

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO

ESCUELA DE POSTGRADO DE MEDICINA



“Efecto antibacteriano *in vitro* de diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (tara) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 35668”.

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN ESTOMATOLOGÍA**

AUTOR(A):

CD. KARINA MERCEDES CENTURIÓN VILLAR.

ASESOR(A):

DR. MARCO REÁTEGUI NAVARRO.

**TRUJILLO - PERÚ
2015**

DEDICATORIA

A Dios, por guiarme y encaminarme en este proyecto, el cual ejecuté para obtener el Grado de Magister en Estomatología.

A mis queridos padres, por su amor, paciencia, comprensión, motivación y apoyo incondicional, a pesar de la distancia.

A mi abuelita Teresa, por su ternura y preocupación, encomendándome siempre a Dios y sus bendiciones.

A mi abuelito Artemio, por cuidarme, protegerme y orar por mí desde el cielo.

A mi enamorado, Ricardo Santillán Farfán, por su amor incondicional, te amo demasiado.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Marco Reátegui Navarro, por brindarme su tiempo, paciencia y comprensión durante todo el proceso de elaboración para poder culminar y presentar esta tesis para optar el Grado de Magister en Estomatología.

Permítame resaltar su calidad profesional y humana.

Al Mg. QF. Yuri Curo Vallejos, por colaborar como uno de mis coasesores durante la ejecución de la primera fase del Proyecto de Tesis en la prestigiosa Universidad Nacional de Trujillo.

A la Dra. Judith Roldán Rodríguez, por colaborar como una de mis coasesores durante la ejecución de la segunda fase del Proyecto de Tesis en la prestigiosa Universidad Nacional de Trujillo.

A mi hermanito Wilson Centurión Villar, por donar su sangre para la realización de este Proyecto de Tesis.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *Caesalpinia Spinosa* (Tara) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 35668.

La muestra estuvo conformada por 64 observaciones, distribuidas en 4 grupos de 4 placas Petri cada uno, en cada placa se colocó el porcentaje de concentración de estudio, frente a tres controles: control positivo (Clorhexidina al 0.12%), control negativo (Etanol) y un porcentaje de concentración similar (para comparación).

Los resultados mostraron que la concentración al 30% del extracto etanólico de *Caesalpinia* mostró el mayor halo de inhibición (34.5 mm) y concentración mínima inhibitoria.

La presente investigación concluye que el extracto etanólico de *Caesalpinia Spinosa* (Tara) posee efecto antibacteriano *in vitro* sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 35668.

PALABRAS CLAVES: *Caesalpinia Spinosa* (Tara), *Streptococcus mutans* y extracto etanólico.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the antibacterial effect in vitro of ethanol extract of *Caesalpinia Spinosa* (Tara) on *Streptococcus mutans* ATCC 35668.

The sample consisted of 64 observations in 4 groups of 4 Petri dishes each, on each plate the percentage concentration of study, compared with three controls are placed: positive control (Chlorhexidine 0.12%), negative control (Ethanol) and a percentage of similar concentration (for comparison).

The results showed that the concentration of 30% ethanolic extract of *Caesalpinia halo* showed the greatest inhibition (34.5 mm) and minimum inhibitory concentration.

This research concludes that the ethanol extract of *Caesalpinia Spinosa* (Tara) has in vitro antibacterial effect on *Streptococcus mutans* ATCC 35668.

KEY WORDS: *Caesalpinia Spinosa* (Tara), *Streptococcus mutans* and ethanol extract.

ÍNDICE

DEDICATORIA	<i>i</i>
AGRADECIMIENTOS	<i>ii</i>
RESUMEN	<i>iii</i>
ABSTRACT	<i>iv</i>
I. INTRODUCCIÓN.....	01
1. Formulación del Problema.....	08
2. Hipótesis de Investigación	08
3. Objetivos de Investigación.....	08
3.1. Objetivo General.....	08
3.2. Objetivos Específicos	08
II. DISEÑO METODOLÓGICO.....	09
1. Material de estudio	09
1.1. Tipo de investigación	09
1.2. Área de estudio.....	09
1.3. Definición de la población muestral	10
1.4. Consideraciones éticas	14

2.Métodos, Procedimiento e Instrumento de recolección de datos.	14
2.1. Método.....	14
2.2. Descripción del procedimiento.....	14
2.3. Instrumento de recolección de datos	18
3. Variables	19
4. Análisis estadístico de la información	20
II. RESULTADOS.....	21
III. DISCUSIÓN.....	23
IV. CONCLUSIONES.....	29
V. RECOMENDACIONES.....	29
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
ANEXOS	36

I. INTRODUCCIÓN:

La caries dental es una enfermedad del sistema estomatognático con mayor prevalencia en la población mundial, por lo que constituye uno de los mayores problemas de salud pública.^{1,14,34} La caries es una entidad patológica, infecciosa, crónica, progresiva y transmisible, de origen multifactorial, que es producida por la acción de microorganismos de la placa bacteriana, los cuales por su metabolismo producen ácido, especialmente por la fermentación de hidratos de carbono, originando la desmineralización gradual del esmalte seguida de la destrucción proteolítica rápida de la estructura dental, hasta llegar a la pérdida total del diente.^{1,31,33}

Los principales microorganismos de la placa bacteriana implicados en el inicio y desarrollo de la caries son: *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus sp.* y *Actinomyces sp.*^{14,15,18,39} Los estudios de Clark, desde 1924 hasta la fecha, diversas investigaciones han asociado al *S. mutans* con la formación de caries dental;^{9,38,40} de tal manera que, en la actualidad dicho microorganismo se considera como uno de los principales factores causales de dicha enfermedad en el ser humano.³⁷⁻⁴²

El *S. mutans* presenta diferentes características que son determinantes en su cariogenicidad, entre éstas tenemos: la producción de polisacáridos extracelulares a partir de la sacarosa, en especial los glucanos insolubles que son muy importantes en la colonización y mantenimiento de esta bacteria sobre el diente; posee elementos que determinan fenómenos de adhesión, agregación y congregación; la producción y metabolización de polisacáridos intracelulares, lo que le permite obtener energía y producir ácido durante largos períodos de tiempo; rápido metabolismo de los azúcares

a ácido láctico y otros ácidos orgánicos; poder acidógeno, acidófilo y acidúrico; también puede conseguir un pH crítico para la desmineralización del esmalte de manera más rápida que otro microorganismo de la placa.³⁷⁻⁴²

Estudios establecen que el control de la infección cariogénica; y consecuentemente, el control de la caries, pueden ser hechos dados a través de: la interrupción de la transmisión del *Streptococcus mutans*, su eliminación o reducción y la protección de las personas susceptibles, con la implementación de control dietético y el uso de sustancias antimicrobianas.^{8,42} En este enfoque se ha probado el uso de antibióticos: bacitricina, eritromicina, lincomicina, penicilina, espiramicina, tetraciclina, vancomicina, entre otros, mostrando enormes desventajas en este tipo de recurso, como los predecibles efectos de producción de cepas resistentes, de alteraciones ecológicas en la población bacteriana que resultan dañinas para el huésped (candidiasis), reacciones laterales, alergia, etc.⁸

Aun así, se investiga el uso de sustancias con propiedades antibacterianas específicas para la placa bacteriana, que no compitan con aquellos comúnmente utilizados en la terapéutica general.⁸

El efecto antibacteriano se define como la destrucción o impedimento del desarrollo de las bacterias a través del uso de diferentes químicos.⁶

Entre los más utilizados, en forma de colutorios y geles, tenemos al gluconato de clorhexidina, sanguinaria, triclosan, hexitidina, compuesto fenólico, etc. Dentro de los cuales, en diversos estudios, el gluconato de clorhexidina presenta mejores resultados en su capacidad de inhibir el crecimiento de *Streptococcus Mutans*,^{6,10,17} pero con el inconveniente de producir efectos tóxicos locales como: tinción de dientes y obturaciones, pigmentación del dorso de la lengua y con menor frecuencia,

descamación de la mucosa bucal, gusto amargo o modificación gustativa, sensación de quemadura, sequedad bucal e inflamación ocasional y transitoria de la parótida.^{2,30}

En este sentido, el advenimiento de la fitoterapia o terapia empírica con plantas medicinales para el tratamiento de diversas enfermedades, tanto orgánicas, nutricionales e infecciosas, ha planteado la necesidad de estudiarlas en el marco del rigor científico. En varias plantas se han visto empíricamente y determinado metodológicamente principios activos de naturaleza antimicrobiana diversa.⁷ Uno de estos recursos es la *Caesalpinia Spinosa* (Tara), ya que, técnicamente los extractos contienen una buena actividad cicatrizante, antioxidante y alto contenido de polifenoles totales.⁴

La Tara es un árbol siempre verde de 3-5 m. de altura, a veces más, con la copa globosa y ramas cortas, estriadas, puberulentas de jóvenes, con espinas cónicas recurvadas entre los nudos; tronco corto, a menudo ramificado desde la base y dando la apariencia de varios troncos, con la corteza rugosa de color gris.⁴

Las hojas bipinnati-compuestas, paripinnadas, con el raquis ligeramente tomentoso, con 2-5 pares de pinnas de 6-14 cm. de largo, articuladas y a menudo espinosas en el raquis, cada una con 5-8 pares de folíolos sésiles, oblongos o elípticos, de 2,5 - 4 x 1,5 - 2 cm., con la base oblicua, el margen entero, y obtusos o emarginados en el ápice; son de textura coriácea, de color verde oscuro y glabros en el haz, y algo más claros, con puntitos y a veces algo purulentos por el envés, donde la nerviación es más evidente.⁴

Las inflorescencias en racimos espiciformes terminales, densos, de 8-20 cm. de longitud, finamente pubescentes, agrupados en los extremos de las ramificaciones;

flores bisexuales, sobre pedicelos puberulentos de 5-10 mm. de largo, articulados bajo el cáliz.⁴

Cáliz caduco tras la antesis, de 6-7 mm. de largo, con 5 sépalos desiguales y unidos en la base formando un tubo, siendo el sépalo inferior de mayor tamaño, cóncavo (cuculado) y fuertemente dentado en el ápice (pectinado); corola con 5 pétalos de espatulados a oblongados, amarillos y rojizos, de 8-9 mm. de largo, el inferior reflexo; androceo con 10 estambres libres, con los filamentos pubescentes, amarillos, tan largos o más que los pétalos, con anteras subglobosas. Ovario súpero, ligeramente pubescente, unilocular, con estilo filiforme y estigma truncado.⁴

Fruto en legumbre indehiscente, oblonga, comprimida, de 6-10 x 1,5 – 2,5 cm. glabra o puberulente, con las semillas bien marcadas, rojizas en la madurez; las valvas son gruesas y carnosas al principio, tornándose luego esponjosas o coriáceas; semillas de 4 a 8, de orbiculares a ovadas, lisas, pardas, de unos 8-10 mm. de largo.⁴

El principio activo de la Tara contiene polisacáridos derivados de la manosa (mucílagos neutros), Galactomanana soluble con una relación galactosa – manosa intermedia entre la goma de algarroba y el guar.²³

Su clasificación científica es la siguiente: Reino: Plantae; División: Magnoliophyta; Clase: Magnoliopsida; Orden: Fabales; Familia: Fabaceae; Subfamilia: Caesalpinioideae; Tribu: Caesalpinieae, Género: *Caesalpinia*; Especie: *Caesalpinia Spinosa*; Nombre binominal: *Caesalpinia Spinosa* (Molina) Kuntze.²³

Los árboles de Tara son nativos de Sudamérica, especialmente en Venezuela, Colombia, Bolivia, Ecuador, Perú, Argentina y Chile. En nuestro país se ha usado la Tara desde tiempos prehispánicos como especie tintórea y desde época de la Colonia se la empleó en el curtido de cueros. Hoy en día, también es muy querido por sus

propiedades curativas, donde la parte del árbol que es más utilizada medicinalmente son las vainas trituradas.^{4,16}

El uso de la Tara tiene muchos enfoques: La medicina tradicional en nuestro País usa la Tara para combatir la amigdalitis, al hacer gárgaras con la infusión de las vainas maduras y como cicatrizante cuando se lavan heridas con dicha infusión. Además, la Tara es utilizada contra la estomatitis, lesiones cariosas, gripe y fiebre.³¹

Liu et al²⁴ (Perú, 2002), evaluaron la actividad antibacteriana *in vitro* tanto de los extractos de las vainas y semillas de *C. Spinosa* utilizando cepas Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*) y Gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebselia sp.* y *Shigella flexneri*) mediante técnica de difusión en disco; los extractos fueron preparados usando como solvente alcohol-acetona (1:1), encontrando actividad inhibitoria sobre cepas Gram positivas para el extracto de la vaina de la “tara”, más no para el de la semilla, pero no determinaron la concentración mínima inhibitoria. Esto respaldaría los resultados encontrados en el presente trabajo; teniendo en cuenta que, se ha utilizado la vaina, quedando así demostrada su actividad antibacteriana.

Infantes, Y.¹⁵ (2004). Determinó el efecto antiinflamatorio de una pasta dental conteniendo “tara” en el tratamiento de la gingivitis marginal crónica. Al grupo experimental compuesto por 64 niños se les aplicó esta pasta dental; el sangrado gingival desaparece al noveno día, el enrojecimiento y el edema gingival desaparece al doceavo día y la presencia de puntillado al décimo quinto día, contra lo que ocurre al aplicarse una pasta dental placebo (grupo control).

Sampaio, F.³³ (2009). En la región amazónica de Brasil los frutos de *Caesalpinia ferrea* Martius fueron utilizados ampliamente como antimicrobiano para curar algunas infecciones orales. En este estudio se determinó la actividad antimicrobiana del extracto de la *C. ferrea* Martius contra los microorganismos patógenos orales más comunes. Los valores de la concentración mínima inhibitoria para *Candida albicans*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S.oralis* y *Lactobacillus casei* fueron de 25.0, 40.0, 66.0, 100.0, 66.0 µg/mL, respectivamente. Se utilizó la clorhexidina como control positivo y solución salina como control negativo. El extracto de *C. ferrea* Martius inhibió el crecimiento in vitro de las bacterias patógenas orales.

Liu H.²³ (Perú, 2010), evaluó la actividad antibacteriana in vitro de extractos de *Caesalpinia Spinosa* "tara" y *Eucalyptus sp.* "eucalipto" utilizando cepas bacterianas Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*) y Gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella sp.* y *Shigella flexneri*). Se utilizó como solvente de extracción una mezcla de alcohol-acetona (1:1) y se analizó la actividad biológica de los extractos obtenidos mediante la técnica de difusión en disco. La cáscara del fruto de *Caesalpinia Spinosa* y las hojas del *Eucalyptus sp.* mostraron una actividad selectiva sobre las bacterias Gram positivas evaluadas.

Santiago J.³² (Perú, 2012), realizó un estudio en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos sobre la utilización de extractos de Tara (*Caesalpinia Spinosa*) en la confección de apósitos para el tratamiento de quemaduras, aplicándola directamente en pacientes humanos; obteniendo resultados que indican un 85% de efectos

benéficos de la Tara en el proceso de retracción de quemaduras y cicatrización de heridas.

Debido a que la caries dental es una de las enfermedades orales con mayor prevalencia en el mundo y considerando al *Streptococcus mutans* como el principal microorganismo responsable del inicio de este proceso, se han realizado estudios científicos para encontrar la forma de eliminarlo o controlarlo; sin embargo, aún no se ha encontrado un agente ideal que permita lograr estos objetivos.

Por ende, hoy en día, se mantiene una permanente búsqueda de alternativas terapéuticas en la biodiversidad de plantas medicinales; una de ellas es la *Caesalpinia spinosa*, que por poseer polifenoles, es usada frecuentemente de manera empírica en el campo odontológico debido a sus propiedades curativas para combatir procesos inflamatorios e infecciosos producidos por la caries dental.

Por todo lo expuesto con anterioridad, se plantea este estudio para determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (Tara) sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 35668; ya que, la utilización de un producto natural tendría un alto beneficio para la salud oral con un costo reducido; y de esta manera, evitar daños tóxicos colaterales.

1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA:

¿Cuál es el efecto antibacteriano *in vitro* de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (tara) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 35668?

2. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN:

El extracto etanólico de *Caesalpinia Spinosa* (tara) a diferentes concentraciones posee efecto antibacteriano *in vitro* frente a *Streptococcus mutans* ATCC 35668.

3. OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN:

3.1. OBJETIVO GENERAL:

Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* de diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (tara) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 35668.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar la susceptibilidad *in vitro* producido por los extractos etanólicos a las concentraciones de 5%, 10%, 20% y 30% de *Caesalpinia spinosa* (tara) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 35668.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria *in vitro* del aceite esencial de *Caesalpinia Spinosa* (tara) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 35668 en sus diversas concentraciones.

II. DISEÑO METODOLÓGICO:

1. Material de estudio.

Material biológico:

- *Streptococcus mutans* ATCC 35668, que representa al lote 969-36-2, producido por Microbiologics™.
- *Caesalpinia spinosa* “tara” fue colectada de la Hacienda “El Centurión” ubicada en el caserío Condebamba, valle Chimín, Provincia Cajabamba, Departamento Cajamarca – Perú.

Fármaco:

- Clorhexidina 0,12%.

1.1. Tipo de investigación.

Según el período en que se capta la información	Según la evolución del fenómeno estudiado	Según la comparación de poblaciones	Según la interferencia del investigador en el estudio
PROSPECTIVO	TRANSVERSAL	COMPARATIVO	EXPERIMENTAL

1.2. Área de estudio.

- El Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo.

- El Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Microbiología de la Universidad Nacional de Trujillo.

1.3. Definición de la población muestral:

1.3.1. Características generales:

1.3.1.1. Criterios de inclusión:

- Tubo de ensayo con la macrodilución de caldo tioglicolato de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 35668 y la dilución del extracto etanólico de *Caesalpinia Spinosa* (tara) a la concentración correspondiente.
- Placa petri con la macrodilución en agar soya tripticasa del microorganismo de prueba: *Streptococcus mutans* ATCC 35668 y la dilución del extracto etanólico de *Caesalpinia Spinosa* (tara) a la concentración correspondiente.
- Placa petri en medio agar sangre del microorganismo de prueba: *Streptococcus mutans* ATCC 35668 y la dilución del extracto etanólico de *Caesalpinia Spinosa* (tara) a la concentración correspondiente.

1.3.1.2. Criterios de exclusión:

- Tubo de ensayo con la macrodilución que presente algún tipo de daño o rajadura en su estructura durante el proceso de incubación.

- Tubo de ensayo con la macrodilución cuyo resultado en el proceso de incubación pueda ser dudoso.
- Placa petri con la macrodilución que presente algún tipo de daño o rajadura en su estructura durante el proceso de incubación.
- Placa petri con la macrodilución cuyo resultado en el proceso de incubación pueda ser dudoso.

1.3.1.3. Criterios de eliminación:

- Tubo de ensayo con la macrodilución que sufra deterioro, daño o rajadura durante la conservación y los procedimientos que no permitan su medición posterior.
- Placa petri con la macrodilución que sufra deterioro, daño o rajadura durante la conservación y los procedimientos que no permitan su medición posterior.

1.3.2. Diseño estadístico de muestreo:

1.3.2.1. Unidad de análisis.

- Constituido por cada placa petri con la concentración respectiva del extracto etanólico de *Caesalpinia Spinosa* (tara) con siembras de *Streptococcus mutans* ATCC 35668.

- Constituido por cada tubo de ensayo con la concentración respectiva del extracto etanólico de *Caesalpinia Spinosa* (tara) con siembras de *Streptococcus mutans* ATCC 35668.

1.3.2.2. Unidad de muestreo.

- Constituido por cada placa petri con la concentración respectiva del extracto etanólico de *Caesalpinia Spinosa* (tara) con siembras de *Streptococcus mutans* ATCC 35668.
- Constituido por cada tubo de ensayo con la concentración respectiva del extracto etanólico de *Caesalpinia Spinosa* (tara) con siembras de *Streptococcus mutans* ATCC 35668.

1.3.2.3. Tamaño muestral.

La muestra estuvo constituida por 64 observaciones, distribuidas en 16 placas petri (cuatro placas por grupo), en cada placa se colocó el porcentaje de concentración del estudio frente a tres controles: control positivo (Clorhexidina al 0.12%), control negativo (Etanol) y un porcentaje de concentración similar (para comparación).

El tamaño de la muestra fue calculada según la fórmula estadística siguiente:

$$n = (Z_{\alpha/2} + Z\beta)^2 \delta^2 = (1.96+0.84)^2 (2.85)^2$$

$$n = 64.13 = 64 \text{ observaciones en total.}$$

Donde:

$$Z_{\alpha/2} = 1.96 \text{ (para una confiabilidad de 95\%)}$$

$$Z\beta = 0.84 \text{ (para un poder de prueba de 80\%)}$$

$$\delta = 2.85 \text{ (variación relativa máxima entre tratamientos)*}$$

* δ : Variación relativa entre tratamientos que toma valores entre 1 a 3.

1.3.3. Método de selección.

Se dividieron en cuatro grupos:

- GRUPO A (al 5%): Se emplearon 4 placas petri, donde cada una fue dividida en cuatro partes (concentración al 5%, control positivo-Clorhexidina al 0.12%, control negativo-OH y un porcentaje de concentración similar para comparación).
- GRUPO B (al 10%): Se emplearon 4 placas petri, donde cada una fue dividida en cuatro partes (concentración al 10%, control positivo-Clorhexidina al 0.12%, control negativo-OH y un porcentaje de concentración similar para comparación).
- GRUPO C (al 20%): Se emplearon 4 placas petri, donde cada una fue dividida en cuatro partes (concentración al 20%, control positivo-Clorhexidina al 0.12%, control negativo-OH y un porcentaje de concentración similar para comparación).

- GRUPO D (al 30%): Se emplearon 4 placas petri, donde cada una fue dividida en cuatro partes (concentración al 30%, control positivo-Clorhexidina al 0.12%, control negativo-OH y un porcentaje de concentración similar para comparación).

1.4. Consideraciones éticas:

Para la ejecución de la presente investigación, no se consideran los principios de la Declaración de Helsinki, puesto que, es un estudio in vitro.

2. Métodos, Procedimiento e Instrumento de recolección de datos:

2.1. Método:

Observacional.

2.2. Descripción del procedimiento:

2.2.1. Obtención del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (tara):

- **Colecta de vainas de *Caesalpinia spinosa* (tara):**

Las vainas de *Caesalpinia spinosa* (tara) fueron colectadas de la Hacienda “El Centurión” de la Provincia Cajabamba (Cajamarca-Perú), además, se colectaron frutos y hojas de la planta para su posterior identificación taxonómica en el Herbarium Truxillensis de la Universidad Nacional de Trujillo.

- **Obtención del extracto etanólico de vainas de *Caesalpinia spinosa* (tara):**

Las vainas de *Caesalpinia spinosa* (tara) fueron limpiadas con alcohol al 70%, secadas a 40°C y trituradas hasta obtener un fino polvo.

La preparación del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (tara) se realizó en el Laboratorio de Química de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo. El triturado fue macerado en etanol 50° durante 14 días, con una agitación cada cuatro horas, lo obtenido fue considerado como “*solución madre*” para la preparación de las concentraciones. Asimismo, la solución fue filtrada en una bomba al vacío y se dejó en reposo durante 8 días a 4°C. (ANEXO 2)

- Luego, se prepararon las concentraciones 5, 10, 20 y 30% de *Caesalpinia spinosa* (tara), se utilizó como diluyente etanol absoluto. Las soluciones obtenidas fueron esterilizados con filtros bacteriológicos de 0.02 µm, para evitar que otros microorganismos contaminen el cultivo de *Streptococcus mutans* ATCC 35668. (ANEXO 3)

2.2.2. Activación de la cepa liofilizada de *Streptococcus mutans* ATCC 35668:

La cepa liofilizada ATCC 35668 de *S. mutans* fue obtenida de los laboratorios de Microbiologics™. (ANEXO 1)

La cepa fue activada en caldo cerebro-corazón (BHI) durante 48 horas a 37°C; posteriormente, esta fue sembrada en placas con medio Muller Hinton enriquecido con sangre al 5% por 24 horas para obtener colonias aisladas.

2.2.3. Ejecución de los ensayos de las diferentes concentraciones de *Caesalpinia spinosa* (tara) frente a *Streptococcus mutans*:

- **Establecimiento de los grupos experimentales y controles:**

Se establecieron cuatro grupos experimentales (A: 5%, B: 10%, C: 20% y D: 30%) de *Caesalpinia spinosa* (tara), así mismo, se formularon dos grupos controles: un control negativo (etanol absoluto) y otro positivo (Clorhexidina al 0,12%).

- **Ejecución de los ensayos:**

De una colonia aislada se procedió a realizar una siembra en tubos con Muller Hinton-Sangre 5% para obtener la cantidad necesaria de la bacteria para realizar la suspensión para los ensayos.

Una vez obtenida las colonias esta fue suspendida en BHI y comparada con el Tubo N° 2 del Nefelómetro de McFarland, para

su posterior siembra en placas con Muller Hinton enriquecido con sangre al 5%.

Luego, de la siembra las placas fueron perforadas (cuatro orificios equidistantes por placa; control positivo y negativo y dos grupos experimentales) con un sacabocados para la posterior inoculación de los grupos experimentales y controles.

Se inocularon en cada pocillo 10 μ L de las diferentes concentraciones del grupo experimental y controles, las cultivos fueron incubadas a 37° C durante 24 horas.

- **Lectura de los ensayos:**

Para la lectura de los halos de inhibición de cada grupo experimental (A: 5%, B: 10%, C: 20% y D: 30%) de *Caesalpinia spinosa* (tara) y controles (positivo y negativo), se utilizó una regla milimetrada (marca PRISMA) abarcando el diámetro del halo.

2.2.4. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de *Streptococcus mutans* ATCC 35668 sobre las diferentes concentraciones del extracto de *Caesalpinia spinosa* (tara):

- **Ejecución de los ensayos:**

Se realizó una suspensión madre de colonia de *S. mutans* en BHI, con una turbidez 0,5 del Standard de Mac Farland, las cuales

fueron sembradas en placas Petri con un espesor uniforme de 4mm que contenían Agar Mueller-Hinton con sangre de conejo al 10% desfibrinada: el medio fue distribuido antisépticamente en cuatro placas para cada concentración de *Caesalpinia spinosa* (tara) en los diferentes grupos (A: 5%, B: 10%, C: 20% y D: 30%). Luego fueron introducidas a una incubadora a 37° C en donde fueron mantenidos por un tiempo de 24 horas.

- **Lectura de los ensayos:**

La lectura de las placas se realizó a través del conteo de colonias (ufc: unidades formadoras de colonias) y se reportaron en ufc/mL.

2.3. Instrumento de recolección de datos:

Regla milimetrada marca PRISMA.

3. Variables:

VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIONES	DEFINICIÓN OPERACIONAL (INDICADORES)	TIPO		ESCALA DE MEDICIÓN
				SEGÚN SU NATURALEZA	SEGÚN SU FUNCION	
Extracto etanólico de <i>Caesalpinia Spinosa</i> (TARA)	Son soluciones de metabolitos obtenidos de las vainas de <i>Caesalpinia Spinosa</i> (TARA) en etanol a 50° y luego diluidos cada uno de ellos en etanol, en las concentraciones correspondientes al presente estudio. ²²		<p>Concentración</p> <p>5%</p> <p>10%</p> <p>20%</p> <p>30%</p>	Cualitativa	Independiente	Ordinal
Efecto antibacteria -no in vitro de <i>Streptococcus mutans</i> .	Susceptibilidad del <i>Streptococcus Mutans</i> ATCC 35668 bajo la acción de las diferentes diluciones de los extractos etanólicos de <i>Caesalpinia Spinosa</i> (TARA). ¹⁵	<p>CMI</p> <p>Susceptibilidad</p>	<p>Conteo de UFC</p> <p>Diámetro de Halo de Inhibición medido en mm.</p>	<p>Numérica</p> <p>Numérica</p>	<p>Dependiente</p> <p>Dependiente</p>	<p>De razón</p> <p>De razón</p>

4. Análisis estadístico de la información:

Se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar la normalidad de los datos obtenidos, obteniéndose $p < 0.05$; por lo cual, al no seguir una distribución normal, aplicamos las pruebas NO PARAMÉTRICAS de Kruskal-Wallis para determinar diferencias significativas entre tratamientos, posteriormente se realizó la prueba de comparaciones múltiples no paramétrica de Dunn, si p es $< 5\%$, la diferencia se considera significativa. Se utilizaron los programas estadísticos IBM SPSS Statistics 20 para Windows, G-Stat 2.0 y Microsoft Office Excel 2013.

III. RESULTADOS:

En la Tabla 1 muestran las medianas según las pruebas no paramétricas (ANEXO 4) de los diámetros de los halos de inhibición de diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* frente a *Streptococcus mutans* ATCC 35668 a las 24 horas en donde la Concentración al 30% mostró el mayor halo 34.5mm, para la menor concentración al 5% mostró un halo de 16 mm, los halos de inhibición de la Clorhexidina 0.12% tienen una mediana de 12 mm. (ANEXO 5)

En la Tabla 2 y Tabla 3, se determinó que el extracto etanólico de *C. spinosa* a la concentración de 30% es la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). (ANEXO 6)

Tabla 1. Halos de inhibición del efecto antimicrobiano *in vitro* del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* frente a *Streptococcus mutans* ATCC 35668 según las diferentes concentraciones (24 horas de incubación).

Concentración	C+	5%	10%	20%	30%
Mediana	12mm	16mm	18mm	29,5mm	34,5mm

Tabla 2. Diferencia entre diámetros de inhibición según niveles de concentración del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* frente a *Streptococcus mutans* ATCC 35668.

Grupo	n	Suma de Rangos (Kruskal-Wallis) Rm	Rango Medio
Control positivo (P)	8	36.0000	4.5000
5% (A)	8	106.5000	13.3125
10% (B)	8	157.5000	19.6875
20% (C)	8	240.5000	30.0625
30% (D)	8	310.5000	38.8125

$$P = 0.0004E-4$$

Tabla 3. Comparaciones múltiples de diámetros de halo según el nivel de concentración al 95%.

Grupo	n	Rango Medio	Grupos Homogéneos	MEDIANAS
Control positivo (P)	8	4.5000	X	12 mm
5% (A)	8	13.3125	XX	16 mm
10% (B)	8	19.6875	XX	18 mm
20% (C)	8	30.0625	XXX	29.5 mm
30% (D)	8	38.8125	XXX	34.5 mm

IV. DISCUSIÓN:

La *Caesalpinia spinosa* (tara), tiene diversos usos tradicionales, como por ejemplo: la infusión de las vainas maduras, se utiliza para la amigdalitis en forma de gárgaras; la infusión de las hojas, se utiliza para la estomatitis; la cocción de las ramas tiernas, se usa como abortivo, igualmente se prepara una bebida que se toma como depurador del colesterol; el cocimiento de las vainas, se usan para secar las llagas de las piernas. En general, es también muy utilizada para el tratamiento de infecciones vaginales y micóticas, para el lavado de ojos inflamados, para el dolor de estómago y diarreas, para el reumatismo y resfriado, para curar úlceras, como cicatrizante, entre otros⁷.

El efecto antibacteriano se consideró en función al diámetro de los halos de inhibición de crecimiento del microorganismo: nula (-) si fue inferior o igual a 8 mm; sensibilidad límite (sensible = +) de 9 a 14 mm; media (muy sensible = ++) de 15 a 19 mm y sumamente sensible (S.S. = +++) si fue igual o superior a 20 mm¹⁴. Al evaluar el efecto antimicrobiano *in vitro* del extracto etanólico de *C. spinosa* frente a *S. mutans* ATCC 35668, se evidenció que la actividad antibacteriana del extracto en las cuatro concentraciones ensayadas (5%, 10%, 20% y 30%) (Tabla 1) fue mayor, en comparación al control positivo (Clorhexidina al 0.12%) y control negativo (etanol absoluto); se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre el uso de la Clorhexidina al 0,12% y las concentraciones al 20% y 30% de la *C. Spinosa*.

La actividad antibacteriana de la Clorhexidina al 0,12% que generalmente se usa como antiséptico oral, reportada por otros autores tanto en cepas nativas como

cepas referenciales, es casi similar; lo que concordaría con los resultados obtenidos en el presente trabajo, donde el halo de inhibición fue de 12.3 ± 0.5 de diámetro para *S. mutans* ATCC 2652263.

Borja⁴ reporta halos de inhibición de $15,5 \text{ mm} \pm 2,03 \text{ mm}$ para cepas nativas; asimismo, Mayta y Sacsquispe³¹ reportan halos de inhibición de 11.77 mm para *Streptococcus mutans* ATCC 25175, lo que explicaría que no existe variación en cuanto a cepas nativas y caracterizadas o referenciales, las cuales serían muy sensibles al producto.

El efecto antibacteriano del extracto de *C. Spinosa* (tara) se debe a que las vainas contienen taninos hidrolizables (galotaninos) en un rango de 40% a 60%, las cuales puede variar según las condiciones ecológicas en las que vegeta, la hidrólisis de estos taninos conduce a la separación del ácido gálico; asimismo, se ha aislado galato de etilo y cuatro galatos del ácido químico correspondiente 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-galoilquínico¹⁸. Las semillas contienen hidrocoloides galactomanánicos ricos en componentes monoméricos, como: galactosa y manosa³⁵.

En investigaciones realizadas se encontró que los taninos son metabolitos que se encuentran en diferentes partes de la planta. Estos son solubles en agua, etanol, acetona; y otorgan resistencia a la planta contra parásitos. Para el hombre es útil por su actividad farmacológica, como: antihemorrágico local, antidiarreico y antibacteriano; ya que, al combinarse con las proteínas de la membrana celular de las bacterias son desnaturalizadas. Los flavonoides son otros principios activos encontrados en el estudio fitoquímico del extracto de *C. Spinosa*. Estos

son pigmentos que derivan de un núcleo básico denominado flacona, que es uno de los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos dentro de los constituyentes naturales de las plantas conocidos también como antoxantinas, solubles en agua, etanol y otros disolventes orgánicos; los flavonoides tienen acción farmacológica, como: dilatadores coronarios, espasmolítica, antihepatotóxica, diurética y antibacteriana¹⁴. Los taninos de este vegetal son utilizados en la curtiembre; debido a que sus extractos evitan la putrefacción gracias a que los taninos constituyen un grupo de sustancias fenólicas poliméricas en su forma hidrolizable, y condensados con propiedades antimicóticas y bactericidas¹⁰.

Kloucek et al¹⁷, demostraron el efecto antimicrobiano de extractos etanólicos al 80% de nueve plantas obtenidos por maceración durante 5 días, una de las muestras ensayadas fue la *C. Spinosa* (vainas), para ello utilizaron cinco cepas Gram positivas y tres Gram negativas usando el método de microdilución del caldo de cultivo; los resultados son poco relevantes para la muestra mencionada a excepción del ensayo contra *Enterococcus faecalis* en el que se observó una CMI de 0,5 mg/mL, mientras que para *Bacillus cereus* fue de 8 mg/mL, y de 16 mg/mL para *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Bacteroides fragilis*; cabe indicar que estos autores utilizaron *C. Spinosa* de procedencia peruana. En el presente trabajo, la CMI se encontró con la dilución al 30%; estas variaciones en su efecto podría deberse a que existe una gran variabilidad en composición y acción, como consecuencia de variaciones de la composición de su hábitat; principalmente el suelo que contribuye con los nutrientes.

Otro ensayo incluyó además del extracto etanólico de las vainas de tara, las fracciones de acetato de etilo, butanólica y acuosa, los cuales fueron evaluados por su actividad *in vitro*, en presencia o ausencia de oxacilina, contra la bacteria *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. Se observó que la fracción de acetato de etilo fue la más activa, por lo que fue sometida posteriormente a un fraccionamiento biodirigido, llegando así 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. La comparación de las estructuras de los dos compuestos activos permite sugerir que los grupos galoilos en las posiciones C-3 y C-5 son importantes para la actividad biológica. Igualmente, un estudio similar condujo al aislamiento del galato de etilo como componente activo de la vaina de tara, lo que condujo a que los autores hicieran ensayos comparativos con diferentes galatos de alquilo, demostrando que la longitud de la cadena alquílica juega un rol importante en esta actividad biológica³⁴.

En el campo de la odontología, la *C. Spinosa* ha sido evaluada para el tratamiento curativo de la gingivitis crónica con preparaciones; a manera tradicional, el uso de las vainas mostraron su eficacia al desaparecer los indicadores clínicos de la inflamación gingival en pocas sesiones (6-8 días, 3-4 sesiones) en comparación con el grupo control que utilizó el doble de tiempo, por lo que se demuestra con este ensayo, la propiedad hemostática, antiséptica, antiinflamatoria, anestésica y cicatrizante de la tara³¹.

También, se ha demostrado el efecto antiinflamatorio de una pasta dental conteniendo tara en el tratamiento de la gingivitis marginal crónica, al término del cual todos los 64 niños a los que se le aplicaron esta pasta dental; desaparece el sangrado gingival al noveno día, el enrojecimiento y el edema gingival desaparece al doceavo día y la presencia de puntillado al día 15, contra lo que ocurre al aplicarse una pasta dental placebo¹⁵.

Huarino²⁸ ha demostrado el efecto antibacteriano del extracto alcohólico de las vainas de la *C. Spinosa* en las concentraciones 6.25mg/mL, 12.5mg/ mL, 25mg/ mL, 50mg/ mL y 75mg/ mL sobre la flora bacteriana mixta salival, encontrando valores de los halos de inhibición entre los valores límite y sumamente sensible, concluyendo que a medida que se aumenta la concentración del extracto alcohólico se obtiene un mayor diámetro del halo de inhibición; los resultados en el presente trabajo para *Streptococcus mutans* ATCC 35668, determinaron halos de inhibición de mayor diámetro (16 mm al 5%) (Tabla 1); y en cuanto al análisis estadístico, concuerda en la diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los grupos experimentales y grupo control (Clorhexidina 0.12% y alcohol 50°).

La sensibilidad *in vitro* de las bacterias a los antimicrobianos se puede ensayar mediante varios métodos disponibles en el laboratorio, uno de ellos es la técnica de dilución en agar, la cual permite determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado. El valor de CMI obtenido por este método, orienta al clínico sobre qué concentración de biocida necesita alcanzar en el sitio de la infección para inhibir al microorganismo infectante. La CMI encontrada en este trabajo (30%)

(Tabla 2 y Tabla 3), indicaría que a mayor concentración es mejor su efecto antibacteriano, y posiblemente no tenga efecto tóxico, pues se han determinado valores de DL50 que corresponden a taninos de origen no especificado y cuyos valores son: DL50 oral en ratas 3100 mg/kg, DL50 cutáneo en ratas 7000 mg/kg y DL50 intraperitoneal en ratas 360 mg/kg⁷.

Cabe destacar que una gran proporción de productos sintetizados con carácter antimicrobiano, mostraron en las pruebas de sensibilidad *in vitro* una CMI alta (100-1000 mg/L) en comparación con las obtenidas por antimicrobianos convencionales; lo que explicaría la CMI encontrada con *C. spinosa* (30%) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 35668; por la existencia en los microorganismos, de compuestos anfipáticos que actuarían como auténticas bombas de expulsión de un amplio espectro de sustancias, incluidas aquellas con actividad antimicrobiana¹⁰.

Los extractos etanólicos de *C. Spininosa* empleados a concentraciones superiores al 5%, evidencian su potencial uso en estomatología. De esta manera, al contrastar los resultados en la acción antibacteriana del extracto etanólico, confirma la hipótesis.

Por lo antes expuesto, el presente estudio sirve como base para que posteriormente se continúe ampliando los conocimientos sobre el empleo de este vegetal en la prevención y tratamiento de ciertas patologías de la cavidad oral. Por lo tanto, la acción antibacteriana del extracto observado sugiere ser de importante uso como un complemento en el control de ciertos patógenos orales.

V. CONCLUSIONES:

- ✓ El extracto etanólico de las vainas de *C.Spinosa* a las concentraciones de 5%, 10%, 20% y 30% tienen efecto antibacteriano sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 35668.
- ✓ La concentración Mínima Inhibitoria de *C.Spinosa* fue del 30% sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 35668.
- ✓ Se demostró en este estudio que la *C.Spinosa* podría ser una opción de tratamiento natural para prevenir la caries dental.

VI. RECOMENDACIONES:

- ✓ Realizar más estudios que demuestren las propiedades de las plantas medicinales para que tengan un respaldo científico y puedan utilizarse como posible medicación en la terapéutica clínica odontológica.
- ✓ Evaluar el efecto antibacteriano en concentraciones inferiores similares a la Clorhexidina al 0.12%, para que sea empleado también como colutorio bucal.
- ✓ Realizar un estudio de toxicidad de los extractos de *C.Spinosa* en seres humanos.
- ✓ Realizar el estudio utilizando cepas nativas, con la finalidad de evaluar la variación entre cepas referenciales y cepas nativas (homogéneas).
- ✓ Realizar fórmulas preparadas para hacer ensayos en cavidad oral de seres humanos, previo estudio ético.
- ✓ Contribuir con la producción científica odontológica, en el Perú, relacionada con las publicaciones y las propiedades de las plantas medicinales empleadas en cavidad oral.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

1. Albala, C., & Del Río, V. (1998). Transición Nutricional en Chile. *Revista Chilena Nutricional*, 25(3), 24-28.
2. Albertos, J.M., Junquera, L.M., Albertos, M.T., Olay, S., & López-Arranz, E. (1996). La clorhexidina. Perspectiva actual. *An Odontoestomatol*, 5, 217-224.
3. Boncun, B., Zari, G., Villalobos, J., De los Ríos, E., & Ruíz, S. (2006). Guía de Práctica de Farmacognosia I. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo.
4. Borja, S. (2011). Actividad antibacteriana y concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del *Cymbopogon citratus* frente al *Streptococcus mutans in vitro* . Tesis para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista. Universidad Nacional Federico Villarreal. Lima.
5. Brack, A. (2002). Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. Perú.
6. Brooks, G., Batel, J., & Morse, S. (1999). *Microbiología Médica de Jawest, Meldick y Adelberg*. (16^a ed.). México: El Manual Moderno.
7. Cabello, L. (2009). Monografía para el cultivo de la tara *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze. Perú biodiverso. Lima, Perú.
8. Camejo, M. (1999). Sensibilidad *in vitro* de *Streptococcus mutans* a Sanguinaria, Compuesto fenólico y Clorhexidina. *Acta Odontológica Venezolana*, 37(2), 33-37.

9. Díaz, K., & Moromi, H. (2005). Determinación antibacteriana *in vitro* de *Menthostachys mollis* (Muña) frente a bacterias orales de importancia estomatológica. *Odontología Sanmarquina*, 8(2), 3-5.
10. Domingo, D., & Lopez-Brea, M. Plantas con acción antimicrobiana. *Rev Esp Quimioterap* 2003; 16(4):385-393.
11. Escobar, F. (2004). *Odontología Pediátrica*. Caracas, Colombia: Amolca.
12. Gregory, R.L., Rahamanam, & Avery, D.R. (1998). Effect at restorative treatment on mutans streptococci and IgA antibodies. *Pediatric Dental*, 20(4), 273-277.
13. Herrera, D., Roldán, S., Santacruz, I., O'Connor, A., & Sanz-Alonso, M. (2001). Actividad antimicrobiana en saliva de cuatro colutorios con clorhexidina. *Periodoncia*. Barcelona, España, 11, 193-202.
14. Huarino, M. (2011). Efecto antibacteriano de *Caesalpinia spinosa* (tara) sobre flora salival mixta. Tesis para obtener el título de Cirujano Dentista. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima.
15. Infantes, Y. (2004). Tratamiento de la Gingivitis Marginal Crónica con Pasta Dental de *Caesalpinia spinosa* "tara" en Niños de 8 a 10 Años. Tesis Facultad de Odontología. USMP. Lima.
16. Joaquín, F., & Canseco, J. (2001). Caries dental. La enfermedad oculta. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. México, 58(10), 673-676.

17. Kloucek, P., Polezny, Z., Svobodova, B., Vlkova, E., & Kokoska, L. (2005). Antibacterial Screening of Some Peruvian Medicinal Plants Used in Callería District. *J of Ethnopharm.* 99:309-312.
18. Kondo, K., Takaishi, Y., Shibata, H., & Higuti, T. (2006). ILSMRs (intensifier of beta-lactam susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) from Tara (*Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze) *J Phytotherapy And Phytopharmacology* 13:209-212.
19. Koneman, W., Allen, S., Dowel, V., Jarda, W., Sonden, H., & Winn, W. (1988). *Diagnóstico Microbiológico* (3ª ed.). Argentina: Panamericana.
20. Kuklinski, C. (2000). *Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona: Ediciones Omega.
21. Liébana, U.J. (1995). *Microbiología Oral*. Madrid: Interamericana McGraw-Hill.
22. Linossier, A., Gajardo, M., & Olavarría, J. (1996). Paleomicrobiological study in dental calculus: *Streptococcus mutans*. *Scann Micros*, 10, 1005-1114.
23. Liu, H., Lengua, L., León, G., La Torre, C., Huapaya, J., & Chauca, J. (2002). Evaluación de la Actividad Antibacteriana in vitro de los Extractos de *Caesalpinia Spinosa* “tara” y *Eucalyptus* sp. “eucalipto”. *Revista Horizonte Médico*. 2: 1,2.
24. Liu, H., (2010). Evaluación de la Actividad Antibacteriana in vitro de los Extractos de *Caesalpinia spinosa* “tara” y *Eucalyptus* sp. “eucalipto”. Lima, Perú: Facultad de Medicina Humana de la Universidad de san Martín de Porres.

25. Løe, H. (2000). Oral hygiene in the prevention of caries and periodontal disease. *International Dental Journal*, 50, 129-139.
26. Loesche, W.J. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiology Review*, 50, 353-380.
27. Miranda, M., & Cuellar, A. (2001). *Farmacognosia y Productos Naturales*. Habana: Editorial Félix Valera.
28. Norman, G., & Streiner, D. (1998). *Bioestadística*. Madrid: Harcourt Brace.
29. O'Sullivan, D.M., & Thibodean, E.A. (1996). Caries experience and mutans Streptococci as indicators of caries incidence. *Pediatric Dental*, 18(5), 371-374.
30. Palomer, L. (2006). Caries dental en el niño: Una enfermedad contagiosa. *Revista Chilena Pediatría*, 77(1), 56-60.
31. Rojas, J. (1999). Estudio Clínico Experimental del Tratamiento de la Gingivitis Crónica con *Caesalpinia spinosa* "tara". Tesis Facultad de Odontología. USMP. Lima.
32. Santiago, J. (2012). Utilización de extractos de Tara (*Caesalpinia spinosa*) en la formulación de apósitos para el tratamiento de quemaduras. *Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Química Orgánica*. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos de Lima.
33. Sampaio, C. (2009). In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. *J. of Ethnopharmacology*; 124(2): 289-294.

34. Shi, W., Jewett, A., & Nume, W.R. (1998). Rapid and quantitative detection of streptococcus mutans with species specific monoclonal antibodies. *Hybridoma*, 17(4), 365-371.
35. Shibata, H., Kondo, K., Katsuyama, R., Kawazoe, K., Sato, Y., Murakami, K., Takaishi, Y., Arakaki, N., & Higuti, T. (2005). Alkyl Gallates, Intensifiers of beta-Lactam Susceptibility in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antitumoral Agents and Chemotherapy*. 49(2): 549-555.
36. Siccha, A., Lock, O., & Molina, M. (1994). Determinación Cuantitativa de Galactomananos en las Gomas de Tara, Charán y Uña de Gato, por Cromatografía de Gases. *Bol Soc Quim del Perú*. 60:39-43.
37. Snedecor, G., & Cochran, W. (1997). *Métodos Estadísticos* (4ª ed.). México: Compañía Editorial Continental.
38. Sonnenwith, L., & Jareltt, L. (1993). *Métodos y Diagnóstico de Laboratorio Clínico*. Tomo II. (8ª ed.). Buenos Aires, Argentina: Panamericana.
39. Stephen, K.W. (1993). Caries in young populations worldwide: In: Bowen WH & Tabak LA Editors. *Cariology for the nineties* (pp. 37-50). New York: University of Rochester Press.
40. Tanzer, J., Livingston, J., & Thompson, A. (2001). The microbiology of primary dental caries in humans. *Journal of Dental Education*, 65, 1028-1037.
41. Vaananen, M.K., Markkanen, M.A., Tuovivien, V.J., Kulla, A.M., Karinpaa, A.M., Luomalt, E.A., et al. (1994). Dental caries and mutans

- streptococci in relation to plasma ascorbic acid. *Scandinavian Journal of Dental Research*, 102(2), 103-8.
42. Van, H., Truen, G., & Van't, M. (1996). A meta-analysis of clinical studies on the caries-inhibiting effect of chlorhexidine treatment. *Journal of Dental Research*, 75, 790-5.
43. Weyne, S. (1991). *Operatoria Dental de Baratieri Luis* (2^a ed.). Sao Paulo: Quintessence.

ANEXOS

ANEXO 1



217 Osseo Avenue North • St. Cloud, Minnesota 56303
(320) 253-1640 • (800) 599-BUGS (2847) • Fax (320) 253-6250
www.microbiologics.com • info@mbi2000.com

ACREDITATION

17025

Good news to all,

MicroBioLogics, Inc. has improved our shipping policy to increase inventory of lower volume, but very important microorganisms. MicroBioLogics will begin shipping products with no less than 6 months of remaining shelf-life.

This change will decrease backorders, decrease delivery time, control costs and eventually lower costs of the rarely ordered strains. With increased global demand of the most popular microorganism strains, we must concentrate our production attention on more frequently ordered products.

If you have any questions relating to this change, please contact MicroBioLogics or your authorized MicroBioLogics distributor. As always, all MicroBioLogics® products are fully guaranteed to the last day of the shelf life, so buy with confidence.

No other company has the range of microorganism strains, the speed of delivery and global Quality System Credentials of MicroBioLogics.

We thank you for your continued support and the opportunity to serve you.

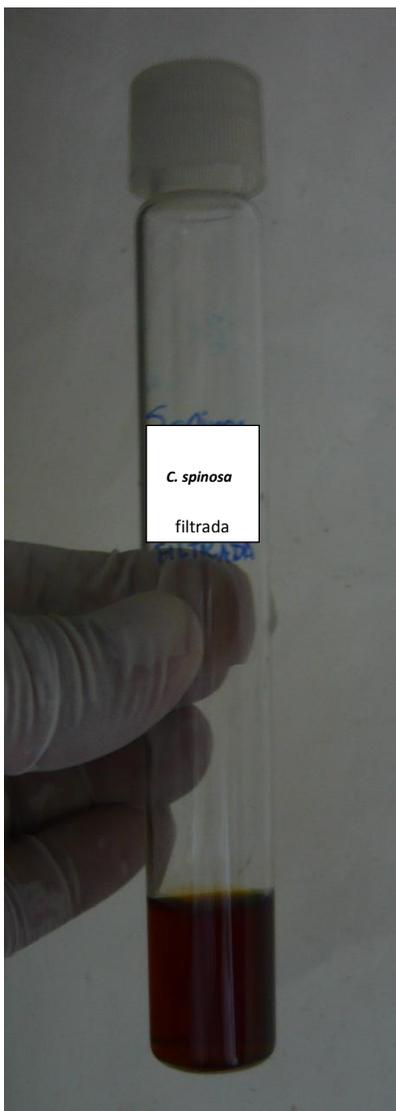
Best Regards,

The MicroBioLogics Team



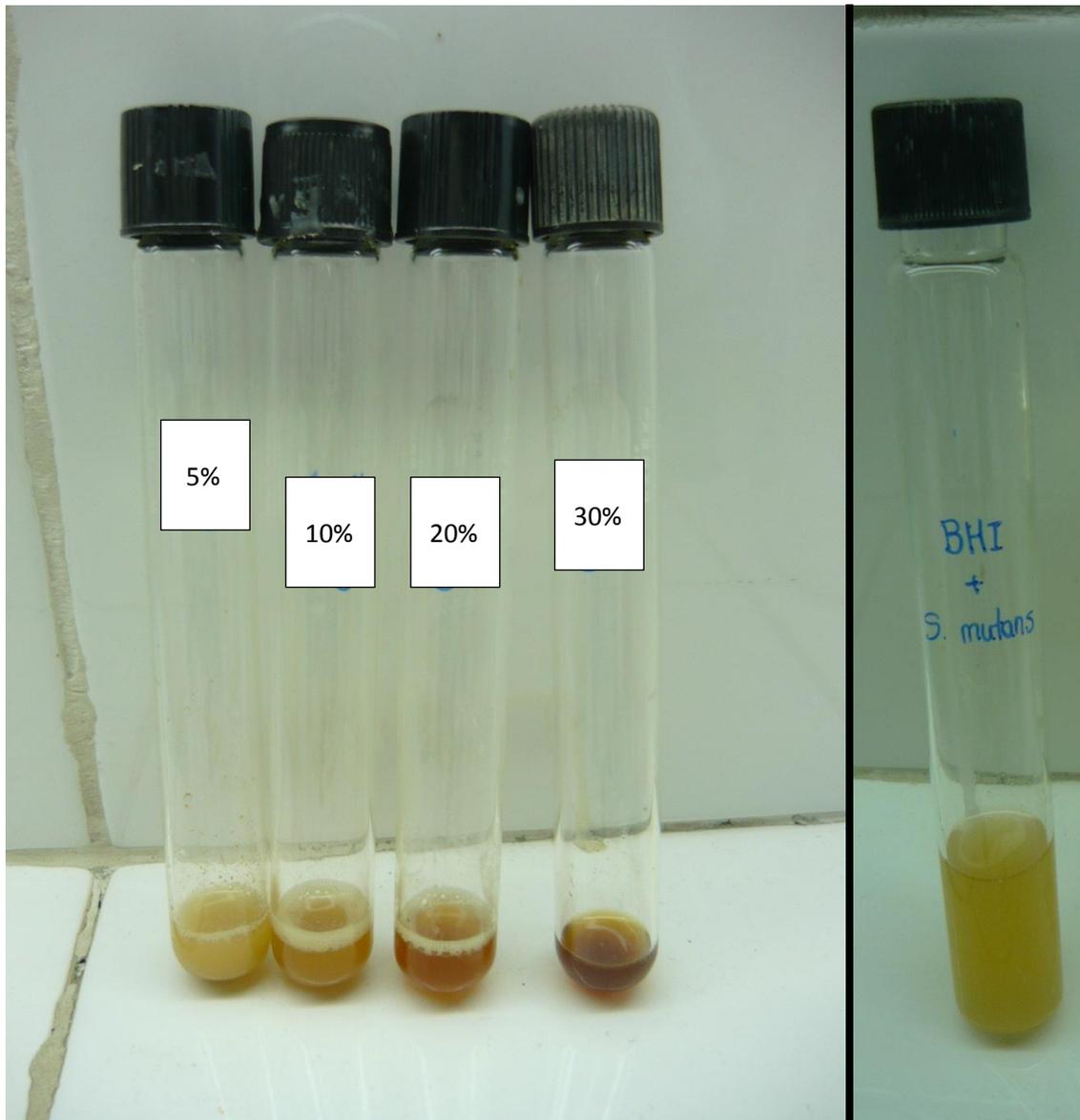
ANEXO 2

Solución madre de *Caesalpinia spinosa* (tara).



ANEXO 3

Concentración mínima inhibitoria de *Streptococcus mutans* ATCC 35668 frente a las concentraciones de 5, 10, 20 y 30% del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (tara) y solución madre de *S. mutans* (SM).



ANEXO 4

Pruebas no paramétricas.

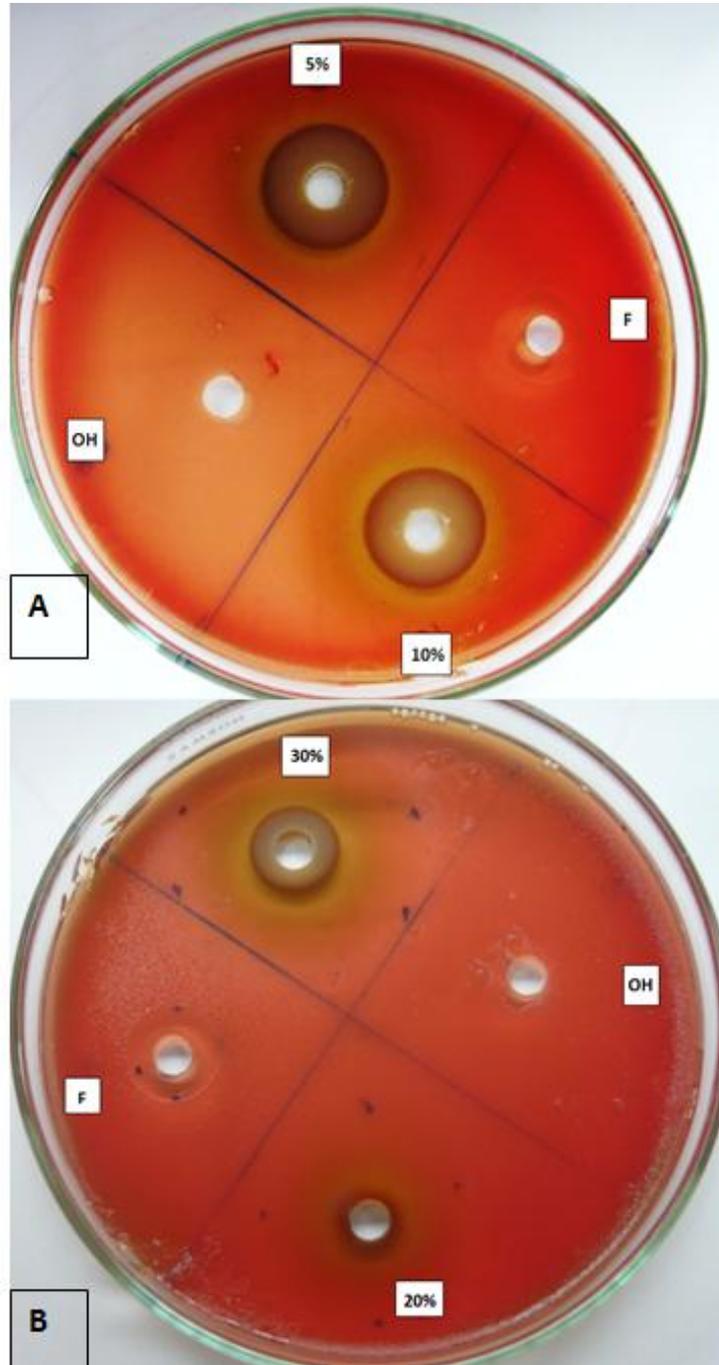
Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra.

		halo
N		48
Parámetros normales ^{a,b}	Media	24,1458
	Desviación típica	9,51368
Diferencias más extremas	Absoluta	,206
	Positiva	,206
	Negativa	-,153
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,425
Sig. asintót. (bilateral)		,034

- a. La distribución de contraste es la Normal.
 b. Se han calculado a partir de los datos.

ANEXO 5

Halos de inhibición de crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 35668 a las concentraciones de 5 y 10% (A) y 20y 30% (B) de *Caesalpinia spinosa* “tara” y control positivo (F: Clorhexidina 0.12%) y negativo (OH: etanol absoluto).



ANEXO 6

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de extractos de *Caesalpinia spinosa* frente a *Streptococcus mutans* ATCC 35668 en agar Muller-Hinton enriquecido con sangre 5% e incubado durante 24 horas, (A) Placa control sin extracto (B) extracto al 5% (C) extracto al 20 % y (D) extracto al 30% (nótese que no hay crecimiento bacteriano).

