando placas estériles de 92 pocillos. (Prueba estandarizada por Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)

Una vez preparada la solución de trabajo de los extractos se procedió a realizar diluciones seriadas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256). Primeramente se colocó en los pocillos del 2 al 11 de la primera fila 100 μ L del diluyente (metanol, agua destilada, buffer de fosfatos BPS). Realizada esta fase y siguiendo un orden se colocó 100 μ L de la solución del extracto al 9.6 % (960 mg/mL) en el pocillo 1; en el pocillo 2 se le agregaron 100 μ L del extracto metanólico al diluyente y se mezcló varias veces con la micropipeta para homogenizar la solución de las dos sustancias, la dilución fue de 480 mg/mL y corresponde a la dilución 1/2, al pocillo tres se le agregaron 100 μ L que se tomaron del pozo 2 realizando el mismo procedimiento de mezclado con la micropipeta, la dilución fue 1/4 (240 mg/mL), al pocillo cuatro se le agregó 100

μL del pozo 3 siendo la dilución 1/8 , así sucesivamente se continuó con los siguientes pocillos, repitiendo el mismo procedimiento hasta el pozo nueve en donde se tomaron 100 μL con la micropipeta y desecharon; Los pocillos 10, 11 y 12 fueron los controles. El pocillo 11 fue el control positivo que contenía 100 μL del gluconato de clorhexidina; el pocillo 10 el control negativo; el control de esterilidad fue el pocillo 12 que solo contenía 100 μL de la infusión de cerebro corazón (Brain Heart Infusión; BHI). Este procedimiento se realizó por triplicado para cada extracto. (Figura 17)



Fig. 17. Preparación de las placas con las diluciones

BIOENSAYOS DEL EXTRACTO CRUDOS DE *Cnidocolus chayamansa* CON LA CEPA DE *Streptococcus mutans*.

El inóculo de la cepa de *Streptococcus mutans* se puso en contacto con las diferentes concentraciones de los extractos crudos, gluconato de clorhexidina (control negativo) y infusión de cerebro corazón (BHI) como control negativo. Para iniciar con los bioensayos se colocaron 25 μ L de la suspensión bacteriana preparada, en los pocillos 1 al 10 y se cubrieron y sellaron con parafilm, se dejaron incubar a temperatura ambiente por 24 horas;

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERIOSTÁTICA

Concluido el tiempo de incubación se procedió a la comprobación del crecimiento de *Streptococcus mutans* colocando 0.01 mL de la dilución de cada pocillo en placas de agar sangre con una asa de nicrome calibrada 1 x 100, realizando la técnica de sembrado por agotamiento. Posteriormente se incubaron en anaerobiosis en la estufa durante 24 a 48 horas a 37°C.

Al término de este tiempo se analizó cada placa para observar si hubo o no crecimiento bacteriano.

Este procedimiento se realizó por triplicado para cada extracto (Figura 18)



Fig. 18 Comprobación del crecimiento del *S. mutans* en placas de agar sangre

PRUEBAS Y TESTIGOS (PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD)

Los pocillos del dos al nueve fueron los ensayos en donde cada pocillo contenía el extracto a diferentes concentraciones, diluyente y cepas. Los controles o testigos fueron los pocillos del diez al doce, en donde el pocillo diez fue el control positivo conteniendo gluconato de clorhexidina. El control negativo fue el pocillo once con extracto y el pozo doce contenía caldo de infusión cerebro corazón (Brain Heart Infusión: BHI) que representó el control de esterilidad en la placa de microdilución.

III. RESULTADOS

El efecto antimicrobiano se observó con las lecturas de las placas de microdilución, que son pruebas estandarizada por la NLSCC para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de un antibiótico. (Anexo 2)

Las placas se prepararon con los diluyentes agua, metanol y PBS conteniendo inicialmente 100 μ L en cada pocillo; en una segunda fase se agregó 100 μ L del extracto preparado en concentraciones al 9.6 %. El contenido total de cada pocillo fue de 100 μ L una vez realizada la dilución. Posteriormente se retó el contenido de cada uno de los pocillos con 25 μ L del inóculo. La técnica empleada en este estudio fue la prueba estandarizada de microdilución que permite observar el crecimiento de los microorganismos por la presencia o ausencia de turbidez en los pocillos. Los resultados obtenidos son los siguientes:

Se pudo observar que en la placa de microdilución que contenían las diluciones con extracto metanólico con diluyente metanol no hubo crecimiento del *Streptococcus mutans* (Tolosa, Cañizares, 2002).

Con respecto la placa en la que se empleó el extracto acuoso con diluyente agua se pudo observar crecimiento del *Streptococcus mutans*. Lo mismos resultados se observaron en las placas con que contenían el extracto acuoso con diluyente de buffer de fosfatos con pH 7.4

El control positivo con clorhexina al 0.12 % no registro crecimiento, pero el control negativo de caldo BHI si se observó crecimiento bacteriano.

(Anexo 2)

IV. DISCUSIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) a partir de la Declaración de Alma Ata, propuso apoyar la utilización de los recursos tradicionales, así como de los propios de la medicina generada en el modelo biomédico (Taddei-Bringas GA y cols., 1999). Esta organización reporta más de 20,000 especies de plantas diferentes que han sido empleadas con propósitos medicinales por las poblaciones humanas. Además el 80% de las personas que habitan en países en vías de desarrollo, dependen aún de las medicinas tradicionales para el cuidado primario de la salud (OMS, 1995).

En este contexto los conocimientos de la Medicina Tradicional Maya, han sido ampliamente usados para la atención de diversos problemas relacionados con la salud del hombre. En virtud de lo cual, en las comunidades indígenas y de escasos recursos de esta región, algunas de las enfermedades infectocontagiosas se tratan de manera empírica, aplicando estos conocimientos y de ahí la importancia de buscar nuevas alternativas de tratamiento con base en productos naturales.

De manera que en el presente trabajo se evaluó el efecto de *Cnidocolus chayamansa* planta propia de la región sureste de México que es utilizada por la medicina tradicional maya para el tratamiento de diferentes enfermedades.

La actividad antimicrobiana del *Cnidocolus chayamansa* McVaugh no se ha investigado en forma amplia y considerando que la información que se tiene se basa en conocimientos empíricos sin sustento científico (Díaz, 1974). Se decidió investigar sus efecto antimicrobiano in vitro sobre el *Streptococcus mutans* agente causal de la caries.

Este efecto ya ha sido estudiado con otras plantas como lo demuestran en investigaciones realizadas por Neira, Ramírez y Sánchez en el 2005 y en la que estudiaron la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de *Psidium guineense* Sw (Choba) que mostraron actividad antimicrobiana (Neira, Ramírez, Sánchez, 2005).

Resultados similares obtuvieron Romero, Hernandez y Gil con el extracto de la *Matricaria recutita* (manzanilla alemana) en su estudio realizado para detectar la actividad inhibitoria sobre el *Streptococcus Mutans* (Romero, Hernández y Gil, 2009)

Otros estudios realizados con el mismo objetivo pero empleando extractos etanólicos de propóleos demostraron ser eficaces en su efecto antimicrobiano contra el *Streptococcus mutans* (Equizabal y Moroni, 2007, Moreno, Martínez y Figueroa, 2007).

En el presente trabajo, los resultados obtenidos fueron contrarios a los estudios antes mencionados ya que no hubo efecto inhibitorio de *Cnidocolus chayamansa* contra el *Streptococcus mutans* a las concentraciones propuestas y se asemejan a los resultados obtenidos por Malendez y Capriles, en una investigación realizada en el 2006, que consistió en estudiar las propiedades antibacteriana de las plantas tropicales de Puerto Rico y en la cual se incluía la planta de *Cnidocolus aconitifolius* (del género de *Cnidocolus*) que no registro actividad antimicrobiana frente a la *Escherichia coli* y el *Staphylococcus aureus* (bacterias grampositiva y gramnegativa) (Melendez, Capriles, 2006).

Con relación al efecto del extracto metanólico, los resultados de este estudio coinciden también con los obtenidos por Awoyinka, Balogun y Ogunnowo en el 2007, que emplearon para su estudio los extractos etanólicos, extractos acuosos de hojas secas y verdes. Así mismo de extractos dulces de hojas secas y frescas

Durante la prueba observó que el extracto etanólico presentó efecto antimicrobiano al inhibir la *Salmonella typhi*, mientras que los extractos de hoja seca y hoja fresca no presentaron ningún efecto sobre el organismo (Awoyinka, Balogum, Ogunnowo, 2005).

El efecto antimicrobiano negativo del extracto metanólico de *Cnidocolus chayamansa* frente a la bacteria, tal vez se pueda explicar por las características del *Streptococcus mutans*; que es una bacteria grampositiva conformada por una pared bacteriana rica en peptidoglucano. El peptidoglucano

un polímero constituido por unidades repetidas del monómero formado por: dos derivados de carbohidratos, N-acetil Glucosamina y N-acetil murámico (N-Ac.G, NAc. M), unidas por enlaces beta 1-4 y asociados a cortas cadenas peptídicas a través del N-acetil murámico y existen diferencias en el espesor de esta estructura básica, el peptidoglicano de las bacterias grampositivas tienen una capa gruesa de 0,02 a 0,06 μm en forma de multicapas, mientras que las bacterias gramnegativas y las bacterias ácido alcohol resistentes la tienen más fina, de 0,01 μm . Al peptidoglicano se le unen otros componentes que son, por lo tanto, también integrantes de la pared. Todo lo anterior podría ser la causa de la falta de efecto de los extractos de *Cnidocolus chayamansa*, al no romper los enlaces peptídicos de los puentes que conforman las diez capas de peptidoglucano que conforman la pared bacteriana de los estreptococos (Murray, P.R., Rosenthal, K.S, Pfaller, M. 2008).

Es importante señalar que en el presente trabajo solamente se utilizaron hojas de la planta y habría que considerar utilizar raíces y/o tallos a las mismas y a otras concentraciones.

V. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo, se pueden establecer las siguientes conclusiones y recomendaciones:

1.- En este estudio se concluye que los extractos de *Cnidoscolus chayamansa* Mc Vaugh a las concentraciones propuestas no poseen efecto antimicrobiano sobre el *Streptococcus mutans* y debido al efecto nulo del extracto como resultados del estudio, no permitió el análisis estadístico. Sin embargo el análisis que se pudo realizar fue cualitativo.

2.- Los extractos obtenidos actuaron muy poco tiempo con las bacterias, no habiendo oportunidad de destruir la pared bacteriana lo que incidiría en la muerte celular, ya que podría afectar el ciclo celular al interrumpir la fase C del mismo.

3.- Solamente se encontró efecto antimicrobiano contra *Streptococcus mutans* con el compuesto de clorhexidina, utilizado como control positivo y el con el extracto metanólico.

4.-Dado que el efecto de *Cnidoscolus chayamansa* sobre *Streptococcus mutans* fue nulo, se recomienda realizar experimentos para medir su efecto utilizando otras partes de la planta (raíces y tallos) a otras concentraciones.

5. Continuar con estudios *in vitro* empleando diferentes partes de las planta *Euphorbiaceae Cnidoscolus multilobus* I.M Johnston (Chaya de monte) en bacterias grampositivas y gramnegativas presentes en la cavidad bucal y con diferentes diluyentes y solventes.

Así mismo estudiar el efecto antimicrobiano *in vivo* de los extractos acuosos de *Cnidoscolus chayamansa*, sobre los tejidos bucales que presenten inflamación.



VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arellano, J.A., et al. (2003) Etnoflora Yucatanense. Nomenclatura, forma de vida, uso, manejo y distribución de las especies vegetales de la península de Yucatán. Mérida. Publicaciones de la Universidad Autónoma de Yucatán

Awonyinka, O., I. Balogun, y A. Ogunnowo (2007) "Phytochemical screening and *in vitro* bioactivity of *Cnidioscolus aconitifolius* (*Euphorbiaceae*)" en *Journal of Medicinal Plants Research* v. 1 n(3), pp 63-65.

Baños, F.,(2004) *Efecto antimicrobiano "in vitro" de la tintura de Árnica montana y Caléndula officinalis sobre Streptococcus mitis*. Tesis de especialización. México, Escuela nacional de medicina y homeopatía, IPN.

Barbosa-Filho *et al.* (2003) "Plants and their active constituents from South, Central and North America with hypoglycemic activity" en *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 15(4): pp 392 - 413.

Barrancos, M.J., Barrancos, J. (2006) *Operatoria Dental*. (4ª ed). Buenos Aires. Editorial Panamericana.

Díaz, B. J.(1974). *La chaya planta maravillosa: planta medicinal*. Etnobotánica Maya, Mérida.

Figueroa-Valverde, L., Díaz-Cedillo, F., Camacho-Luis, Abelardo., Lopez-Ramos, M. (2009) "Efectos inducidos por *Ruta graveolens* L., *Cnidioscolus chayamansa* McVaugh y *Citrus aurantium* L. sobre los de glucosa, colesterol y triacilglicéridos en un modelo de rata diabética" en *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 19 (4): pp 898 - 907.

Gonzalez-Laredo, R.F., Flores de la Hoya, M.E., Quintero-Ramos, M.J., Karchesy, J.J. (2003) "Flavonoid and Cyanogenic Contents of Chaya (Spinach Tree)" en *Plant Foods for Human Nutrition*. No. 58 pp 1 - 8.

Henostroza, G. (2003) *Diagnostico de la caries dental*. Lima. Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Itzhak, B. (2003) "Management and prevention of odontogenic infections". En *Medscape.com*. [En línea]. Disponible en <http://www.medscape.com/viewarticle/453448> [Accesado el día 11 de septiembre de 2008]

Kuti, J.O., Kuti, H.O. (1999) "Proximate composition and mineral content of two edible species of *Cnidioscolus* (tree spinach)" en *Plant Foods for Human Nutrition*. 53 pp 275-283.

Kuti, J.O., Torres, E.S. (1996) "Potential Nutritional and Health Benefits of Tree Spinach" en J. Janick (ed). *Progress in new crops*. ASHS Press. pp 516-520.

Loarca-Piña, G., Mendoza, S., Ramos-Gómez, M., Reynoso, R. (2010) "Antioxidant, Antimutagenic and Antidiabetic Activities of edible leaves from *Cnidioscolus Chayamansa* McVaugh" en *Journal of Food Science*. 75(2): pp 68 -72

Mahabir, D., Gulliford, M.C. (1997) "Use of medicinal plants for diabetes in Trinidad and Tobago" en *Rev Panam Salud Publica*, 1(3): pp 175 -179

Mayta-Tovalino, F., Sacsquispe-Contreras, S.J. (2010) "Evaluación *In vitro* del efecto antibacteriano del extracto etanólico de própoleo de Oxampa-Peru sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)" en *Revista Estomatol Herediana*. 20(1): pp 19 - 24.

Melendez, P.A., Capriles, V.A. (2006) "Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico" en *International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*. 13(2) pp272-6

Mendieta, R. M. y S. Del Amo (1981) *Plantas medicinales del estado de Yucatán*. México. Editorial CECCSA.

Ministerio de Salud Pública (1992) *Guía terapéutica dispensarial de fitofármacos y apicofármacos*. La Habana, Editorial Ciencias Médicas

Moran, J., M. Addy y R. Newcombe. (1991). "Comparison of a herbal toothpaste with fluoride toothpaste on plaque and gingivitis" en *Clinical Preventive Dentistry*. Año13, número 13 pp 12-15.

Moreno, Z., Martínez, P., Figueroa J. (2007) "Efecto *In vitro* de propóleos argentinos, colombianos y cubano sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175" en *Nova- Publicación Científica*. 5(7).

Moroni, N.H., C. Martínez, L.I.M Gutiérrez, P.D. Ramos, L.M. Nuñez, et al. (2007) "In vivo antimicrobial effect of *Camellia sinensis* on oral bacteria" en *Odontología Sanmarquina*, 10(2): 12-14. ISSN: 1560-9111

Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Pfaller, M. (2008) *Microbiología Clínica*. (5ª ed). España. Elsevier.

Neira, M. A., Ramírez, M. B., Sánchez, L.N. (2005) "Estudio fitoquímico y actividad antibacterial de *Psidium guineense* Sw (choba) frente a *Streptococcus mutans*, agente causal de caries dentales. En *Rev Cubana Plant Med.* 10(3-4)

OboH, G. (2005) "Effect of some post-harvest treatments on the nutritional properties of *Cnidioscolus aconitifolius* leaf" en *Pakistan Journal of Nutrition.* A4 (4) pp 226-230.

Ortega, P.(2004) *Infecciones en ORL.* Vol II. Barcelona. Editorial Masson

Oyagbemi, A. A., Odetola, A. A., Azeez, O. I. (2008) "Ameliorative effects of *Cnidioscolus aconitifolius* on anaemia and osmotic fragility induced by protein energy malnutrition" en *African Journal of Biotechnology.* Vol 7(11): pp 1721 - 1726.

Oyagbemi, A.A., Odetola, A.A. (2010) "Hepatoprotective effects of ethanolic extract of *Cnidioscolus aconitifolius* on paracetamol-induced hepatic damage un rats" en *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 13(4): pp 164-169

Paciello, M.,M, Osorio, J, Zanotti. (2001) "Flora microbiana prevalente en lesiones cariosas de individuos residentes en Asunción y área metropolitana" en *Revista de Ciencia y Tecnología de la Dirección de Investigación de la UNA* v.1, n.3

Perea, E. (2004) "La flora de la boca en la era de la biología molecular" en *Medicina oral patología oral y cirugía Bucal;* 9 Suppl: S1-10

Perez, J., J, de Duque de Estrada, I, Hidalgo. (2007) "Asociación del estreptococos mutans y lactobacilos con la caries dental en niños" en *Revista Cubana Estomatológica.* 44(4).

Pumarola, A., (1991) *Microbiología y parasitología médica.* Barcelona. 2ª ed. Editorial Elsevier

Rioboo, G.S y García, M. (2004)"Estudio sobre la prevención quimioterapéutica de la caries dental con barnices de Clorhexidina y timol en niños de 5-8 años de edad, con riesgo alto de caries. Un reporte preliminar". en *Avances en odontoestomatología* 20(1) pp:41-53. [En línea] disponible en: http://Scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S021312852004000100005&script=sci_artext [Accesado el día 27 de agosto de 2008]

Sainz de Net, T y J. Ruiz, (2002) "Estudio de flora bacteriana en pacientes tratados ortodóncicamente, aplicando enjuagues bucales de *matricaria chamomilla*" en *Odontología Online* [En línea] disponible en:

<http://www.odontologia-online.com/casos/part/JRC/JRC01/jrc01.htm> [Accesado el día 11 de septiembre de 2008]

Serrano-Granger, J. y D. Herrera, (2005) "La placa dental como biofilm. ¿Cómo eliminarla?" en *RCOE*; 10(4) pp. 431-439.

Taddei-Bringas GA., Santillana-Macedo MA., Romero-Cancio JA., Romero-Téllez MB. (1999) "Aceptación y uso de herbolaria en medicina familiar" en *Salud Pub Mex*; 41(3): pp 216 - 20.

Tedesco, R. B., (2005) "¿Se debe limpiar la cavidad antes de restaurarla?" en revista *International Journal of Brazilian Dentistry*. [En línea] No 3, disponible en: <http://www.revistaclinica.com.br/edicao.php?lang=es&ed=3&pg=6> [Accesado el día 11 de septiembre de 2008]

Tolosa, L., Cañizares, E. (2002). "Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. En *Ars Panamericana*. 43 (1-2): pp 187 – 204.

Torrico, F.M., Gabay J., Suárez, A.I., Compagnone, R.S. (2003) "Estudio Toxicológico de *Cnidocolus chayamansa* McVaugh" en *Revista Facultad de Farmacia*" Vol. 66 No. 2 pp 58 - 66.

World Health Organization.(1995) "Tropical Disease Research". Report Geneva. P.125.

VII. ANEXOS

ANEXO 1

MATRIZ DE OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES					
VARIABLE	DEFINICIÓN	TIPO POR MEDICIÓN	ESCALA	USO	FUENTE
Concentración del extracto acuoso y metanólico de hojas de <i>Cnidocolus chayamansa</i> McVaugh (causa)	Las diferentes diluciones de los extractos metanólico y acuoso obtenidos de las hojas de <i>Cnidocolus Chayamansa</i> McVaugh	Cuantitativa discontinua	1:1 1:2 1:4 1:8 1:16 1:32 1:64 1:128 1:256	Determinar las concentraciones y disolventes capaces de inhibir el crecimiento bacteriano	Hoja de registro
Crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> (efecto)	Formación de colonias de <i>Streptococcus mutans</i> en el medio de cultivo	Cualitativa nominal	Hubo crecimiento No hubo crecimiento	Determinar si las concentraciones y solventes inhiben el crecimiento bacteriano	Hoja de registro

1. Operacionalización de las variables

ANEXO 2

Concentración 960 mg/mL		BIOENSAYOS														
		DILUCIONES DE LOS EXTRACTOS														
		Metanólico diluyente metanol			Acuoso diluyente agua destilada			Acuoso diluyente PBS			Clorhexidi na Control positivo			Caldo BHI Control Negativo		
1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
1:1	960 mg/mL	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
1:2	480 mg/mL	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
1:4	240 mg/mL	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
1:8	120 mg/mL	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
1:16	60 mg/mL	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
1:32	30 mg/mL	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
1:64	15 mg/mL	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
1:128	7.5 mg/mL	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
1:256	3.75 mg/mL	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Control Negativo		-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Control Positivo		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Control Esterilidad		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2. Resultados de los bioensayos