

ACTIVIDAD BACTERICIDA DE *Castela texana* SOBRE BACTERIAS RELACIONADAS A CARIES DENTAL Y GINGIVITIS

*ACTIVITY ON BACTERICIDAL Castile Texas A DENTAL DECAY RELATED BACTERIA
AND GINGIVITIS*

María Porfiria Barrón González

Universidad Autónoma de Nuevo León

maria.barrongn@uanl.edu.mx

Yadira Quiñones Gutiérrez

Universidad Autónoma de Nuevo León

yadira.quinonesg@uanl.edu.mx

RESUMEN

Las caries dentales afectan a cualquier persona y son la causa más importante de pérdida de los dientes. Las bacterias son esenciales para el desarrollo de una lesión cariosa, en tanto que la gingivitis es una forma de enfermedad periodontal que involucra inflamación e infección que destruyen los tejidos de soporte de los dientes, esta patología se debe a la acumulación de un material adherente compuesto de bacterias, moco y residuos de alimentos que se desarrolla en las áreas expuestas del diente. Por otra parte, *Castela texana* es capaz de suprimir el crecimiento de varios microorganismos patógenos que afectan la salud del hombre y que se ha demostrado que al ingerir el extracto acuoso, este no presenta efectos secundarios nocivos al hombre. De acuerdo a los resultados obtenidos la mejor opción de estudio para bacterias relacionadas a gingivitis es el extracto metanólico de corteza y para bacterias relacionadas con caries dental es el extracto metanólico de tallo, los cuales presentan respectivamente la mayor actividad bactericida y el menor potencial tóxico sobre *Artemia salina*.

Palabras clave: caries, gingivitis, *Castela texana*, *Artemia salina*.

Abstract

Dental caries affect anyone and are the leading cause of tooth loss. The bacteria are essential for the development of a carious lesion, while the gingivitis is a form of periodontal disease involves inflammation and infection destroy the tissues that support the teeth, this pathology is caused by the buildup of an adherent composite of bacteria, mucus and food debris that develops on the exposed parts of the teeth. Moreover, Texas is Castile ability to suppress the growth of several pathogens that affect human health and has shown that ingesting the extract, this man has no harmful side effects. According to the results the best choice Study gingivitis related to the methanol extract of bark and bacteria associated with dental caries is the methanol extract of the stem, which have respectively the highest bactericidal activity and lower toxic potential bacteria on Artemia saline.

Key words: caries, gingivitis, Texas Castile, Artemia salina.

Fecha recepción: Diciembre 2012

Fecha aceptación: Febrero 2013

INTRODUCCIÓN

Caries

Las enfermedades bucales de mayor prevalencia de acuerdo con la OMS son la caries dental y la enfermedad periodontal (NOM-013-SSA2-1994).

La caries dental es uno de los trastornos más comunes, después del resfriado común. Suele aparecer en los niños y en los adultos jóvenes, pero puede afectar a cualquier persona y es la causa más importante de pérdida de los dientes en las personas más jóvenes.

Las bacterias suelen estar presentes en la boca y convierten todos los alimentos, especialmente los azúcares y almidones, en ácidos. Las bacterias, el ácido, los residuos de comida y la saliva se combinan en la boca para formar una sustancia pegajosa llamada placa,

que se adhiere a los dientes y que es más prominente en los molares posteriores, justo encima de la línea de la encía. Esto es en todos los dientes y en los bordes de las obturaciones. Si la placa que no es eliminada de los dientes se mineraliza y se convierte en sarro, este irrita las encías, produce gingivitis y posteriormente periodontitis.

Las bacterias son esenciales para el desarrollo de una lesión por caries. El principal microorganismo patógeno en todos los tipos de caries dental es el *Streptococcus mutans*, el cual presenta varias propiedades importantes como son: sintetiza polisacáridos insolubles de la sacarosa, es un formador homofermentante de ácido láctico, coloniza en la superficie de los dientes, es más acidúrico que otros estreptococos. Esto no quiere decir que es el único formador de polisacáridos pues también se ha encontrado en cepas no cariogénicas. Otros microorganismos asociados a la caries dental son *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis*, *Actinomyces viscosus* y *Lactobacillus acidophilus*.

La palabra caries proviene del latín y significa podredumbre. Es quizá la enfermedad más frecuente del hombre. La caries dental es una enfermedad que, en todas las épocas y particularmente en todo el mundo, muestra una enorme magnitud con respecto a todas las posibles alteraciones de la salud bucal (MINSAP, 1995).

La caries que es una patología considerada como de las más comunes en el ser humano por su alta prevalencia, es uno de los factores etiológicos más importantes de la inflamación pulpar y periapical. Esta se puede definir como una degeneración progresiva y localizada de los dientes, que se inicia por desmineralización superficial por ácidos orgánicos, como el láctico, elaborados por microorganismos de la placa (Seltzer S. y Belder I., 1987).

Entre los factores de riesgo de la enfermedad se encuentran: alto grado de infección del *Streptococcus mutans*, la pobre resistencia del esmalte, el apiñamiento dentario, la experiencia anterior de caries, la mala higiene bucal, la ingestión de alimentos azucarados, entre otros (Rodríguez, 1997). Las dietas ricas en productos refinados como azúcares,

pasteles y alimentos muy elaborados facilitan la aparición de caries (Hernández, G. 1998). La caries es generada por algunas bacterias que producen ácidos, en especial la *Streptococcus mutans*. Su fuente nutritiva la constituyen carbohidratos fermentables como la sacarosa (Newbrown, 1972).

La incidencia de caries dental ha experimentado un rapidísimo incremento debido a la continua transformación del modo de vida y de la alimentación; el cambio de las actividades agrícolas y, por lo tanto, el empleo de cereales como principio básico de la alimentación, junto con la cocción y los procesos de elaboración de los alimentos, han favorecido que aumente la incidencia de esta enfermedad, la cual ha alcanzado niveles alarmantes que, de acuerdo con las estadísticas, representan del 75 al 85 % (Hernández, 1998). Es poca la información disponible sobre las modificaciones en los índices de caries que presenta la población mexicana; de igual manera, existen pocos datos sobre los hábitos de higiene bucal de esta población (Salas L. y Rivas Gutiérrez J., 2001). Sin embargo, de acuerdo con la clasificación internacional de la Organización Mundial de la Salud (OMS), México se encuentra entre los países de alto rango en frecuencia de enfermedades bucales (NOM-013-SSA2-1994).

La cavidad bucal constituye el primer segmento del aparato digestivo que comunica el mundo exterior con el esófago. Las diferentes condiciones que pueden imperar en esta cavidad, junto con los cambios constantes en el estilo de vida y la edad del hombre, configuran un ecosistema expuesto a constantes modificaciones y a una gran variedad de problemas microbiológicos debido a su naturaleza abierta y dinámica (Prieto J. y Calvo A. 2004).

La aparición de caries dental está relacionada con bacterias bucales, especialmente cariogénicas como el *Streptococcus mutans*. Estudios antibacterianos preliminares revelaron que los extractos de nuez moscada, especie vegetal ampliamente cultivada por su aroma y sabor, poseen fuerte actividad inhibidora contra el *S. mutans* (Chung J.Y. et al., 2006).

Palombo E. en 2011 reportó una gran cantidad de extractos vegetales con actividad antimicrobiana sobre bacterias que afectan la cavidad bucal y Eguizábal et al., (2001), reportó la acción antibacteriana del extracto etanólico de propóleo peruano en solución de 0.8 % encontrando que tiene una mejor acción antibacteriana contra *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*, que la clorhexidina al 0.12 %.

Gingivitis

La gingivitis es la inflamación no dolorosa o degeneración del tejido de la encía. En esta, el tejido que hay entre los dientes se vuelve tumefacto y desigual; el tejido en la línea de la encía (el punto en donde el diente se encuentra con la encía) se vuelve más oscuro, y la encía sangra con facilidad (Ferri, 2005). La gingivitis se debe a los efectos a largo plazo de los depósitos de placa, un material adherente compuesto de bacterias, moco y residuos de alimentos que se desarrolla en las áreas expuestas del diente. La placa es la principal causa de caries dental y, si no se remueve, se convierte en un depósito duro denominado sarro que queda atrapado en la base del diente. La placa y el sarro irritan e inflaman las encías.

Las bacterias y las toxinas que estas producen hacen que las encías se infecten, se inflamen y se tornen sensibles. Una lesión a las encías por cualquier causa, incluyendo el cepillado y el uso de seda dental demasiado fuerte, puede ocasionar gingivitis. Está asociada principalmente a una defectuosa o incorrecta higiene bucal, que facilita la formación de la denominada placa dental, la cual se forma por la acumulación de restos alimenticios, células epiteliales muertas y mucina. Esta placa dental proporciona un medio ideal para el desarrollo de numerosos microorganismos responsables de ocasionar la gingivitis y las caries.

Las bacterias presentes en la placa dentobacteriana constituyen agentes claves en la patogénesis de la enfermedad periodontal (Nombelli, 1994). En numerosas investigaciones se plantea que el sangrado gingival puede ser reducido o eliminado mediante un cuidadoso control de la placa dentobacteriana (Catón, 1998).

En estudios realizados en microscopio de campo oscuro y de fase, se ha señalado la superioridad de formas cocos e inmóviles en sitios gingivales sanos y que en los enfermos predominan las formas móviles y espiroquetas, medianas y largas (Santamarina, 1988).

Loe en 1964 demostró que al eliminar la higiene bucal, los pacientes desarrollaron gingivitis la cual aumentó en severidad con el paso de los días en este estudio. Loe cambió la flora bacteriana por una más agresiva anaeróbica tipo Gram negativa y al restituir la higiene recuperaron la salud gingival. Esto demostró la reversibilidad de la gingivitis (http://www.radiodent.cl/periodoncia/clasificacion_y_caracteristicas_de_gingivitis_y_%20periodontitis.pdf, accesado sept-2013).

La inmunosupresión se considera como el factor predominante en la etiología de la gingivitis ulceronecrotizante (GUN). Una respuesta del huésped alterada por factores predisponentes sistémicos permite un incremento en el desarrollo bacteriano y la invasión tisular (Murayama Y. et al., 2000).

Pero existen factores predisponentes secundarios necesarios para la manifestación de la patología, como estrés emocional, ansiedad, malnutrición, enfermedades sistémicas (endocrinas, sanguíneas, venéreas, HIV), convalecencia de enfermedades, intoxicaciones metálicas, tabaquismo, alcoholismo, trastornos del sueño, trauma tisular, mala higiene bucal con elevados niveles de placa bacteriana, antecedentes de gingivitis y periodontitis (Rowland, 1999).

La gingivitis en sus inicios es fácil de controlar, basta con una correcta técnica de cepillado y el uso de enjuagues con clorhexidina como coadyuvante para mejorar la higiene y la destrucción de bacterias. La utilización adecuada y regular de la caléndula en el tratamiento de la gingivitis resulta eficaz, ya que disminuye los signos de la enfermedad, como son sangrado, inflamación y coloración de las encías (Machado M.A. et al., 2010).

El tratamiento tópico actual incluye la aplicación de solución iodo-povidona, en combinación con tratamientos locales meticulosos, de raíz y remoción de material de debridación seguido por enjuagues bucales con clorhexidina (Lucht, E. et al., 1998).

Además del tratamiento, que incluye raspado y alisado de la raíz, quizás se utilicen medicamentos, pero estos no siempre pueden reemplazar la cirugía. En algunos casos, dependiendo de la gravedad de la enfermedad de las encías, el profesional especializado podrá recomendar un tratamiento quirúrgico. Será necesario realizar estudios de larga duración para determinar si el uso de medicamentos reduce la necesidad de la intervención quirúrgica y si estos son eficaces durante periodos prolongados.

Fitoterapia

La naturaleza es una gran fuente de riqueza, las plantas representan un potencial para el origen y la explotación de nuevos agentes antimicrobianos (Haslam et al., 1989). Las plantas medicinales son consideradas como una fuente potencial de nuevas drogas quimioterapéuticas debido a su contenido fotoquímico y a su poco o nulo efecto tóxico (Beg, 2000).

Los productos de las plantas poseen numerosas propiedades farmacológicas, incluyendo además otras propiedades como antimicrobianos, antimutagénicos, antivirales, antimicóticos; entre otras., también son utilizados en el tratamiento de forúnculos, del acné, de la gingivitis, de la candidiasis vaginal y para evitar la formación de placa dental y la habilidad de promover la cicatrización de heridas (Dunsmore, K.E. 2001 y Chen, X. 2003).

Es común el empleo de partes vegetales con la finalidad de obtener varios efectos terapéuticos y que han sido respaldados por estudios científicos. Entre las variadas aplicaciones terapéuticas de los vegetales se incluye la acción antibacteriana. Los hallazgos obtenidos del estudio de vegetales con potencial terapéutico podrán servir como instrumento de apoyo médico-social para un mayor grupo poblacional, principalmente el más carente, estando también la industria farmacéutica más interesada en los conocimientos de esta área (De Paula J. y Martínez A. 2000).

Castela texana

Castela texana, conocida comúnmente como “chaparro amargo”, ha sido utilizada en México desde hace muchos años para tratar la disentería de tipo amibiano. Se utiliza para la falta de apetito, fiebre, amibiasis y como descongestionante. El chaparro amargo se puede usar por tiempo prolongado sin producir efectos secundarios nocivos, ni irritaciones gástricas o intestinales y además es utilizado principalmente para tratar amibiasis diarreica ocasionada por el protozoo parásito *Entamoeba histolytica*.

Castela texana (chaparro amargoso) es un arbusto leñoso, ramoso, espinoso con corteza grisácea y amarga; hojas alternas ovadas o elípticas; flores solitarias, rojas o moradas y frutos globosos; pertenece a la familia de las Simarubáceas. Florece de agosto a septiembre y fructifica de septiembre a octubre.

Se distribuye desde Texas, en Estados Unidos, hasta Oaxaca en México y en el norte de Sudamérica. En México se encuentra en los estados de Chihuahua, Coahuila, Durango, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí y Tamaulipas. En Sudamérica se le ha encontrado al norte de Colombia y en zonas adyacentes de Venezuela.

La acción terapéutica de Castela texana está bien establecida, según Maximino Martínez “ejerce una notable acción contra la disentería amibiana y, sobre todo, en casos crónicos, las amibas se inmovilizan y mueren poco después. Es 25 veces menos tóxica que la emetina (según M. Gretchen Sprecher, de la Universidad de Nebraska) y se utiliza en el tratamiento contra las amibas. Estudios médicos y farmacológicos realizados en México entre 1910 y 1920, encontraron en esta planta tres glucósidos: castellana, castelagemina y castelamarina, los cuales demostraron tener una acción efectiva como potente antidiarreico específico contra las amibas, con la ventaja de ser 25 veces menos tóxico que los medicamentos químicos y sin presentar efectos irritantes (<http://adrianguzman.com.mx/index.php?option>, accesado nov-2013).

En 1847, cuando las tropas norteamericanas al mando del general Zacarías Taylor habían invadido el territorio nacional atravesando Texas e internándose en el actual estado de Tamaulipas, algunos médicos militares de dicho ejército se percataron de que ciertos

indígenas empleaban el cocimiento del chaparro amargo para tratar fiebres, afecciones de la piel, diarreas y en particular disenterías (López, 1928).

Castela texana constituye una alternativa de tratamiento de esta enfermedad cuando hay resistencia a otros fármacos y además en mujeres con tricomoniasis durante el primer trimestre del embarazo (Calzado-Flores 1998a). Se ha descartado también experimentalmente el efecto tóxico de la planta (Calzado-Flores. 1998b).

Entre las propiedades de la C. texana analizadas experimentalmente se ha postulado la de inhibir el enquistamiento de las amibas *Entamoeba invadens* la cual ha sido empleada como modelo de estudio para extrapolar resultados a *Entamoeba histolytica* (Calzado-Flores, 1998). Se ha encontrado también que su extracto acuoso tiene efecto antioxidante y posiblemente es protector a nivel hepático y, además, que combate los parásitos de *Trichomonas vaginalis*, la enfermedad de transmisión sexual más prevalente en el mundo, que afecta a ambos sexos pero principalmente a la mujer.

El extracto metanólico de Castela texana, presenta bajo condiciones axénicas in vitro actividad amebicida sobre *Entamoeba histolytica* tanto en el estadio de trofozoíto como de quiste o estructura semejante a quiste, siendo 50 veces más efectivo que la droga de elección contra E. histolytica: el metronidazol (Barrón et al; 2007).

En la actualidad, se recomienda preparar una infusión de hojas y tallos contra la diarrea, disentería y amibiasis, al igual que como astringente. Para tratar las amibas se ponen a hervir en un 1/4 de litro de agua unos trozos de tallo y se toma una taza de té en ayunas, durante 9 mañanas. También se encuentra en cápsulas en establecimientos comerciales.

Los aceites esenciales y extractos vegetales cubren un amplio espectro de efectos farmacológicos, mostrando diversas propiedades como antiinflamatorio, antioxidantes y anticancerígenos. Otras actividades biológicas se reportan como biocidas en contra de una amplia gama de microorganismos como bacterias, hongos, virus, protozoarios insectos y plantas (Kalemba y Kunicka, 2003).

Artemia salina

Artemia salina, es un pequeño crustáceo que vive en lugares con alta concentración de sal (35 g por litro) es decir, salobres, sus huevos protegidos por quistes se incuban a una temperatura de 28 ° C y necesita de una oxigenación constante. El adulto de *A. salina* alcanza un centímetro de largo en promedio y su vida media es de un año. Este rápido desarrollo y la habilidad de sus huevos para soportar largos períodos en condiciones desfavorables, la han hecho un modelo invaluable en investigaciones biológicas, algunas incluso desarrolladas en el espacio exterior. Dentro de la investigación fitoquímica, el doctor Jerry L. McLaughlin y colaboradores dan comienzo a una nueva etapa, con la introducción de algunos bioensayos primarios como el de *Artemia salina*, comenzando así la época caracterizada por los “screenings” y el “fraccionamiento” (Meyer et al., 1982; McLaughlin et al., 1988).

Recientemente se han publicado estudios que sugieren evaluar como primer paso, mediante un rastreo toxicológico con pruebas de toxicidad aguda en diversas especies (Guilhermino et al., 2000), lo cual permite determinar de manera preliminar la toxicidad de nuevos y diferentes químicos en mamíferos; una de las ventajas es que es económico y, por lo tanto, se reduce la cantidad de mamíferos (ratones) que son empleados.

El bioensayo de “letalidad de larvas de *Artemia salina*” consiste en la determinación de la DL50 (Dosis Letal Media) de los extractos de las plantas, aquellos que presentan una DL50 <1000 mg/L es muy probable que contengan uno o varios compuestos activos, por lo que es necesario fraccionarlos para repetir bioensayos a concentraciones menores (McLaughlin et al., 1988). Además es una prueba preliminar, la cual detecta un amplio rango de compuestos activos (antitumoral, antibiótico, etcétera); es un método simple, rápido, de bajo costo, reproducible y utilizado como un método selectivo para conocer la toxicidad de los extractos de las plantas antes de pasar a las pruebas con las líneas celulares.

Justificación de la investigación

Las caries dentales y la gingivitis son unos de los trastornos más comunes en el ser humano; después del resfriado común, pueden afectar a cualquier persona y son la causa más importante de pérdida de los dientes. En México la prevalencia de caries es de 48 % y de pérdida dental de 23.8 % en la población joven, por lo que este trabajo considera importante la validación científica de la evaluación de los extractos crudos obtenidos de *Castela texana*, arbusto empleado tradicionalmente en la herbolaria mexicana para tratar diversas afecciones en el hombre. Los resultados que se obtuvieron en esta investigación, servirán en un futuro para elucidar y saber las características de las moléculas o compuestos que presenten actividad contra bacterias de caries dental y gingivitis a partir de los extractos de *Castela texana*.

HIPÓTESIS

Los extractos metanólicos de corteza, hoja y tallo de *Castela texana* inhiben el crecimiento de bacterias relacionadas con la caries dental y la gingivitis.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la actividad biológica de los extractos metanólicos de corteza, hoja y tallo de *Castela texana* sobre bacterias relacionadas con la gingivitis y la caries dental.

Objetivos específicos

Castela texana

- Colectar en campo la planta de *Castela texana*.
- Obtener los extractos metanólicos de corteza, hoja y tallo de *Castela texana*.
- Realizar las pruebas de identificación de grupos funcionales (pruebas coloridas) para cada extracto.
- Preparar la solución madre de los extractos metanólicos de *Castela texana*.

Bacterias

- Toma muestra de caries dental y gingivitis.

- Aislar bacterias relacionadas con la caries dental y la gingivitis.
- Establecer la cinética de crecimiento de las bacterias relacionadas con la caries dental y la gingivitis.
- Identificar bacterias relacionadas con gingivitis y caries dental.

Bioensayos

- Determinar la DL_{50} [mg/mL] de los extractos metanólicos de corteza, hoja y tallo de *Castela texana* sobre *Artemia salina*.
- Determinar la actividad biológica de los extractos metanólicos de *Castela texana* sobre las bacterias relacionadas con caries dental y gingivitis.

Análisis estadístico

- Realizar el análisis Probit mediante el estudio estadístico de regresión lineal empleando el programa Microsoft Excel 2007, para determinar la CL_{50} de cada extracto correspondiente sobre los cultivos axénicos *in vitro* de bacterias relacionadas con caries dental y gingivitis.

METODOLOGÍA

Material biológico

- a) Tallo, hojas y corteza de *Castela texana*.
- b) Bacterias aisladas de muestras de pacientes con gingivitis y caries dental.
- c) *Artemia salina*.

El arbusto de *Castela texana* fue recolectado en la comunidad de San Isidro, Villa de Hidalgo, San Luis Potosí.

Una vez recolectado el material vegetativo se procedió conforme a los siguientes pasos:

- 1.-Lavado Se enjuagó el material vegetal al chorro de agua corriente, hasta eliminar cualquier residuo ajeno al material vegetativo.
- 2.-Secado Se extendió el material vegetal y se secó a temperatura ambiente.
- 3.-Trituración Se trituró el material seco empleando un molino de mano y exacto.
- 4.-Extracción La obtención de extractos a partir de *Castela texana* se realizó como se describe a continuación:
 - a) Extractos metanólicos. Se pesó 200 g tanto de corteza, hoja, raíz y tallo de *Castela texana* y se les agregó 300 mL de metanol. Se mantuvieron los matraces en un agitador shaker por 7 días a temperatura ambiente. Después de este tiempo se filtró cada extracto en filtros Whatman No. 2. El filtrado se dejó evaporar hasta secar a temperatura ambiente. Se

obtuvo el extracto mediante un raspado de los residuos y se almacenó en frascos de vidrio hasta su uso.

- b) Tamizaje químico parcial: A cada extracto se le realizó las pruebas de identificación química propuestas por Domínguez (1973). El extracto obtenido en cada planta se sometió a las “pruebas coloridas” o pruebas de identificación química.

Insaturaciones: Prueba del KMnO_4 : Se disolvió 1-2 mg de la muestra en 1 mL de agua, acetona o metanol y se añade, gota a gota, una solución de KMnO_4 al 2 % en agua. La prueba es positiva si se observa decoloración o formación de precipitado café en menos de 1 minuto, resultado de la formación de dióxido de manganeso.

Grupo carbonilo: Prueba de la 2,4-Dinitrofenilhidracina: De 1 a 10 mg, de la muestra se disuelven en etanol, se le añade una solución saturada de 2-4- dinitrofenilhidracina en HCl 6N; la formación de un precipitado amarillo o naranja indica la presencia del grupo carbonilo.

Oxhidrilos fenólicos (taninos vegetales): Prueba del FeCl_3 : Se disuelven 1-2 mg de la muestra en 1 mL de agua o etanol y después se añaden unas gotas de cloruro de hierro al 12.5% en agua. La aparición de un precipitado rojo, azul-violeta o verde, es considerada positivo.

Esteroles y triterpenos: Prueba de Liebermann-Burchard: Se mezcla 1 ml de anhídrido acético y uno de cloroformo, se enfriarán a 0° y se les añade una gota de ácido sulfúrico. Se añade, gota a gota, este reactivo a la muestra o su solución clorofórmica. Si hay formación de colores azul, verde, rojo, anaranjado, etcétera, los que cambian con el tiempo, la prueba será positiva. El orden y tiempo de aparición (0, 1, 5, 20, 60 minutos) tiene cierto valor diagnóstico; así, una coloración amarilla después de 15 minutos, parece corresponder a C-14-metilo y una variación -7 insaturación. La prueba es positiva con esteroides que contienen 2 enlaces dobles conjugados, que los pueden formar por una o dos deshidrataciones con isomerización. Prueba de Salkowski: Similar a la de Liebermann-Burchard, la muestra (1-2 mg) en contacto con 1.0 ml de ácido sulfúrico, se desarrollan colores amarillo o rojo para esteroides y metilesteroides.

Carbohidratos: Prueba de Molish: A 1-2 mg. de la muestra se le agrega, gota a gota, el reactivo de Molish (alfa-naftol al 1% en etanol), luego 1 mL de ácido sulfúrico por las paredes. La prueba es positiva cuando se forma un anillo coloreado en la interfase de color púrpura. Prueba de las cumarinas: Se disuelve 1-2 mg de muestra en NaOH al 10 %; si aparece una coloración amarilla que desaparece al acidular es positiva.

Lactonas: Se disuelven de 1-2 mg de muestra en solución alcohólica de NaOH al 10 %. Un color amarillo o anaranjado que se pierde o desaparece al agregar unas gotas de HCl indica la presencia de un anillo lactónico.

Sesquiterpenlactonas: Prueba de Baljet: A 2-3 mg, del compuesto se le agregan 3-4 gotas de la solución mezcla, siendo positiva si se torna de color naranja a roja oscura. La solución mezcla 1:1 consiste de una solución A que contiene: ácido pícrico al 1 % en etanol y una B: NaOH al 10 %.

Flavonoides: Prueba del H₂SO₄: Una pequeña cantidad de muestra se disuelve en H₂SO₄ y se observa coloración amarilla para flavonoles; naranja-guinda para flavonas; rojo-azuloso para chalconas y rojo-púrpura para quinonas.

Alcaloides: Prueba de Dragendorff: Modificación de Munier y Machelobuf. Se harán 2 soluciones. Para preparar la solución A, se disuelven en 0.85 g de nitrato de bismuto, en una mezcla de 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua. Para la solución B, se disuelven 8 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua. El reactivo se prepara mezclando 5 mL de la solución A, 4 mL de la solución B y 100 mL de agua. El reactivo es estable por un año y la prueba es positiva para alcaloides al dar la placa coloración rojo o naranja persistentes por 24 horas (Pérez-Cepeda, 2000).

Saponinas: Prueba del bicarbonato de sodio: La sal se prepara al 10 % en agua. Se disuelven de 1-2 mg de la muestra disuelta en agua o etanol y se le agregan de 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Se agita ligeramente, luego se agregan 2-3 gotas de la solución de bicarbonato de sodio. La aparición de burbujas y su permanencia por más de 1 minuto indican la presencia de saponinas. Prueba de Salkowski para saponinas: Se disuelven de 1-2 mg de la muestra en 1 mL de cloroformo y se añade 1 mL de ácido sulfúrico. La prueba es positiva si hay aparición de color rojo.

Aromaticidad: Prueba del ácido sulfúrico-formaldehído: Se prepara una mezcla de 1 mL de ácido sulfúrico concentrado con una gota de formaldehído. Se agregan de 1 a 5 mg de la muestra disuelta en disolvente no aromático, se añaden unas gotas de la mezcla anterior y si aparece un color rojo-violeta, la prueba es positiva.

Toma de muestra y mantenimiento de las bacterias: La toma de muestra se realizó en las instalaciones de la Facultad de Odontología por un especialista. Las muestras inmediatamente después de haber sido tomadas fueron transportadas al laboratorio, en donde se trasvasaron a un tubo conteniendo medio nutritivo (medio MPTT); posteriormente, bajo condiciones de anaerobiosis, se realizaron resiembras. Enseguida se en medio MPTT-agar, se realizó estriado en cuatro cuadrantes, y se incubó a 37^a C por 24 hs, después se recolectó una muestra de cada colonia, se inoculó en un tubo con medio MPTT y se incubó a 37^a C por 24 h, y una vez que ya se tenía establecido el cultivo *in vitro*, se llevó a cabo la cinética de crecimiento de cada colonia aislada.

Cinética de crecimiento de bacterias relacionadas con caries dental y gingivitis: A las bacterias aisladas de los pacientes con caries dental y gingivitis se les realizó una cinética de crecimiento con el fin de conocer una de las fases para la realizar el bioensayo. A 9 tubos con caldo MPTT con un volumen de 9 mL y un inóculo de 30 µL de bacterias, se incubaron a 37^o C, se determinó la absorbancia de cada uno de los tubos en un espectrofotómetro a 635nm durante 24 h.

Identificación parcial de las bacterias relacionadas con gingivitis y caries dental: Una vez que se establezca la cinética de crecimiento de las bacterias aisladas, se determinará la

morfología de las bacterias mediante tinción simple, y se determinará el Gram mediante la técnica establecida; por otra parte, se realizará identificación parcial mediante el sistema API-A 20 y API-20.

Bioensayos

a) **Preparación de solución madre:** La solución madre se preparó como se detalla en la Tabla 1, y a partir de esta solución madre se tomaron las cantidades necesarias para obtener la concentración deseada.

Tabla 1

Preparación de la solución madre de extractos metanólicos de *C. texana*

	Hoja	Tallo	Corteza
Gramos	1.14	3.72	1.21
DMSO (mL)	10	10	10
Medio MPT-T (mL)	4	4	4

b) **Evaluación de la actividad biológica del extracto metanólico de *C. texana* sobre bacterias relacionadas con caries dental y gingivitis**

Técnica de espectrofotometría: Para realizar el bioensayo de los diferentes extractos metanólicos de *C. texana* (raíz, tallo, hoja y corteza), en 72 tubos de 13x100 conteniendo 8 mL de medio de cultivo, se les adicionó las distintas concentraciones que se realizaron de los extractos metanólicos de *C. texana*. Cada tubo se inoculó con 30µl de bacterias aisladas de pacientes con caries dental y la misma cantidad para la bacteria aislada de gingivitis, posteriormente se incubaron a 37°C por 24 h; a cada tubo se leyó la absorbancia a 635 nm. Enseguida se determinarán las unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL) empleando la técnica de recuento bacteriano en placa (RBP).

Técnica de Recuento Bacteriano en Placa (RBP): A partir de cada tubo conteniendo cultivo de las bacterias relacionadas con caries dental o gingivitis y en presencia de cada extracto correspondiente, previamente incubada a 37°C por 24 hs, se tomará un mililitro y se harán diluciones hasta 10^{-9} y a partir de la dilución 10^{-5} hasta 10^{-9} se tomará un mililitro y se depositará en una caja Petri, a la cual inmediatamente se le agregarán 15 mL de medio MPTT-agar, se dejará solidificar y enseguida se incubará a 37°C por mínimo 24h, y posteriormente se realiza el conteo de placas para determinar las UFC/mL (Tabla 3).

c) **Determinación de la DL₅₀ de los extractos metanólicos de *C. texana*:** De acuerdo a los resultados obtenidos por la técnica de absorbancia y la técnica de RBP, se determinó la DL₅₀

empleando el método PROBIT para cada réplica mediante el análisis estadístico de regresión lineal con el programa Microsoft Excel 2007.

d) Determinación de toxicidad de los extractos metanólicos de *C. texana* sobre *A. salina*:

Para la incubación de huevecillos de *A. salina* se preparó agua de mar artificial de la siguiente manera: se pesan 40 g de sal de mar (Instant Ocean, Acuarium System), 0.006 g de levadura de cerveza (Mead Johnson) se afora en un litro de agua bidestilada, se ajusta el pH a 7.8. El procedimiento se realiza incubando 0.1 g de huevecillos de *A. salina* en el agua de mar artificial, colocados en un recipiente de plástico dividido por una pared intermedia con un espacio en la parte baja de 2 mm; se mantienen en condiciones de oscuridad y oxigenación. Uno de los compartimentos se mantiene iluminado con una lámpara de 20 watts ya que al eclosionar los nauplios son atraídos a la luz.

A las 24 h, los nauplios son colocados con la ayuda de una pipeta a otro recipiente y se mantienen en condiciones de oxigenación y temperatura de 22-29 °C por 24 h más. En una microplaca de 96 pozos son adicionados 100 µL de la suspensión de nauplios/pozo (aproximadamente 10 nauplios) más 100 µL de las diluciones de los extractos a probar. Las concentraciones a evaluar estarán en un rango de 10 a 1000 µg/mL. Como control positivo se utilizó Dicromato de potasio a una concentración de 400 ppm; así como el DMSO a las mismas dosis que se maneja en el bioensayo y agua de mar como control negativo. A las 24 h de aplicados los extractos y con la ayuda de un microscopio estereoscópico, se realizó el conteo de nauplios vivos por dosis.

e) Análisis estadísticos: Para determinar la actividad biológica del extracto metanólico de *Castela texana* sobre el cultivo axénico *in vitro* de las bacterias relacionadas con caries dental y gingivitis, los datos que se obtuvieron de la absorbancia por triplicado y Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por duplicado se promediaron y se compararon contra cultivos control mediante el análisis de varianza con una $P < 0.05$, empleando la Prueba de Dunnet-T (2-side) con el paquete estadístico SPSS para Windows versión 2007.

RESULTADOS

Identificación de grupos funcionales en los extractos metanólicos de *C. texana*: Los resultados de las pruebas químicas para identificar grupos funcionales y metabolitos secundarios presentes en los extractos metanólicos de hoja, tallo, raíz y corteza de *C. texana* se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2

Grupos funcionales y metabolitos secundarios presentes en los extractos metanólicos de tallo, hoja y corteza de *Castela texana*

Grupo funcional	Pruebas	Tallo	Hoja	Corteza
Insaturaciones	KMnO ₄	-	+	-
Grupo carbonilo	2,4-Dinitrofenilhidracina	+	+	+

Oxhidrilos fenólicos	FeCl ₃	+	+	-
Esteroles y triterpenos	Liebermann-Burchard	+		
	Salkowski	+	+	+
Carbohidratos	Molish	+	+	+
	Cumarinas	+	-	+
Lactonas	Lactonas	+	+/-	+
Sesquiterpenlactonas	Baljet	A + B+	A - B-	A - B+
Flavonoides	H ₂ SO ₄	Flavonas	Flavonas	Flavonas
Alcaloides	Dragendorff	A +	A -	A +
Saponinas	Bicarbonato de Sodio	+	+	+
	Salkowski	+/-	+/-	+
Aromaticidad	Ácido Sulfúrico-formaldeído	+	+	+

Bioensayo de toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina*: La actividad tóxica de los extractos metanólico de tallo, raíz, corteza y hoja de *C. texana* fue evaluada sobre los nauplios de *A. salina*. Con los resultados obtenidos se calculó la DL₅₀ (Dosis Letal Media) de cada uno de los extractos, se diseñó el experimento con base en el análisis Probit mediante el programa SPSS versión 17.

En la Fig.1 se muestran los resultados obtenidos para la actividad de letalidad sobre *Artemia salina* para cada uno de los extractos, se observó una marcada actividad tóxica sobre *A. salina*, ya que los extractos presentaron dosis menores de 500 µg/mL.

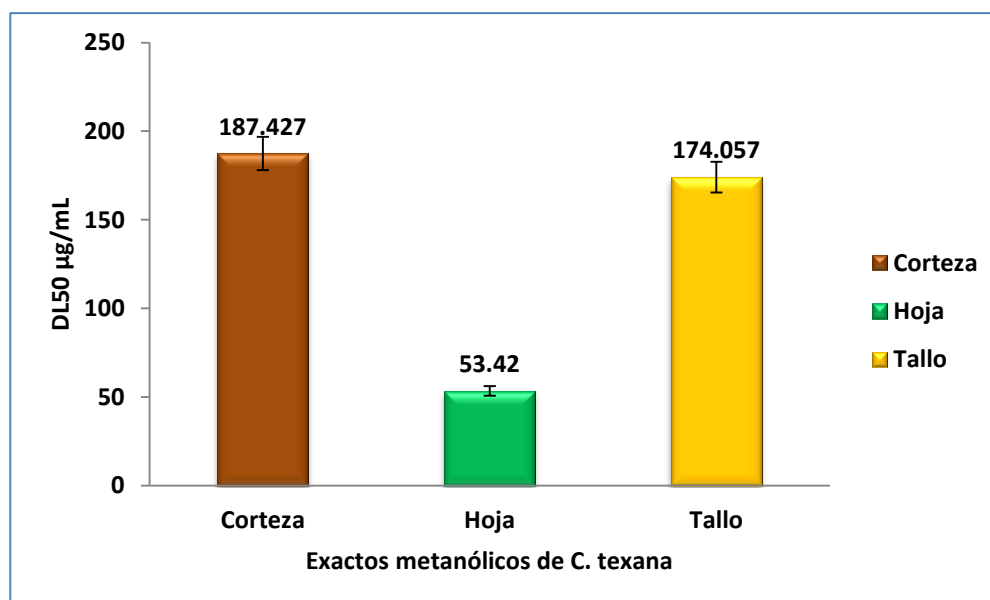


Figura 1. Comparación del potencial tóxico de los extractos metanólicos de corteza, hoja y tallo de *C. texana* sobre *A. salina*

Cinética de crecimiento: La cinética de crecimiento de la bacteria aislada de paciente con gingivitis se muestra en la Figura 2, en la cual se observa una larga fase de adaptación durante las primeras horas, y posteriormente un crecimiento logarítmico desde las 10 h hasta las 25 h. No se observa una típica fase estacionaria, tampoco se observa la fase de muerte ya que el crecimiento de esta bacteria era muy lento. Cada punto graficado representa el promedio de la lectura por triplicado de siete tubos.

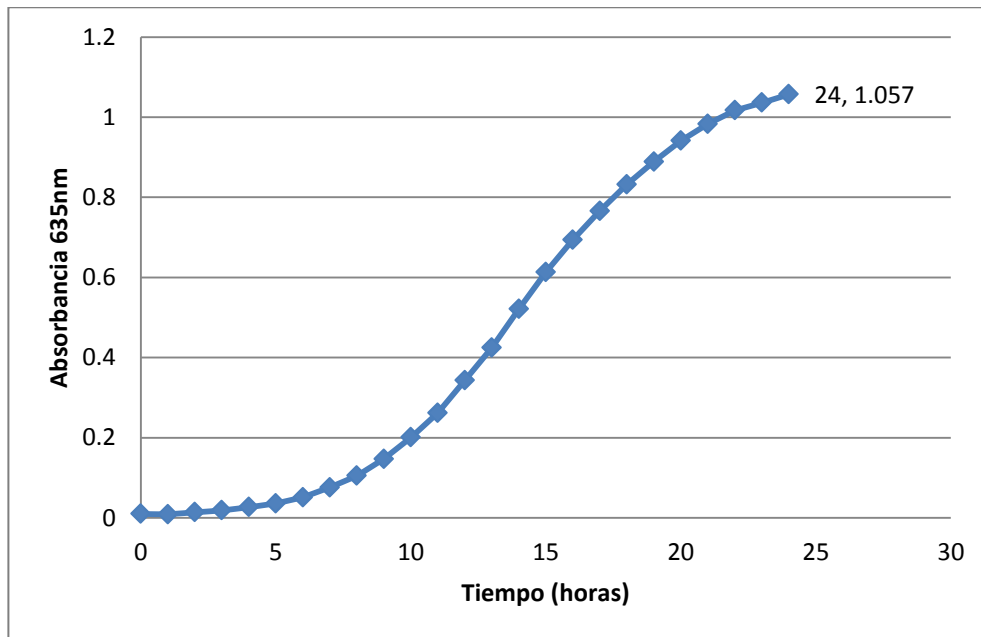


Figura 2. Cinética de crecimiento de la bacteria aislada de paciente con gingivitis, se observa que a las 24 h presenta el máximo rendimiento celular.

La cinética de crecimiento de la bacteria aislada de un paciente con caries dental se muestra en la Figura 3. Se puede observar una larga fase de adaptación durante las primeras horas, y posteriormente un crecimiento logarítmico desde las 10 h hasta las 18 h. Asimismo, una típica fase estacionaria, y en esta cinética tampoco se observa la fase de muerte ya que el crecimiento de esta bacteria también fue un poco lento. Cada punto graficado representa el promedio de la lectura por triplicado de siete tubos.

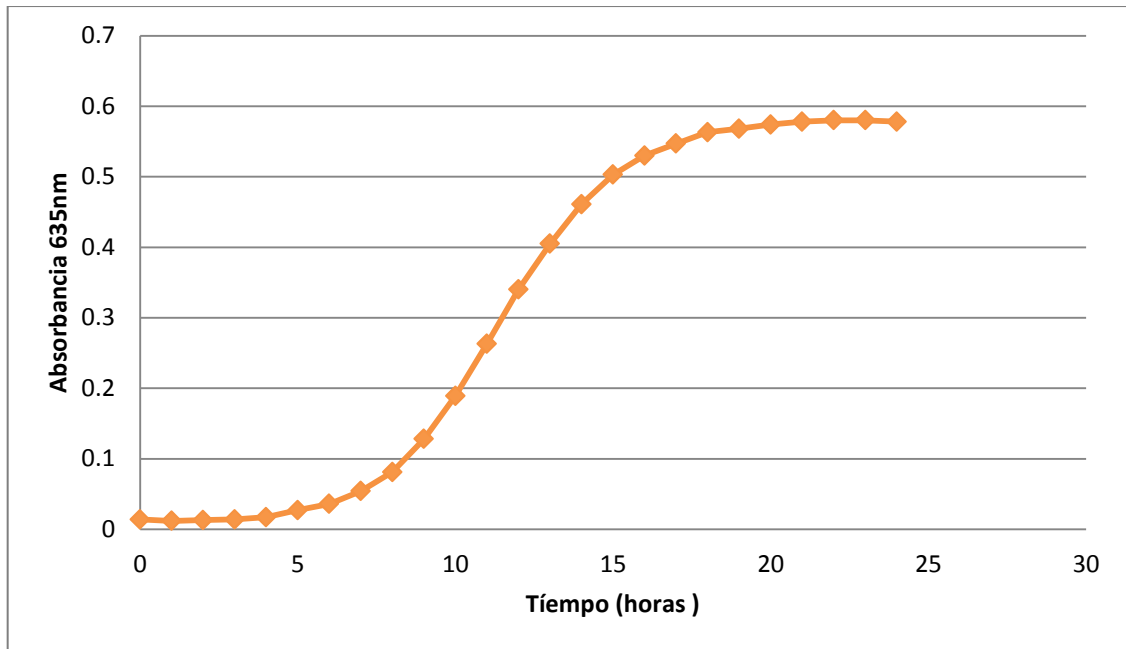


Figura 3. Cinética de crecimiento de la bacteria aislada de paciente con caries dental. Aproximadamente en las 18 hs se observa el máximo rendimiento celular.

Identificación de bacterias relacionadas con gingivitis y caries dental: Una vez que se aislaron y se establecieron las cinéticas de crecimiento de cada bacteria proveniente de cultivos a partir de gingivitis y/o caries dental, se realizaron pruebas bioquímicas para realizar la identificación parcial de la muestra bacteriana aislada. La morfología nos indica la presencia de cocos en cadenas y que a la tinción de Gram se observan rojos, es decir son Gram (-), el mejor rendimiento celular se obtuvo en condiciones de microaerofílicas y las pruebas bioquímicas nos indican que ambas bacterias son *Streptococcus sp.*

Actividad biológica del extracto metanólico de corteza, hoja y tallo de *C. texana* sobre bacterias relacionadas con caries dental y gingivitis

Método de turbidimetría: Al evaluar la actividad biológica de los extractos metanólicos de corteza, hoja y tallo de *C. texana* sobre las bacterias relacionadas con gingivitis (Figura 4) y caries dental (Figura 5), observamos una marcada inhibición del rendimiento celular de las bacterias aisladas de pacientes con gingivitis y caries dental. Esto en presencia del extracto metanólico de tallo, raíz, hoja y corteza de *C. texana* al emplear 0.1 mg/mL, 1mg/mL y 10mg/mL del extracto, resultados que indican la capacidad bactericida de estos extractos sobre las bacterias antes mencionadas.

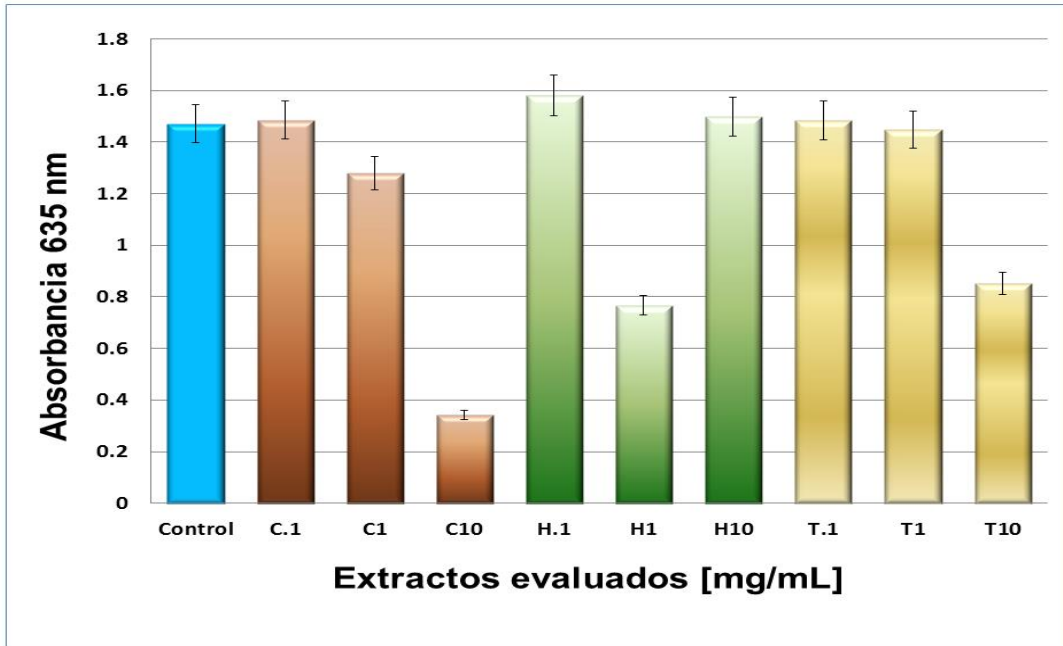


Figura 4. Gráfica comparativa de la actividad biológica de los extractos de *C. texana* sobre bacterias relacionadas con gingivitis (C=corteza, H=hoja y T=tallo).

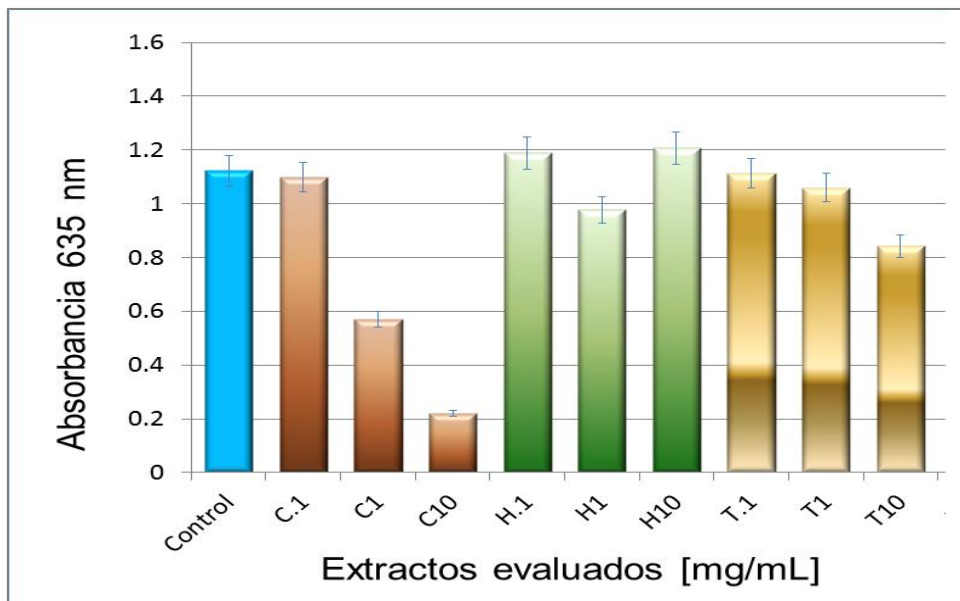


Figura 5. Actividad biológica de los extractos de *C. texana* sobre bacterias relacionadas con caries dental (C=corteza, H=hoja y T=tallo).

Técnica de Recuento bacteriano en Placa (UFC/mL): El método directo de cuantificar la actividad biológica de los extractos metanólicos de *C. texana* sobre las bacterias relacionadas con

gingivitis y caries dental (Tabla 3) se determinó mediante la técnica de recuento en placa (RBP) para determinar las unidades formadoras de colonia.

Tabla 3
Determinación de las UFC/mL de bacterias relacionadas con gingivitis y caries dental cultivadas en presencia de extractos metanólicos de *Castela texana*

	Control	Extracto metanólico de <i>C. texana</i>								
		Corteza			Hoja			Tallo		
		0.1*	1*	10*	0.1*	1*	10*	0.1*	1*	10*
Gingivitis	830,000,000	I	6,850,000	490,000	299,550	210,000	380,000	I	3,200,000	8,650,000
Caries	178,000,000	I	179,500	I	89,000	32,500	7,900	I	I	245,000

*mg/mL I=Incontable

DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó el tamizaje químico de la planta *Castela texana* así como la determinación de la actividad biológica de los extractos metanólicos sobre el cultivo de bacterias relacionadas con caries dental y gingivitis. Los resultados de las pruebas coloridas de los extractos metanólicos de hoja, tallo, raíz y corteza de *C. texana* nos indica la presencia de los siguientes metabolitos secundarios: para insaturaciones la hoja fue la única que dio positivo en esa prueba mientras que las demás salieron negativas, en la prueba de flavonoides en la hoja fue la única que salió diferente a las demás con un resultado de flavones, mientras que las demás partes de *C. texana* contienen flavonas. En cuanto a la aromaticidad, todas salieron positivas para esta prueba; en la prueba de los carbohidratos, la prueba de Molish en la hoja y en la raíz salieron negativas mientras que en las otras pruebas para detectar carbohidratos salieron positivas (Tabla 2).

Al evaluar la actividad tóxica de los extractos metanólico de tallo, corteza, raíz y hoja de *C. texana* sobre los nauplios de *A. salina*, observamos que el extracto metanólico de la hoja de *C. texana* presenta una DL50 53.42 $\mu\text{g} / \text{mL}$ sobre *A. salina*, lo cual nos indica una alta actividad tóxica en comparación con el resto de los extractos (Figura 1). El extracto metanólico de corteza presentó la menor DL50 con 187.427 $\mu\text{g} / \text{mL}$, lo cual nos indica que presenta una menor actividad tóxica contra *A. salina*, es de resaltar que el mínimo valor así como el máximo valor para la DL50 corresponden a extractos de hoja y de corteza de *C. texana*, sin embargo, la variante es la parte del arbusto empleado para realizar la extracción, lo cual nos indica que cada parte del arbusto tiene diferentes compuestos.

En cuanto a la actividad antibacteriana, se procedió a determinar por medio de la absorbancia así como las UFC la inhibición sobre el crecimiento de las bacterias relacionadas con caries dental y gingivitis. Se evaluaron solamente los extractos metanólicos de hoja, tallo y corteza de *C. texana* a diferentes concentraciones, seleccionamos el extracto metanólico para llevar a cabo esta evaluación de la actividad antibacteriana, ya que este tipo de extracción permite extraer mayor cantidad de compuestos a partir de cada muestra vegetal.

Los resultados indican que el extracto metanólico de hoja de *C. texana* a la concentración de 1 mg/mL, inhibe los cultivos tanto para la bacteria aislada de caries dental como la de gingivitis en 80 % y 78 % respectivamente, presentando mayor inhibición el extracto de hoja de *C. texana* en la bacteria relacionada con gingivitis. También la actividad antibacteriana del extracto metanólico de hoja de *Castela texana* fue mayor en la bacteria relacionada con caries dental (Tabla 3).

Del arbusto evaluado en este trabajo, solamente existen trabajos que reportan ampliamente la actividad amebicida de los extractos metanólicos de *C. texana* al inhibir in vitro el

crecimiento de los trofozoítos de *E. histolytica* y al inhibir el enquistamiento de *Entamoeba invadens* (Calzado et al., 2007), también se ha reportado inhibición del enquistamiento axénico in vitro de *E. histolytica* (Barrón et al, 2007).

El extracto metanólico de hoja de *C. texana* presentó la mayor actividad bactericida, sin embargo, también presentó el mayor potencial tóxico sobre el modelo biológico de estudio (*Artemia salina*). Esta toxicidad difiere a la encontrada en modelos murinos, que no reporta toxicidad (Calzado et al, 1998). El potencial de toxicidad nos indica que no es la mejor opción de estudio para la obtención de metabolitos con actividad bactericida, por lo cual se concluye que la mejor opción de estudio para bacterias relacionadas con gingivitis es el extracto metanólico de corteza, y para las bacterias relacionadas con caries dental, el extracto metanólico de tallo, los cuales presentan respectivamente la mayor actividad bactericida y el menor potencial tóxico sobre *Artemia salina*.

Los extractos con actividad antibacteriana podrían ser empleados en futuros trabajos de investigación encaminados a inhibir tanto el crecimiento de bacterias causantes de caries dental como de gingivitis.

CONCLUSIONES

El extracto metanólico de corteza de *C. texana* presenta bajo potencial tóxico sobre *A. salina* y presenta la mayor actividad inhibitoria del crecimiento de bacterias relacionadas con gingivitis.

El mejor extracto metanólico para inhibir el crecimiento de bacterias relacionadas con caries dental es el extracto metanólico de tallo ya que presenta bajo potencial tóxico sobre *Artemia salina*.

BIBLIOGRAFIA

- Beg, A. (2000). Effect of Plumbago zelanica extract and certain curing agent on multidrug resistant bacterias of clinical drugs. *Word Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 841-864.
- Calzado-Flores, C. (1998). In vitro anti-trichomonoc activity of Castela texana. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 41, 173-174.
- Caton J., (1988). Cell populations associated with conversion from bleeding to non bleeding gingiva. *Journal of Periodontology*. 59, 7-10.
- Domínguez X.A. (1973). Métodos de Investigación Fitoquímica. México: Ed. Limusa.
- Hernández G. (1998). Cuide su boca. España:Editorial Everest.
- Kalemba, D. & A. Kunicka., (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Journal of Microbiology*. 10(10), 813-829.
- Murayama, Y., Kurihara, H., & Nagai, A. (2000). Acute necrotizing ulcerative gingivitis: Risk factors involving host defense mechanisms. *Periodontol*. 6, 116-124.
- Prieto-Prieto J, & Calvo. A., (2004). Bases microbiológicas en las infecciones bucales y sensibilidad en los antibióticos. *Medical Oral Patology*. 9, 8 - 11.
- Rodríguez Calzadilla A. (1997). Enfoque de riesgo en la atención estomatológica risk approach in dental care. *Revista Cubana Estomatológica*. 34(1), 40-49