



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Odontología

Escuela Profesional de Odontología

**Efecto antibacteriano del extracto etanólico de
Equisetum giganteum L. “cola de caballo” frente a
Fusobacterium nucleatum, microorganismo asociado a
la enfermedad periodontal**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista

AUTOR

Elizabeth Mery HUACHACA ZEVALLOS

ASESOR

Dr. Donald RAMOS PERFECTO

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Huachaca E. Efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Equisetum giganteum* L. “cola de caballo” frente a *Fusobacterium nucleatum*, microorganismo asociado a la enfermedad periodontal [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Odontología, Escuela Profesional de Odontología; 2023.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Elizabeth Mery Huachaca Zevallos
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	70976448
URL de ORCID	https://orcid.org/0009-0009-3973-6211
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Donald Ramos Perfecto
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	10712181
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-5870-3962
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Maria Eugenia Guerrero Acevedo
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	40247680
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Saul Ilizarbe Escajadillo
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07278130
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Donald Ramos Perfecto
Tipo de documento	DNI

Número de documento de identidad	10712181
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.3.3.3 Productos naturales de uso en odontología
Grupo de investigación	No aplica.
Agencia de financiamiento	No aplica.
Ubicación geográfica de la investigación	País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Breña Centro poblado: Centro poblado urbano de Breña Calle: Jr. Restauración N°122 Latitud: -12.06541 Longitud: -77.04680
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Enero 2021 – Febrero 2023
URL de disciplinas OCDE	Odontología, Cirugía oral, Medicina Oral: https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.02.14

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMERICA)
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
VICE DECANATO ACADÉMICO
UNIDAD DE ASESORÍA Y ORIENTACIÓN DEL ESTUDIANTE
(AYOE)

"Año de la unidad, la Paz y el desarrollo"

A C T A DE SUSTENTACIÓN

PRESENCIAL N°005

Los Docentes que suscriben, reunidos el 22 de marzo del 2023 en la ciudad de Lima, siendo las 09:00 horas, por encargo del Señor Decano de la Facultad, con el objeto de constituir el Jurado de Sustentación para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista de la Bachiller:

HUACHACA ZEVALLOS, ELIZABETH MERY

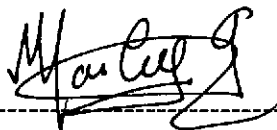
CERTIFICAN:

Que, luego de la Sustentación de la Tesis «EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Equisetum Giganteum* L. "COLA DE CABALLO" FRENTE A *Fusobacterium Nucleatum*, MICROORGANISMO ASOCIADO A LA ENFERMEDAD PERIODONTAL» y habiendo absuelto las preguntas formuladas, demostró un grado de aprovechamiento..... Sobresaliente.....

siendo calificada con un promedio de: Dieciocho (escala) 18.....
(en letras) (en números)

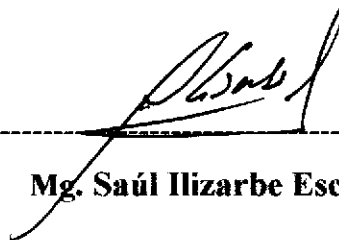
En tal virtud, firmamos en la Ciudad Universitaria, a los veintidós días del mes de marzo del dos mil veintitres.

PRESIDENTE DEL JURADO



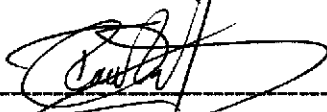
Dra. María Eugenia Guerrero Acevedo

MIEMBRO SECRETARIO



Mg. Saúl Ilizarbe Escajadillo

MIEMBRO VOCAL (ASESOR)



Dr. Donald Ramos Perfecto



INFORME DE EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD

1. AUTORIDAD ACADÉMICA QUE EMITE EL INFORME DE ORIGINALIDAD

Directora de la Escuela Profesional de Odontología

2. APELLIDOS Y NOMBRES DE LA AUTORIDAD ACADÉMICA

Dra. Doris Elizabeth Salcedo Moncada

3. OPERADOR DEL PROGRAMA INFORMÁTICO DE SIMILITUDES

Marianella Morales Valdivieso

4. DOCUMENTO EVALUADO

Efecto antibacteriano del extracto etanólico de Equisetum giganteum L. “cola de caballo” frente a Fusobacterium nucleatum, microorganismo asociado a la enfermedad periodontal

5. AUTOR DEL DOCUMENTO

Elizabeth Mery Huachaca Zevallos

6. FECHA DE RECEPCIÓN DE DOCUMENTO

27/02/2023

7. FECHA DE APLICACIÓN DEL PROGRAMA INFORMÁTICO DE SIMILITUDES

27/02/2023

8. SOFTWARE UTILIZADO

- Turnitin

9. CONFIGURACIÓN DEL PROGRAMA DETECTOR DE SIMILITUDES

- Excluye textos entrecomillados
- Excluye bibliografía
- Excluye cadenas menores a 40 palabras

10. PORCENTAJE DE SIMILITUDES SEGÚN PROGRAMA DETECTOR DE SIMILITUDES

7%

11. FUENTES ORIGINALES DE LAS SIMILITUDES ENCONTRADAS*

12. OBSERVACIONES

13. CALIFICACIÓN DE ORIGINALIDAD

- Documento cumple criterios de originalidad, sin observaciones
- Documento cumple criterios de originalidad, con observaciones
- Documento no cumple criterios de originalidad

14. FECHA DEL INFORME

01/03/2023



Firmado digitalmente por SALCEDO
MONCADA Doris Elizabeth FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 01.03.2023 12:29:37 -05:00

FIRMA DEL EVALUADOR

DEDICATORIA

A Dios por guiarme, protegerme
y darme la fortaleza para continuar
con mi camino.

A mi mamá, Carmen
por ser mi apoyo y motor incondicional
a lo largo de todo este proceso, por su
confianza y amor.

A mi padre, Alfonso
por ser mi compañero y apoyarme en
todas las metas que me propuse, guiarme
con disciplina para ser la persona de bien
que soy hoy.

A mi hermana, Zenaida
porque me enseña cada día que puedo contar con
ella, por su protección y su cariño fraternal
con mi persona.

AGRADECIMIENTOS

A la Mg. Hilda Moromi Nakata y a mi asesor de tesis, Dr. Donald Ramos Perfecto, por quienes me siento muy agradecida ya que desde el inicio mostraron una gran predisposición para guiarme en la elaboración de esta tesis, además de su confianza, buena actitud y puntualidad en las revisiones y entrega de documentos; porque me guiaron durante todo el proceso de investigación y ejecución de este proyecto.

Al Dr. Nino Castro Mandujano, director del Departamento de Química Orgánica de la FQIQ de la UNMSM, quien me guió y asesoró en todo el proceso de elaboración del extracto etanólico de mi planta en estudio, por quien me siento infinitamente agradecida por prestarme las instalaciones del laboratorio de Productos Naturales para hacer posible esta investigación.

Al Dr. Américo Castro Luna, director del Departamento de Química básica y aplicada de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, por apoyarme en todo el proceso de validación de mi extracto en estudio, por ser un gran maestro y por brindarme la motivación necesaria para continuar con mi proyecto.

A la plana docente de Microbiología de la F.O de la UNMSM, Blga. Elba Martínez Cadillo y Mg. Alejandro Mendoza Rojas; y a las técnicas de laboratorio, Violeta y Elena, quienes me acogieron en sus instalaciones y me brindaron toda la ayuda necesaria en el proceso de obtención de insumos y por darme las facilidades en el uso del laboratorio de Microbiología de la F.O de la UNMSM.

A la Mg. Katia Medina Calderón, por brindarme su tiempo y conocimientos en asesorar metodológicamente la elaboración de esta tesis; y a la Dra. María Eugenia Acevedo y Mg. Saul Ilizarbe Escajadillo, mis jurados, que me apoyaron con sus asesorías y correcciones.

A la Dra. María Isabel La Torre Acuy y a la PhD. Blanca León, por su ayuda en el proceso de recolección de la “cola de caballo” y en su correcta clasificación taxonómica, por su asesoría desde el aspecto botánico para llevar a cabo una adecuada obtención de esta planta.

Un agradecimiento especial al Dr. Omar Antezana y al Dr. Elías Poma, quienes depositaron su plena confianza en mí como persona y profesional desde los inicios de mi carrera.

RESUMEN

Objetivo: Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *Equisetum giganteum* L. frente a cepas ATCC de *Fusobacterium nucleatum*. **Metodología:** La muestra se determinó de manera no probabilística y estuvo constituida en total por 10 placas Petri sembradas con *F. nucleatum*. Se utilizó extracto etanólico de *E. giganteum* L. en las concentraciones de 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 %; el control positivo fue gluconato de clorhexidina al 0.12 % y el control negativo fue suero fisiológico. Se utilizó el método de difusión en agar, cada placa Petri sembrada fue enfrentada a 07 discos embebidos en las 05 diferentes concentraciones, el control positivo y control negativo. Se incubaron estas 10 placas a 37 °C durante 07 días. Se midieron los halos de inhibición con un vernier digital sobre la superficie de cada placa Petri y estos resultados fueron transportados a un instrumento de recolección de datos elaborados por el investigador. **Resultados:** No se evidenciaron halos de inhibición significativos en ninguno de los discos embebidos con las diferentes concentraciones en las 10 placas Petri sembradas con *F. nucleatum*. **Conclusión:** No existe efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *E. giganteum* L. frente a *F. nucleatum*, en ninguna de sus 05 concentraciones.

Palabras clave: Enfermedades Periodontales, *Equisetum*, *Fusobacterium nucleatum*, Antibacterianos, Extractos de Plantas.

ABSTRACT

Objective: To determine the *in vitro* antibacterial effect of the ethanolic extract of *Equisetum giganteum* L. against ATCC strains of *Fusobacterium nucleatum*. **Methodology:** The sample was determined in a non-probabilistic manner and consisted of a total of 10 Petri dishes seeded with *F. nucleatum*. Ethanolic extract of *E. giganteum* L. was used in concentrations of 100, 50, 25, 12.5 and 6.25 %; the positive control was 0.12 % chlorhexidine gluconate, and the negative control was saline. The agar diffusion method was used, each seeded Petri dish was faced with 07 discs embedded in the 05 different concentrations, the positive control and negative control. These 10 plates were incubated at 37°C for 07 days. The inhibition halos were measured with a digital vernier on the surface of each Petri dish and these results were transported to a data collection instrument prepared by the researcher. **Results:** No significant inhibition halos were found in any of the embedded discs with the different concentrations in the 10 Petri dishes seeded with *F. nucleatum*. **Conclusions:** There is no *in vitro* antibacterial effect of the ethanolic extract of *E. giganteum* L. against *F. nucleatum*, in any of its 05 concentrations.

Key words: Periodontal Diseases, *Equisetum*, *Fusobacterium nucleatum*, Anti-Bacterial Agents, Plant Extracts.

ÍNDICE

	Pág.
I. Introducción.....	09
II. Planteamiento del problema.....	10
2.1. Área problema	10
2.2. Delimitación del problema	11
2.3. Formulación del problema	12
2.4. Objetivos de la investigación	12
2.4.1. Objetivo general	12
2.4.2. Objetivos específicos	12
2.5. Justificación	13
2.6. Limitaciones	14
III. Marco teórico	15
3.1 Antecedentes	15
3.2. Bases teóricas	18
3.3. Definición de términos	39
3.4. Hipótesis	40
3.5. Operacionalización de variables	40
IV. Metodología	44
4.1. Tipo de investigación	44
4.2. Población y muestra	44
4.3. Procedimientos y técnicas	45
4.4. Recolección de datos	48

4.5. Análisis de resultados	49
V. Resultados	50
VI. Discusión	52
VII. Conclusiones	56
VIII. Recomendaciones	57
IX. Bibliografía	58
X. Anexos	72

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Fig 01. Clasificación de los IV estadios de la periodontitis según la Nueva Clasificación 2017.....	33
Fig 02. Esquema de los grados de la periodontitis según la Nueva Clasificación 2017.....	34
Fig 03. Diagrama de complejos del biofilm oral, descritos por Socransky y Haffajee	36

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla N° 01. Operacionalización de las variables independientes.....	43
Tabla N° 02. Operacionalización de la variable dependiente.....	44
Tabla N° 03. Consolidación de resultados de los halos de inhibición de las 10 placas Petri	51
Tabla N° 04. Instrumento de recolección de datos de <i>F. nucleatum</i>	74

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 01. Constancia de Clasificación taxonómica de <i>E. giganteum</i> L.....	71
Anexo 02. Constancia de elaboración de extracto etanólico de <i>E. giganteum</i> L.....	72
Anexo 03. Análisis cualitativo de los principales metabolitos secundarios del extracto etanólico de <i>E. giganteum</i> L.....	73
Anexo 04. Instrumento de recolección de datos.....	74
Anexo 05. Obtención de <i>E. giganteum</i> L.	75
Anexo 06. Procesamiento de <i>E. giganteum</i> L.....	76
Anexo 07. Elaboración de <i>E. giganteum</i> L.....	77
Anexo 08. Obtención de cepas ATCC de <i>F. nucleatum</i>	80
Anexo 09. Prueba de actividad antibacteriana frente a <i>F. nucleatum</i>	81
Anexo 10. Características morfológicas de <i>F. nucleatum</i>	84

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades periodontales representan la segunda enfermedad bucal más común y prevalente después de la caries dental, afectando aproximadamente a un 10 % de la población mundial, esta condición empeora en poblaciones con estratos socioeconómicos bajos como en países de Latinoamérica donde se ha reportado una prevalencia mayor, con cifras de 15 a 18 % de población afectada con esta enfermedad, esto se debe a que en esta área geográfica se acentúan los niveles de pobreza y desigualdad social. Además, el limitado acceso a los servicios de salud es un problema que se agudiza en poblaciones rurales alejadas de las ciudades, lo que conlleva a que estas personas tengan un acceso limitado a los implementos que se deben utilizar en las terapias periodontales tales como cepillo dental, hilo dental, pastas dentales, colutorios, y antisépticos vitales para combatir los microorganismos de las enfermedades periodontales²⁸.

Ante esta problemática la fitoterapia aplicada a la Odontología se presenta como una eficaz alternativa de tratamiento frente las enfermedades periodontales, porque busca utilizar los principios activos de las plantas medicinales que se encuentran en gran cantidad en la naturaleza, dándole así las características de ser más asequibles y de menor costo, para combatir los microorganismos patógenos causantes de esta enfermedad¹¹⁻³⁵.

Es importante realizar diversos estudios científicos para evaluar y certificar la eficacia de estas plantas medicinales, tales como *E. giganteum* L. “cola de caballo”, importante planta perteneciente a la familia de helechos, que se encuentra distribuida en casi todos los departamentos del Perú, creciendo en grandes cantidades en ambientes húmedos como en las riberas de los ríos, siendo accesible para su uso por parte de la población. Esta planta medicinal que ha sido utilizada por largos años para tratar dolencias genitourinarias tiene un gran potencial antibacteriano debido a sus principios activos como alcaloides, taninos y flavonoides, además en el campo de la odontología ha demostrado ser eficaz frente a microorganismos causantes de la caries dental y la candidiasis oral, sin embargo, son pocos los estudios que se han realizado para evaluar si es eficaz contra las principales bacterias periodontopatógenas^{6,8}.

En ese sentido, el propósito de este estudio fue evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* de la planta medicinal denominada “cola de caballo” frente a *F. nucleatum*, importante patógeno periodontal responsable de la gingivitis y estadios iniciales de la periodontitis, para otorgar así evidencia científica que avale en el futuro, su posible uso en colutorios y pastas dentales para el tratamiento alternativo de las enfermedades periodontales.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1. Área problema

Las plantas medicinales son definidas, según la OMS, como todas las especies vegetales que posean en uno o más de sus órganos, sustancias que puedan utilizarse con fines terapéuticos o que sirvan como precursores de medicamentos¹. Desde el comienzo de la humanidad, los médicos han investigado y utilizado los compuestos químicos producidos por plantas naturales para aliviar enfermedades. En la antigua Mesopotamia (2600 a. C) se encontraron registros del uso de aceites de *Cupressus sempervirens* y especies de *Commiphora* para tratamientos de tos, resfriado y enfermedades relacionadas con la inflamación². El uso y la utilidad de las plantas medicinales se mantiene en vigencia actualmente, ya que, según la FDA, más de un tercio (39.1 %) de los medicamentos más importantes, aprobados, son de origen natural. La práctica de la medicina tradicional sirve como base para el desarrollo de la medicina moderna³.

Hoy en día se realizan diversos estudios relacionados a las propiedades medicinales de las plantas con resultados prometedores. Sin embargo, los medicamentos a base de estas plantas medicinales rara vez son empleados por los profesionales de la salud y basan sus tratamientos con el uso de drogas sintéticas, incluso para problemas de salud menores⁴. El uso de medicamentos de origen vegetal ha recibido una atención creciente en los últimos años porque cada vez es más común la preocupación por los efectos secundarios y la ineficacia de algunos medicamentos químicos⁵. Es por ello la importancia de los estudios crecientes en esta área en el menester de mantener la vigencia del uso de plantas medicinales y avalar científicamente la seguridad de su uso.

Equisetum giganteum L. (*E. giganteum* L.) es una de las 04 especies de *Equisetum* que existen en el Perú, siendo esta, una de las más utilizadas e investigadas por sus propiedades farmacológicas y medicinales⁶. Se le atribuyen propiedades terapéuticas como agente antiinflamatorio, antidiabético, antioxidante, antimicrobiano,

antihemorrágico, astringente, diurético, hepatoprotector, vasorrelajante y cicatrizante⁷. Estudios del efecto antimicrobiano de la “cola de caballo” sobre bacterias aerobias Gram positivas, Gram negativas, anaerobias facultativas y sobre hongos patógenos de la cavidad bucal, indican que podrían tener actividad antimicrobiana frente a estos microorganismos⁸⁻¹⁰.

2.2. Delimitación del problema

En el campo de la odontología el uso de medicamentos a base de plantas naturales tiene la ventaja de tener un costo asequible, fácil manejo y existe una gran cantidad de materia prima para ser utilizada, además estos medicamentos tienen menos efectos secundarios en comparación con los medicamentos de origen sintético¹¹.

Las enfermedades periodontales son unas condiciones inflamatorias crónicas representadas principalmente por la gingivitis inducida por biofilm dental y la periodontitis, esta condición inflamatoria afecta a los tejidos de protección y soporte de los dientes, en sus etapas más severas puede causar la pérdida dentaria, sin embargo, en sus etapas tempranas como la gingivitis, puede ser reversible con las medidas preventivas, de tratamiento y control adecuadas¹²⁻¹⁴. Mediante el Índice Periodontal Comunitario (IPC) la OMS determinó que las enfermedades periodontales pueden afectar en un mayor nivel a los países de América Latina en comparación con los países del resto del mundo¹⁵. En los últimos años se ha generalizado la búsqueda de productos naturales a base de plantas medicinales para combatir, inhibir y reducir la formación de biofilm dental en las enfermedades periodontales¹⁶.

E. giganteum L. “cola de caballo”, es un helecho primitivo de la familia *Equisateceae*¹⁷. Sus compuestos fitoquímicos más conocidos son los flavonoides, ácidos fenólicos, alcaloides, fitoesteroles, taninos y triterpenoides, los cuales les confieren sus grandes propiedades medicinales¹⁸. Se ha demostrado el efecto antimicrobiano *in vitro* del extracto de la “cola de caballo”, a diferentes concentraciones en bacterias orales como

*Streptococcus mutans*⁸ (*S. mutans*) y *Porphyromonas gingivalis*^{19,20} (*P. gingivalis*), y en hongos patógenos de la cavidad oral como *Candida albicans*¹⁰ (*C. albicans*); además en estudios clínicos en pacientes, se ha demostrado que reduce de manera significativa el crecimiento de *C. albicans* sobre las superficies de las resinas acrílicas de las prótesis dentales²¹.

Se han realizado estudios *in vitro* del efecto antibacteriano de distintas plantas medicinales sobre bacterias periodontopatógenas frecuentes tales como *P. gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*²²⁻²⁴ (*F. nucleatum*). También se realizaron estudios *in vitro* del efecto antibacteriano de plantas medicinales sobre muestras aisladas de pacientes con periodontitis²⁵⁻²⁷.

Por lo antes expuesto, el presente estudio evaluará el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *E. giganteum* L. frente a la bacteria periodontopatógena, *F. nucleatum*, cuyos resultados puedan servir de base para la elaboración de productos, como colutorios de alternativa natural y económica para la terapia de las enfermedades periodontales.

2.3. Formulación del problema

¿Cuál es el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *E. giganteum* L. “cola de caballo” frente a *F. nucleatum*, microorganismo asociado a las enfermedades periodontales?

2.4. Objetivos de la investigación

2.4.1. Objetivo general

Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *E. giganteum* L. frente a *F. nucleatum*.

2.4.2. Objetivos específicos

- Identificar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *E. giganteum* L. a la concentración de 6.25 mg/ml, sobre cepas de *F. nucleatum*.
- Identificar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *E. giganteum* L. a la concentración de 12.5 mg/ml, sobre cepas de *F. nucleatum*.
- Identificar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *E. giganteum* L. a la concentración de 25 mg/ml, sobre cepas de *F. nucleatum*.
- Identificar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *E. giganteum* L. a la concentración de 50 mg/ml, sobre cepas de *F. nucleatum*.
- Identificar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *E. giganteum* L. a la concentración de 100 mg/ml, sobre cepas de *F. nucleatum*.
- Comparar el efecto antibacteriano de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *E. giganteum* L. sobre *F. nucleatum*.

2.5. Justificación

En el campo de la odontología se ha estudiado la efectividad antibacteriana del género *Equisetum* sobre bacterias patógenas que causan la caries dental⁸. Sin embargo, existen escasos estudios en nuestro medio sobre su efectividad antibacteriana en bacterias causantes de las enfermedades periodontales como *F. nucleatum*, por eso es necesario contribuir con el conocimiento científico en esta área.

Según la OMS se estima que las enfermedades periodontales afectan a casi el 10 % de la población mundial y su tratamiento representa costos elevados para las poblaciones de bajos recursos²⁸, por este motivo es muy importante encontrar alternativas de menor costo para la prevención y el tratamiento de estas enfermedades.

Se ha demostrado mediante estudios *in vitro* que el gluconato de clorhexidina al 0.12 % presenta una aparente citotoxicidad frente a las células epiteliales y fibroblastos en periodos de exposición de 1440, 30, 15, 10 y hasta 05 minutos, incluso en otros estudios se ha demostrado que hasta en menores tiempos de exposición como 30 segundos²⁹,

por lo cual se debe buscar alternativas naturales que cumplan con el efecto antimicrobiano sin causar una posible citotoxicidad a los tejidos de la cavidad oral.

2.6. Limitaciones

En el contexto de la pandemia por COVID-19 actualmente se limita el acceso a los laboratorios para la experimentación de esta investigación. La ejecución del cronograma de actividades estuvo sujeta a las condiciones y disposiciones relacionadas a dicho contexto.

Esta investigación implicó tener un adecuado presupuesto de tipo económico, el cual condicionó al desarrollo de un determinado número de muestras, así como al uso de insumos del laboratorio.

III. MARCO TEÓRICO

3.1. Antecedentes

Chuquipiondo (2021)¹⁹, estudió el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *E. giganteum* L. sobre cepas ATCC de *P. gingivalis*, utilizando concentraciones de (25, 50, 75 y 100 %) de extracto; los tallos y hojas de la planta se obtuvieron mediante la cosecha en el distrito de Chaclacayo, provincia de Lima. Se envió la muestra de planta al Museo de Historia Natural de la UNMSM para obtener el adecuado reconocimiento taxonómico de la especie y procedió a realizar el extracto etanólico en sus diferentes concentraciones. Utilizó una muestra de 36 placas Petri, dividiéndolas en 03 grupos de 12 placas para estudiar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *E. giganteum* L., el control positivo (gluconato de clorhexidina al 0.12 %) y el control negativo (agua destilada). Se utilizó la técnica de difusión para la siembra de las cepas y se contabilizaron los halos de inhibición a las 24 y 48 h, obteniendo como resultado que el extracto etanólico de *E. giganteum* L. al 25 % no presenta efecto antibacteriano *in vitro*, sin embargo, al 100 % sí presenta efecto antibacteriano, con un halo de inhibición de 13.50 mm a las 24 h y de 13.80 mm a las 48 horas, siendo incluso superior al del gluconato de clorhexidina al 0.12 % que presentó un halo de inhibición de 12.5 mm a las 24 y 48 h.

Choque (2020)²⁰, estudió el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *E. arvense* sobre cepas ATCC de *P. gingivalis*, a concentraciones de (25, 50, 75 y 100 %) y a volúmenes de (15, 20, 25, y 30 µL); la “cola de caballo” se obtuvo mediante la cosecha a tempranas horas de la mañana en el distrito de Ilabaya-Tacna; se consiguió el extracto seco de la planta mediante la técnica de maceración a 50 °C y se procedió a macerar en alcohol a 70° durante 07 días; se cultivó la *P. gingivalis* en condiciones de anaerobiosis a 37 °C durante 72 h, se utilizó agua destilada como control negativo y gluconato de clorhexidina como control positivo; el estudio dio como resultado que sí existe efecto

antibacteriano de *E. arvense* sobre cepas ATCC de *P. gingivalis*; en el volumen de 15 µL el efecto antibacteriano es muy sensible en las concentraciones de 75 % y 100 %, mientras que en los volúmenes de 20 µL, 25 µL y 30 µL, las cuatro concentraciones presentan efecto antibacteriano muy sensible en sentido directamente proporcional entre el volumen, concentración y efecto antibacteriano.

Cáceres (2018)⁸, estudió el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto acuoso de *E. arvense* sobre cepas ATCC de *S. mutans*, a concentraciones de 10, 25, 50 y 100 %. Para obtener el extracto utilizó un hidrodestilador por arrastre con agua y vapor. Determinó una muestra de 16 placas Petri con cultivos de *S. mutans*, las cuales se dividieron en 04 grupos para cada concentración de extracto, sobre cada placa Petri colocó 06 discos para inocular el extracto, en total se dieron 24 inoculaciones por cada concentración. El método para medir el diámetro de los halos de inhibición se dio por la escala de Duraffourd y estos halos se midieron con un vernier digital en milímetros. Los resultados confirmaron que el extracto acuoso de *E. arvense* tiene efecto antibacteriano sobre las cepas de *S. mutans* a concentraciones de 50 % y 100 % con halos de inhibición 9.93 mm y 12.23 mm, respectivamente.

Da Silva et al. (2017)²¹, evaluó la efectividad antiadherente *in vitro* del extracto hidroetanólico de *E. giganteum* L. sobre las biopelículas de *C. albicans*, mediante la técnica de tinción de cristal violeta y unidades formadoras de colonias, cuantificando la biomasa total de las biopelículas y células vivas sobre la resina acrílica de bases de prótesis dentales tratadas previamente con el extracto a concentraciones de 04, 08, 16, 25 y 50 %. Tras 24 h de desarrollo de biopelícula, se obtuvo como resultado la reducción de hasta un 44 % de masa de la biopelícula y también la reducción de Unidades Formadoras de Colonias presentes en las biopelículas en comparación con las superficies no tratadas. En todas las concentraciones se demostró una importante actividad antiadherente, por lo que se concluyó que el extracto hidroetanólico de *E.*

giganteum L. tiene un alto potencial antimicrobiano y capacidad para eliminar o prevenir la adhesión de *C. albicans* a las superficies acrílico resinosas.

Ramos (2019)²⁷, determinó la efectividad clínica y antibacteriana de la oleorresina de *Copaifera reticulata* en la terapia periodontal no quirúrgica de pacientes diabéticos tipo 2 con periodontitis, identificando por paciente, dos zonas homólogas (01 zona por arcada superior o inferior) con periodontitis, en el cual se evaluó la profundidad al sondaje, nivel de inserción clínica, sangrado al sondaje y color de la encía; se realizó un recuento bacteriano de la bolsa periodontal y una prueba de hemoglobina glicosilada al paciente. Se aplicó la terapia con la oleorresina en 20 zonas homólogas grupo experimental y se aplicó gluconato de clorhexidina en 20 zonas homólogas grupo control. Los resultados evidenciaron que las unidades formadoras de colonias (UFC) de las bolsas periodontales, en ambos grupos se redujeron significativamente, también se redujo el sangrado al sondaje y la profundidad al sondaje en ambos grupos, con valores similares, por lo cual se concluyó que el uso de esta planta medicinal podría ser utilizada como una ayuda en el tratamiento de la enfermedad periodontal.

Pardo et al. (2017)²², evaluó el efecto antibacteriano bacteriostático y bactericida del aceite esencial de *Citrus reticulata* (mandarina) frente a *F. nucleatum* asociado a las enfermedades periodontales, en concentraciones al 20, 40, 60, 80 y 100 %, mediante pruebas de difusión con disco, se utilizó como control positivo al gluconato de clorhexidina al 0.2 % y como control negativo al agua. Se demostró que el aceite esencial de *Citrus reticulata* al 100 % tiene un efecto bactericida similar al del gluconato de clorhexidina, la concentración al 80 % también tuvo un efecto bactericida, mientras que concentraciones al 60, 40 y 20 % manifestaron un efecto bacteriostático, concluyendo que los aceites esenciales de *Citrus reticulata* pueden utilizarse como terapia alternativa frente a las enfermedades periodontales.

Pachamango (2016)²³, investigó el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *Plantago major* (llantén), en las concentraciones del 50 y 75 %, mientras que el control

positivo de elección fue el gluconato de clorhexidina al 0.12 %; se utilizó las pruebas de concentración mínima Inhibitoria para determinar el efecto antibacteriano. Concluyendo que el extracto etanólico de *Plantago major* al 75 % presentó efectos inhibitorios semejantes al gluconato de clorhexidina.

García (2013)²⁴, evaluó el efecto antimicrobiano de la Óleo-resina de *Copaifera officinalis* sobre las principales cepas periodontopatógenas (*P. gingivalis* y *F. nucleatum*). Se utilizó el método de difusión en agar para evaluar el efecto antimicrobiano mediante el CMI. Las cepas ATCC 33277 de *P. gingivalis* fueron importadas y el medio de cultivo utilizado fue agar Schaedler suplementado con 5 % de sangre de cordero. Se obtuvo como resultados que la óleo-resina de *C. officinalis* presentó efecto antimicrobiano frente a ambas bacterias, con CMI de 1.56 % para *P. gingivalis* y 50 % para *F. nucleatum*, indicando que esta última bacteria fue más resistente al óleo-resina de *C. officinalis*.

3.2. Bases teóricas

3.2.1. Plantas medicinales

Las plantas medicinales, derivados más notables de los productos naturales, sirven para el tratamiento de algunas enfermedades y son una fuente potencial para la elaboración de medicamentos. En la gran mayoría de países, el desarrollo de la medicina moderna se sustenta en la medicina tradicional que así mismo, se basa principalmente en el uso de las plantas medicinales³⁰.

Se puede clasificar a las plantas medicinales según su importancia de uso, en primer lugar las que son utilizadas directamente en las terapias, seguidas por las que constituyen la materia prima para su manipulación terapéutica, por último se encuentran las que son utilizadas por las industrias farmacéuticas para la obtención de sus principios activos; el uso terapéutico de las plantas medicinales busca una medicina que disminuya la exposición de los pacientes a productos tóxicos, obtener una terapia eficaz y un menor impacto en el medio ambiente³¹.

Las plantas poseen un complejo sistema de defensa, una gran cantidad de sustancias químicas conforman este sistema. Desde hace mucho tiempo se tiene conocimiento de la capacidad antimicrobiana que brindan los tejidos de las plantas, por esta razón se avala su uso como bactericida y fungicida ante microorganismos patógenos humanos³⁰.

Actualmente existen entre 35000 y 70000 especies de plantas, comprobadas mediante estudios científicos, que se pueden emplear para su uso medicinal, por este motivo, las plantas medicinales que llegan a las industrias farmacéuticas tienen una larga historia en el tratamiento de diversas enfermedades³⁰.

Una investigación reciente en el norte del Perú evidenció que existen 510 plantas con propiedades medicinales, de éstas se encontraron 2499 usos terapéuticos distintos, entre los cuales las mismas especies se suelen utilizar para aliviar distintas condiciones médicas y existen diferentes formas de aplicación para tratar la misma condición³².

3.2.2. Fitoterapia

El término Fitoterapia es el nombre que se le atribuye al uso medicinal de las plantas que son aplicados en personas o con fines curativos. Existe una gran variedad de especies vegetales que son utilizadas por sus características curativas, este conocimiento y aplicación viene de las antiguas civilizaciones “pre medievales”, en todos los continentes, que fue denominado la farmacopea medieval. La fitoterapia en las culturas ha dejado un aporte científico extenso el cual ha sido aprovechado por la civilización moderna y la tecnología. En pleno siglo XXI los microorganismos se hacen cada vez más fuertes, por ello todas aquellas plantas y especies vegetales que fueron usadas para ciertos fines, son utilizadas en la ciencia y laboratorios para modificar, combatir o alterar nuevas enfermedades y bacterias que desarrollan resistencia³³.

En la actualidad las organizaciones e instituciones mundiales sobre salud han implementado políticas de uso o aplicación y se muestran en páginas los resultados y efectos que puedan llegar a tener el uso correcto o incorrecto de las especies vegetales

suministradas como medicina. Una de ellas es la conocida Organización Mundial de la Salud (OMS), ente que señala la importancia de la fitoterapia en el tratamiento y prevención de actuales y nuevas enfermedades. El interés científico de las plantas medicinales sigue siendo de mucha importancia y de gran valor tanto para el mercado farmacológico como para el uso curativo tradicional. Entiéndase también que la medicina tradicional ha nutrido de bases científicas a la medicina convencional, siendo la fitoterapia una de las primeras y vigentes formas curativas del mundo³⁴.

En otras palabras, se define a la fitoterapia como el empleo de las plantas con fines medicinales curativos, para el bienestar del hombre y su organismo; es así como sabemos que la fitoterapia es una práctica muy antigua que hasta la actualidad sigue teniendo mucha presencia y uso. Durante mucho tiempo los médicos rurales y personas con conocimientos de los beneficios de las plantas han realizado remedios naturales para sanar enfermedades o problemas del organismo, la fitoterapia llegó a ser el principal y único recurso de que disponían estos médicos. Por ende, la fitoterapia se ha centrado también en el conocimiento de las especies vegetales y las propiedades medicinales que poseen para ampliar las posibilidades en el empleo de estas, en productos, vacunas o fármacos en la rama de la medicina moderna³³.

3.2.3. Fitoterapia en Odontología

La aplicación de la fitoterapia en las distintas ramas de la medicina cumple con la función de ser una medicina alopática, en otras palabras, se utilizan los principales activos de las especies vegetales que son capaces de contrarrestar el problema físico de las personas como: dolencias, infecciones, inflamaciones, entre otras. Dentro de la actuación de la fitoterapia en la medicina existe la síntesis química y el producto fitoterápico, teniendo la diferencia que el primero sienta la efectividad sobre una molécula aislada estudiada en un laboratorio mientras que el segundo sienta la efectividad en su conjunto de principios y componentes naturales³³.

La fitoterapia en la odontología tiene el objetivo de ofrecer productos más accesibles y con menos toxicidad, ya que la producción química que contienen los productos bucales debe ser inocuos para los tejidos que componen la cavidad oral. Varias sustancias son usadas como agentes antisépticos para el tratamiento bucal ya que destacan por sus propiedades terapéuticas. Uno de los compuestos más usados en la odontología es el propóleo, que es una composición química bastante compleja recolectada por abejas en las yemas de diferentes especies vegetales. Este compuesto químico es usado y observado para el tratamiento de lesiones bucales, donde tiene presencia en varias áreas de la odontología como: cariología, endodoncia, periodoncia, entre otras³⁵.

Otro producto fitoterapéutico utilizado en la odontología es el ajo (*Allium sativum*), que tiene las propiedades esenciales para combatir bacterias orales. Es así como podemos encontrar una variedad de especies vegetales que son usados dentro del campo de la odontología; los productos químicos desarrollados a base de estas especies buscan combatir bacterias alojadas en el biofilm bucal³⁵.

En el campo de la odontología la fitoterapia también se usa como analgésico para aliviar dolores de origen dentario, el desconocimiento de los beneficios que ofrece las especies vegetales trae consigo pequeños problemas para los odontólogos ya que, dentro de las actualizaciones y medidas naturales de cuidados bucales, se encuentra el uso de vegetales y frutas que son remedios naturales para calmar o estimular necesidades bucales de los pacientes³⁶.

3.2.4. Equisetum

El género *Equisetum* pertenece a la clase *Equisetaceae* y su nombre común-comercial es “cola de caballo” que por la derivación etimológica de las palabras en latín “*equus*” y “*seta*” significan “caballo” y “pelo” respectivamente; son plantas con sistemas vasculares poco desarrollado y son esporófitica lo que hace que sea dominante; la principal característica de este género es que presenta los tallos silicios y sus hojas reducidas

forman una cubierta en los tallos, se reproducen por medio de rizomas. El hábitat ideal para los *Equisetum* son las zonas húmedas y comúnmente viven sobre superficies con muchas rocas, paredones, arenosos y lugares húmedos, cabe mencionar también que el género *Equisetum* es una planta que no cuenta con exigencias frente al punto geográfico donde crecen, exceptuando los climas bajo cero o estaciones invernales donde a menudo mueren. Actualmente se conocen 16 especies del género en distintos países con diferentes climas, y es originaria del continente americano^{8,37}.

El tamaño que presentan es variado por lo general entre 01 a 03 m de altura, antiguamente los *Equisetum* cubrían gran parte de los arroyos y bosques del continente americano y por sus características físicas son escamosas lo que provoca raspadura y una sensación dura al realizar el tacto de dicha planta, por su composición química el *Equisetum* se ha usado en la medicina para curar heridas, tratar enfermedades, proteger y reforzar ciertas partes del organismo humano³⁷.

El género *Equisetum* es conocido generalmente en la población como “cola de caballo” por su apariencia en forma de eje, carece de frutos y flores, es una planta estilo hierba que se reproduce vegetativamente mediante esporas, rizomas y esporofitos de manera sexual que generalmente sucede durante los climas o fenómenos lluviosos, a su vez presentan asociaciones simbióticas con las micorrizas. Una característica importante es que sus tallos son de forma curvilínea lo que permite la absorción y distribución del agua por medio de sus nudos y entrenudos³⁸.

3.2.5. *Equisetum giganteum* L.

3.2.5.1. Descripción botánica

Es una planta robusta y alta que mide de 01 a 02 m de altura, puede llegar a alcanzar los 05 m de altura, presenta un tallo principal hueco de 01 a 02 cm de diámetro, con nudos conformados por 24 a 30 hojas verticiladas en forma de dientes. Presenta ramas laterales verticiladas que nacen de los nudos del tallo principal y presentan las mismas

características de este, excepto en su diámetro que es más delgado. Posee 02 tipos de tallos aéreos, unos fértiles que se desarrollan en primavera, luego desaparecen; por otro lado, se encuentran los tallos estériles que empiezan a crecer después de que los fértiles han emergido. En su etapa reproductiva presenta estróbilos ubicados en las terminaciones del tallo y ramas laterales^{39,40}.

3.2.5.2. Distribución geográfica

Esta planta es una especie cosmopolita ya que se encuentra distribuída por casi todo el planeta, es originaria de Centroamérica y América del Sur y es colonizador de áreas deforestadas creciendo en orillas de lagos y en ambientes pantanosos^{41,42}. En Perú, crece en ambientes húmedos en casi todos los departamentos, puede crecer en climas de hasta 4200 m de altitud⁶.

3.2.5.3. Ubicación taxonómica

E. giganteum L. deriva de una familia arbórea primitiva con una antigüedad de aproximadamente 400 millones de años, es sobreviviente de un grupo de plantas que existieron en los períodos devónico y triásico, cuya existencia se conoce gracias a los restos fósiles encontrados de la era paleozoica⁴³⁻⁴⁵.

La clasificación taxonómica de *E. giganteum* L. se desarrolla de la siguiente manera (véase anexo 1).

3.2.5.4. Composición química

La “cola de caballo” se caracteriza por su alto contenido en silicio que se presenta en forma de ácido sílico, se dice que el *Equiseto* tiene la mayor concentración de este compuesto químico comparado con toda la flora americana y europea. Presenta aproximadamente 3.39% de silicio en su composición, este se encuentra localizado en la membrana externa de la epidermis de los tallos y hojas; en las raíces su concentración es mayor por lo cual no son utilizadas habitualmente en la terapéutica. De

manera general, se menciona que el ácido sílico, saponinas y flavonoides son responsables del potencial terapéutico de esta planta. Según la literatura los tallos principales y las ramas laterales estériles son las más utilizadas para la obtención adecuada de sus propiedades medicinales.^{46,47}

Según el análisis de los datos de la literatura en la composición química, el género *Equisetum* tiene más de 210 compuestos fitoquímicos naturales en varios de sus órganos; siendo los compuestos fenólicos como los flavonoides y los ácidos fenolcarboxílicos la clase de compuestos más estudiados. Los flavonoides producidos por el género *Equisetum* se presentan en los siguientes tipos: flavonas, flavonoles, flavanonas y flavan-3-oles; los flavonoles son el grupo de flavonoides dominantes en este género. Estos flavonoides presentan un amplio espectro de acción biológica, baja toxicidad, lo cual resulta prometedor en términos de nuevos agentes medicinales, numerosos estudios han demostrado que las formulaciones a base de estas plantas son muy eficaces en propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias, antibacterianas y antioxidantes⁴⁸.

Un estudio experimental que utilizó extracto acuoso de “cola de caballo” analizó los componentes del principio activo del extracto, dando como resultado la presencia de 03 importantes principios activos⁸.

Alcaloides: Se encontró 0.02 ul/ml de compuesto; los alcaloides tienen la capacidad de intercalarse con el ADN, inhibir las enzimas de los carbohidratos y la síntesis de proteínas, lo cual muestra sus efectos inhibitorios en el crecimiento de los microorganismos patógenos⁸.

Taninos: Se encontró 0.03 ul/ml de compuesto en la muestra; los taninos son compuestos fenólicos, presentan más de 30 tipos capaces de inhibir microorganismos como hongos y bacterias⁸.

Flavonoides: Se encontró 0.02 ul/ml de compuesto; al igual que los taninos son compuestos fenólicos y están presentes en la “cola de caballo”, formando complejos con las proteínas solubles y extracelulares de la pared bacteriana, lo cual le confiere sus propiedades antimicrobianas⁸.

3.2.6. Propiedades medicinales del género *Equisetum*

Como uso tradicional se le atribuyen múltiples usos medicinales en distintas comunidades del Perú, sin embargo, su uso se hace de manera empírica sin conocer la posología y los efectos adversos que podría causar su uso excesivo, por ello se incentiva al personal de salud a realizar intervenciones educativas en las comunidades con el fin de dar a conocer el uso responsable de esta planta medicinal⁴⁹.

A continuación, se describen las principales propiedades medicinales de la “cola de caballo” que guardan relación con los beneficios para la salud periodontal.

3.2.6.1. Antiinflamatorio

Un estudio evaluó sus efectos antiinflamatorios mediados por su alto contenido en sílice, los resultados evidenciaron una inhibición significativa en la proliferación de linfocitos T por medio de mecanismos de apoptosis, en presencia de distintas preparaciones de “cola de caballo”⁵⁰.

Mediante otro estudio experimental se demostró que esta planta ejerce su efecto antiinflamatorio al suprimir la actividad de la proteína JNK que participa en muchos procesos celulares, en especial de tipo inflamatorio. Se ha demostrado que también suprime la expresión del TNF- α (factor de necrosis tumoral) en células T, el cual en la periodontitis es responsable de estimular la producción de mediadores inflamatorios, amplificando y manteniendo la respuesta inflamatoria de modo que se reduzca la capacidad reparativa del periodonto^{51,52}.

3.2.6.2. Antioxidante y anticancerígeno

Se tiene conocimiento que los fenoles y flavonoides que contiene la “cola de caballo” tienen capacidad para entregar electrones o hidrógenos y estos a su vez, disminuyen la cantidad de radicales libres en el organismo lo cual hace menos propenso a quien la consume, de generar líneas celulares cancerígenas⁵³.

La “cola de caballo” ha demostrado tener capacidades antioxidantes y anticancerígenas eficaces, estudios donde se utilizó el extracto etanólico de esta planta, demostraron efectos citotóxicos (eliminación de células cancerígenas), beneficiosas en combatir las líneas celulares del carcinoma de pulmón; también se ha demostrado que activa la muerte celular en AsPC-1 (línea celular del carcinoma pancreático), induciendo su apoptosis; considerándose así un poderoso supresor cancerígeno⁵⁴.

3.2.6.3. Antimicrobiano

Diversos estudios evaluaron su efecto antimicrobiano frente a microorganismos de interés médico asociados a infecciones uropatógenas tales como *Escherichia Coli* y *C. albicans*, y a bacterias como *Staphylococcus aureus*; se realizaron otras investigaciones sobre bacterias patógenas orales como *S. mutans*, *P. gingivalis*, y sobre microorganismos como *C. albicans*, adheridos a las prótesis dentales; dando como resultado que *E. giganteum* L. sí presenta efecto antibacteriano ante todos estos microorganismos en el campo de la odontología^{8,9,19,20}.

3.2.6.4. Hemostático

Uslu et al.⁵⁵, evaluó la actividad hemostática del extracto etanólico de la “cola de caballo”, determinó que esta planta tiene propiedades coagulantes y anticoagulantes, estas propiedades van a depender de manera directa de la concentración de fenoles y de la capacidad antioxidante del extracto; con una máxima concentración de fenoles y capacidad antioxidante el extracto presenta efectos anticoagulantes. Sin embargo, si existe mínima concentración de fenoles, el extracto se volverá un agente coagulante.

Estas dos propiedades son importantes para el uso medicinal ya que se puede utilizar esta planta como un hemostático y en otras ocasiones como anticoagulante natural.

3.2.6.5. Cicatrizante

Proaño⁵⁶, ejecutó un estudio realizando heridas de 02 cm de largo y 02 mm de profundidad en la región escapular en ratones de laboratorio para evaluar el efecto cicatrizante de una crema, combinación de tres plantas medicinales entre las que se encontraba el extracto hidroalcohólico de la “cola de caballo”. El estudio reportó que sí existe efectividad cicatrizante de la crema, y esto se debe a los flavonoides que otorgan las plantas medicinales presentes en el estudio y a la mayor cantidad de taninos que aporta la “cola de caballo”.

3.2.7. Enfermedades periodontales

3.2.7.1. Generalidades

El periodonto es considerado un lecho funcional que se clasifica en dos tipos: periodonto de protección y periodonto de inserción. El periodonto de protección comprende a la encía que es parte de la mucosa masticatoria, recubre los alvéolos y la porción cervical de los dientes; el periodonto de inserción comprende al ligamento periodontal, cemento radicular y al hueso alveolar; su principal función es unir a la pieza dentaria con el tejido óseo de la maxila o mandíbula, además mantiene la integridad de la superficie de la mucosa masticatoria⁵⁷.

Las enfermedades periodontales son una condición inflamatoria crónica de origen multifactorial cuyo principal factor etiológico es la instauración de un complejo biofilm de origen microbiano, ubicado en un ambiente altamente organizado y favorable para su desarrollo y crecimiento. Esto, sumado a otros factores adicionales sistémicos y locales, ocasionan la infección y deterioro de las estructuras del periodonto (encía, ligamento periodontal, hueso alveolar y cemento radicular), manifestando signos clínicos como el

sangrado gingival, movilidad dentaria, recesión gingival y presencia de bolsa periodontal⁵⁸.

Existen múltiples mecanismos de protección del huésped para mantener al periodonto sano en presencia de bacterias de la microbiota oral, formándose así relaciones simbióticas entre estas bacterias y el huésped. Sin embargo, el problema existe cuando ocurre un desbalance entre los microorganismos y se establece el predominio de las bacterias periodontopatógenas que menciona la literatura, tales como *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, que según los estudios son detectadas con mayor frecuencia en pacientes con cuadros de periodontitis moderada, incluso se sugiere que la asociación de estas dos bacterias facilitan la colonización de otros microorganismos patógenos como *Aggregatibacter sp.*, el cual es responsable de generar la periodontitis severa⁵⁹.

3.2.7.2. Epidemiología de las enfermedades periodontales

La evidencia científica en estudios epidemiológicos demuestra que las enfermedades periodontales tienen una relación estrecha con enfermedades como la diabetes mellitus, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, cáncer, etc; además indican que esta enfermedad disminuye la calidad de vida de las personas que lo padecen y afecta con más frecuencia a los estratos socioeconómicos más bajos⁶⁰.

Las enfermedades periodontales (EP) son consideradas un problema de salud pública, se encuentran dentro de las enfermedades más comunes y prevalentes, según la OMS, la EP, después de la caries dental, representa el segundo problema de morbilidad bucal a nivel mundial, además el 10 % de la población mundial (aproximadamente 04 millones de personas) es afectada por esta enfermedad, y según otros estudios se habla de hasta un 50 % de población afectada en el mundo^{28,58}.

Horna⁶¹, realizó un estudio en 691 adultos jóvenes de 18-24 años en el año 2016 en Lima-Perú, evaluó la prevalencia de las enfermedades periodontales en esta población, encontrando que el 70.91 % presentaba la prevalencia de estas enfermedades.

Otro estudio realizado en Latinoamérica por Morales et al.⁶², indica que la prevalencia general de EP en el continente es del 90 al 100 %.

3.2.7.3. Nueva clasificación de las enfermedades periodontales

La Nueva Clasificación del World Workshop de 2017, surge de la necesidad de llegar a un consenso para clasificar, definir y simplificar la definición de la salud periodontal y las enfermedades y condiciones periodontales como gingivitis y periodontitis; y las enfermedades y condiciones periimplantarias, desde un punto de vista clínico e histológico⁶³.

La Nueva Clasificación de las Enfermedades Periodontales y Periimplantarias, brinda una definición concisa de salud periodontal; indica que la salud gingival puede presentarse en un periodonto intacto (periodonto que no presenta pérdida de inserción clínica o pérdida ósea) y en un periodonto reducido (aquel periodonto que se presenta en 2 casos, como en un paciente sin periodontitis que ha sido sometido a procedimientos como alargamientos coronarios o gingivectomías; o en un paciente que presenta antecedentes de periodontitis), mientras que el término salud/ estabilidad se utiliza para definir a la periodontitis tratada con éxito⁶⁴.

Por otro lado agrupa a la gingivitis en dos categorías: gingivitis inducida por biofilm de placa bacteriana y enfermedades gingivales no inducidas por biofilm de placa bacteriana; mientras que con la Periodontitis adopta un nuevo esquema de clasificación, clasificándose en 03 formas: Periodontitis, Periodontitis Necrotizante y Periodontitis como manifestación directa de enfermedades sistémicas; para los casos individuales de periodontitis se elaboró un sistema multidimensional que lo clasifica en estadios que describen la gravedad y extensión de la enfermedad; y en grados, que describen la probabilidad de su progresión. Además, se consideró que, tras un tratamiento exitoso de periodontitis, su estado puede ser clasificado en cualquier momento mediante tres

formas: Controlado, en remisión (es decir con inflamación gingival), y no controlado (recidiva de periodontitis)^{64,65}.

Por consiguiente, se describirán las 02 principales patologías periodontales causadas directamente por el biofilm de placa bacteriana; la gingivitis inducida por biofilm de placa bacteriana y la periodontitis, según la Nueva Clasificación.

3.2.7.3.1. Gingivitis inducida por biofilm de placa bacteriana

La gingivitis se clasifica tanto en un periodonto intacto como reducido; y es dividida en 03 categorías⁶⁴:

- Asociada únicamente a biofilm dental
- Mediada por factores de riesgo sistémicos o locales
- Hipertrofia gingival por influencia de fármacos

3.2.7.3.2. Periodontitis

La anterior clasificación de la periodontitis de 1999 clasificaba a la periodontitis en crónica y agresiva, sin embargo, no existe evidencia científica que estas sean enfermedades diferentes, por este motivo, la Nueva Clasificación las agrupa y se describe una única categoría de periodontitis que se identifica de tres formas⁶⁵:

- **Periodontitis**

La Sociedad Española de Periodoncia (SEPA), define la periodontitis en base a la Nueva Clasificación, como una enfermedad inflamatoria crónica de múltiples factores, causada por un biofilm de placa bacteriana disbiótica, que se caracteriza por la destrucción progresiva del aparato de sostén del diente que conduce a una pérdida de inserción periodontal.

La periodontitis se caracteriza por tres factores⁶⁵:

- a. La pérdida de inserción clínica (PIC/CAL), valorada mediante el uso de una sonda estandarizada; y la pérdida de hueso alveolar valorada radiográficamente.

- Un paciente será considerado como caso de periodontitis cuando presente PIC/CAL interproximal detectable en 02 o más dientes no adyacentes de un paciente; o un PIC/CAL en la zona vestibular o lingual de 03 o más milímetros con bolsas mayores a 03 mm; en 02 o más dientes.
- b. La presencia de bolsas periodontales
- c. Sangrado al sondaje

El sangrado al sondaje es una forma de medir la inflamación gingival, es un parámetro clínico importante para la evaluación tras el tratamiento de la periodontitis y para tener conocimiento del riesgo residual de padecer la enfermedad una vez aplicado el tratamiento⁶⁵.

- **Periodontitis Necrotizante**

La periodontitis necrotizante es un proceso inflamatorio del periodonto caracterizado por la presencia de ulceraciones en el margen gingival, y el depósito de fibrina en localizaciones específicas donde se encuentran papilas gingivales decapitadas, característica principal de esta enfermedad; además en algunos casos se encuentra la exposición del hueso alveolar marginal, y se asocia con pacientes sistémicamente comprometidos⁶⁶.

- **Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas**

En esta forma de periodontitis es recomendable que el odontólogo identifique y realice la clasificación de la enfermedad primaria usando los códigos de la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas de Salud Asociados (ICD, International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems)⁶⁵.

En los casos individuales de periodontitis se elaboró un sistema multidimensional que se basa en estadios y grados⁶⁵.



Fig 01. Clasificación de los IV estadios de la periodontitis según la Nueva Clasificación 2017, que describe al estadio I como periodontitis inicial, seguido por el estadio II como periodontitis moderada, estadio III como periodontitis grave y estadio IV para clasificar la periodontitis avanzada⁶⁵.

- **Estadios:** En este aspecto se describe la gravedad y la complejidad de la enfermedad; el índice de gravedad está basado en la PIC/CAL y la pérdida ósea marginal, es asignado al diente más afectado. El índice de complejidad se basa en la complejidad del tratamiento.
- **Grados:** Esta clasificación añade otra dimensión considerando la tasa de progresión de la enfermedad, también toma en cuenta la información sobre las características biológicas de la enfermedad y la valoración del riesgo (por ejemplo, enfermedades sistémicas del paciente como la diabetes mellitus tipo 2).



Fig 02. Esquema de los grados de la periodontitis según la Nueva Clasificación 2017, considerando las tasas de progresión de la enfermedad en grado A como tasa de progresión lenta, grado B como tasa de progresión moderada y grado C como tasa de progresión rápida⁶⁵.

3.2.7.4. Tratamiento de las enfermedades periodontales

Durante los últimos años se ha notado un creciente interés por el uso de plantas medicinales para el tratamiento de las patologías periodontales, ya que las bacterias con el paso del tiempo generan resistencia a los antibióticos y antimicrobianos usados para controlar el biofilm dental⁶⁷. Los medicamentos fitoterapéuticos poseen efectos antimicrobianos, antisépticos, antiinflamatorios y antioxidantes, estas propiedades ayudan a suprimir la respuesta inflamatoria (responsable de la destrucción de los tejidos de soporte del diente) que ocurre en las enfermedades periodontales. La acción antiinflamatoria y oxidativa son una de las principales acciones terapéuticas a largo plazo de estos medicamentos⁶⁸.

Se realizó una revisión sistemática con el objetivo de evaluar el efecto de la aplicación local de agentes fitoterapéuticos como complemento del raspado y alisado radicular,

sobre los parámetros clínicos de los pacientes periodontales crónicos, todos los estudios revisados dieron como resultado que el tratamiento periodontal en asociación a la administración local de la fitoterapia, promueve una reducción significativa de la profundidad de sondaje y la ganancia del nivel de inserción clínica⁶⁹.

Existe una parte de la población que presenta periodontitis (en estadios III y IV) que no responden de manera positiva a la terapia periodontal convencional, esto representa la necesidad de los investigadores de encontrar alternativas terapéuticas para tratar esta enfermedad, por este motivo, un estudio realizó una revisión sistemática para demostrar de manera consistente que la administración subgingival de productos naturales después del raspado y alisado radicular genera una mejor reducción de la profundidad al sondaje en comparación al tratamiento de raspado y alisado radicular convencional. Se encontró una reducción significativa de la inflamación periodontal favorecida por el uso de productos naturales y una ventaja de la terapia de raspado y alisado radicular asociada al uso de estos productos en comparación a usar solo la terapia periodontal convencional⁷⁰.

3.2.8. Microbiota periodontopatógena

En 2002, Socransky y Haffajee, estudiaron la organización de bacterias en el biofilm y descubrieron la existencia de asociaciones específicas, agrupándolas en 06 complejos bacterianos ubicados en una pirámide. La base conformada por el complejo azul, amarillo, verde y morado, se compone de especies que colonizan las superficies dentarias y proliferan en las primeras etapas de colonización bacteriana, conformando una microbiota característica del biofilm gingival de individuos sanos; seguidos por el complejo naranja, el más numeroso que actúa como “puente microbiano” entre los colonizadores tempranos y los tardíos, que finalmente componen el complejo rojo que se incorpora tardíamente en el desarrollo del biofilm y alberga especies que se consideran los principales agentes etiológicos de la periodontitis⁷¹.

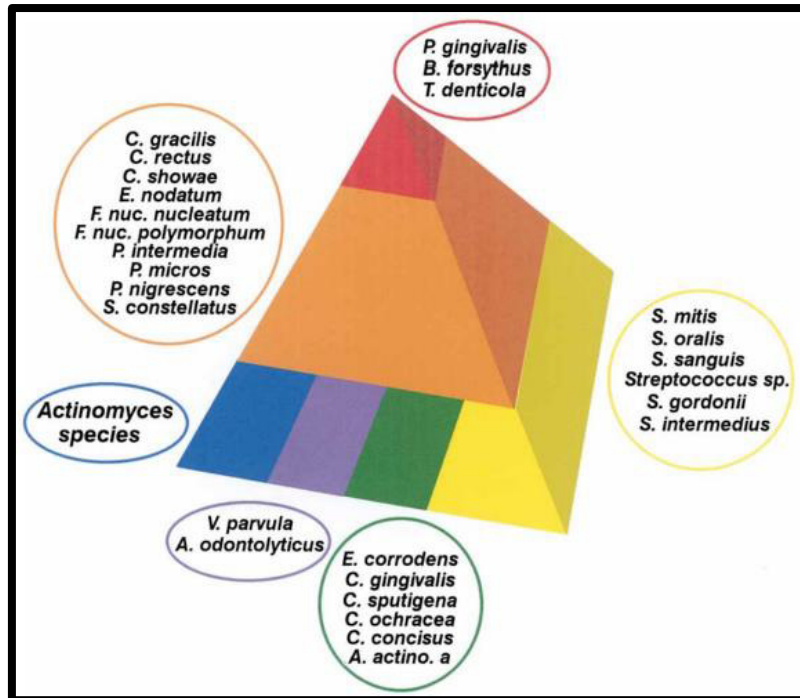


Fig 03. Diagrama de complejos del biofilm oral, descritos por Socransky y Haffajee, F. *nucleatum* conforma el complejo naranja como microorganismo intermediario entre los colonizadores primarios primarios y secundarios⁷¹.

La interacción del microbioma oral y la respuesta del huésped es un mecanismo complejo debido a la gran cantidad de taxones bacterianos que residen en el microbiota subgingival y a la constante variabilidad de estos; así como a la complejidad de las respuestas inmunitarias del huésped. La presencia de bacterias periodontopatógenas son esenciales para la instauración de la gingivitis y la periodontitis; y para el desarrollo de sus estadios más severos, por este motivo los tratamientos en la actualidad están dirigidos estratégicamente a tratar el biofilm subgingival⁷².

Las comunidades microbianas subgingivales están compuestas por bacterias, arqueas, hongos y virus, de estas, las bacterias son el componente más abundante, según la literatura existen unas 500 especies bacterianas en la zona subgingival. Estudios microbiológicos han demostrado que tras 02 o 03 semanas de acumulación de placa, los morfotipos Gramnegativos como *F. nucleatum* se vuelven predominantes

correlacionándose con la inflamación clínica de la gingiva que da origen a la gingivitis. Bacterias que componen el llamado “complejo rojo” como son *T. denticola*, *P. gingivalis* y *Tannerella forsythia* aparecen como componentes abundantes en comunidades microbianas causantes de periodontitis⁷².

3.2.8.1. *Fusobacterium nucleatum*

3.2.8.1.1. Descripción

Es un microorganismo comensal y versátil de la cavidad bucal, responsable de colonizar inicialmente en el biofilm dental y actuar como puente entre los colonizadores iniciales y tardíos; tiene la capacidad de coexistir con diversos patógenos periodontales y considerado un patógeno con moderada actividad en las enfermedades periodontales, es descrito por Socransky como componente del complejo naranja. *F. nucleatum* presenta la capacidad de diseminarse por diferentes regiones fuera de la cavidad oral, por lo que se es asociada a múltiples enfermedades sistémicas como la apendicitis, osteomielitis, cáncer colorrectal y la endocarditis⁷³.

3.2.8.1.2. Taxonomía

F. nucleatum es una bacteria Gram negativa, anaerobia estricta, sin embargo, puede crecer en presencia de oxígeno, tiene forma de huso y bacilar, de tamaño 05 a 25 µm de largo aproximadamente, presenta un núcleo con gránulos intracelulares en su interior, no presenta espora ni movilidad; pertenece a la familia *Bacteroidaceae*, al género *Fusobacterium*; presentando 05 subespecies las cuales son: ss. *Animals*, ss *fusiforme*, ss *nucleatum*, ss *polymorphum*, y ss *vincentii*^{73,74}.

3.2.8.1.3. Nutrición

Para el crecimiento de este microorganismo se utilizan medios de cultivos selectivos como el agar CVE (agar cristal violeta, eritromicina), que contiene tripticasa al 01 %, extracto de levadura al 0,5 % y sangre de oveja al 5 %, ideales para su nutrición y

crecimiento; también se puede utilizar agar Schaedler enriquecido con 05% de sangre de cordero. La temperatura ideal para su crecimiento es de 37 °C en condiciones de anaerobiosis durante 05 a 07 días aproximadamente. Su hábitat se encuentra dentro del surco gingival, las bolsas periodontales, y en superficies de la cavidad oral como la lengua y amígdalas, también en la saliva; se ha encontrado la presencia de este microorganismo en abscesos, sangre y en patologías como la otitis y sinusitis⁷³.

F. nucleatum es considerado un microorganismo anaerobio estricto, aunque la sensibilidad ante el oxígeno varía entre los diferentes géneros y especies, por lo que puede desarrollarse hasta en presencia de un 06 % de oxígeno. Presenta una actividad sacarolítica escasa o moderada, cataboliza péptidos y aminoácidos como aspartato, glutamato, histidina y lisina; de los cuales el producto más común de su catabolismo es el ácido butírico, seguido por el ácido láctico y acético⁷⁵.

3.2.8.1.4. Factores de virulencia

F. nucleatum está implicado en infecciones tanto dentro como fuera de la cavidad oral porque presenta mecanismos claves de virulencia que se clasifican en 02 grandes grupos: mecanismos de colonización y diseminación; y en segundo lugar la inducción de respuestas inmunitarias del huésped⁷⁶.

Mecanismos de colonización y difusión: Esta bacteria codifica varias adhesinas como la Fap2, RadD y Aid1, para realizar interacciones entre especies; también invade células epiteliales y endoteliales. Estos mecanismos son esenciales para la colonización y diseminación, explicando así el por qué en muchas investigaciones se encuentra a este microorganismo diseminado por el organismo humano⁷⁶.

- **FadA:** Es una adhesina e invasina, necesaria para la unión e invasión de células sanas y cancerosas; representa el mayor factor de virulencia relevante de este microorganismo, se ubica en la membrana externa de su pared celular; FadA se une a las cadherinas del tejido endotelial aumentando la permeabilidad de éste y

permitiendo la invasión directa hacia la célula huésped, facilitando también la invasión de otras especies cercanas⁷⁶.

- **Enzimas hidrolíticas y proteolíticas:** *F. nucleatum* degrada la matriz del tejido conectivo mediante enzimas hidrolíticas como la hialuronidasa y condroitinasa; también mediante enzimas proteolíticas como la serina proteasa que degrada la Ig A (anticuerpo que inhibe la adhesión bacteriana)⁷³.

Inducción de respuestas inmunitarias del huésped: En condiciones saludables, los factores de inflamación se mantienen bajo la homeostasis, sin embargo, bajo un ambiente disbiótico, *F. nucleatum*, se convierte en un patógeno al inducir una inflamación exacerbada, por ejemplo, induce la producción de β -defensina 2 humana a partir de células epiteliales orales, también estimula citoquinas inflamatorias, al unirse NK activa las respuestas inflamatorias implicadas en la patogénesis de las enfermedades periodontales⁷⁴.

- **LPS:** Endotoxina relacionada con la patogenicidad de esta bacteria, estimula la secreción de IL-8 en macrófagos, contribuye de manera indirecta al aumento de Pg E-2 que está relacionada con la pérdida ósea alveolar. Diversos estudios han demostrado que el LPS sializado puede inmunosuprimir receptores parecidos a la Ig G, evitando la adecuada vigilancia epidemiológica del huésped⁷⁷.
- **Proteína FomA:** Ubicada en la membrana externa de la bacteria, esta proteína es una porina, implicado en mecanismos de coagregación bacteriana; se une a la estaterina (proteína salival con alto nivel de adhesión), para adherirse y colonizar de manera temprana y tardía las biopelículas orales⁷⁸.

3.2.8.2. Relación entre *F. nucleatum* y enfermedades sistémicas

Se ha demostrado que *F. nucleatum*, mediante la circulación, puede migrar desde la cavidad oral a otras partes del cuerpo humano, ocasionando abscesos anginosos, pulmonares y ginecológicos; las últimas investigaciones correlacionan la migración de *F.*

nucleatum a los tejidos intestinales, específicamente al cáncer colorrectal, se sabe que la presencia de la proteína FadA en la membrana de esta bacteria, a través de sus propiedades adhesivas, contribuye a la inflamación local teniendo como consecuencia el desarrollo de lesiones neoplásicas en los intestinos⁷⁹.

3.3. Definición de términos

Microbioma bucal: Conjunto de microorganismos, genes y metabolitos que cohabitan en diferentes regiones de la cavidad oral, ubicados en un nicho ecológico establecido, contiene una carga genética propia y diferente en cada ser humano, por lo que es considerado la nueva huella dactilar.

Microbiota oral: Comunidad de microorganismos vivos que se desarrollan y coexisten en un nicho ecológico determinado como la cavidad oral.

Biofilm oral: Estructura conformada por agrupaciones bacterianas que se adhieren a las superficies de tejidos blandos y duros de la cavidad oral.

Extracto etanólico: Extracto obtenido de la maceración de etanol con tallos estériles disecados de *E. giganteum* L., seguida de la evaporación de dicho solvente por un procedimiento físico.

Efecto antibacteriano: Es la inhibición en el desarrollo o crecimiento de bacterias debido a la presencia de un medicamento, sustancia o procedimiento.

Bacteria periodontopatógena: Bacteria anaerobia estricta que coloniza y predomina frecuentemente los tejidos subgingivales durante las enfermedades periodontales.

Cepa ATCC: Cepa bacteriana de referencia, certificada internacionalmente por la ATCC (American Type Culture Collection) y utilizada para investigaciones microbiológicas.

Halo de inhibición: Halo generado alrededor del disco de antibiótico que muestra el área de no crecimiento o desarrollo bacteriano en el medio de cultivo.

Colonias bacterianas: Agrupación de bacterias de una sola especie que crecen en un medio de cultivo, de morfología característica que pueden ser observadas macroscópicamente

Unidad Formadora de Colonias (UFC): Unidad de medida empleada para contabilizar el número de colonias de bacterias viables encontradas en una muestra.

Agar Schaedler: Medio de cultivo no selectivo estándar, utilizado para el desarrollo y crecimiento de bacterias anaerobias estrictas.

Escala McFarland: Método turbidimétrico que utiliza una serie de tubos estandarizados con contenido de sulfato de bario para compararlos con suspensiones de microorganismos y así asignar un valor que puede ir de 0.5 a 10.

Método de difusión en agar (Técnica de Bauer & Kirby): Método empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico, consiste en la siembra de este agente en un medio de cultivo y la posterior colocación de discos con antibiótico para evaluar el efecto que se verá reflejado en un halo de inhibición.

Escala de Duraffourd: Escala de naturaleza cualitativa que determina los niveles de sensibilidad de un antibiótico mediante el promedio la medición de los halos de inhibición de una muestra.

3.4. Hipótesis

H1: Existe efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *E. giganteum* L. frente a cepas de *F. nucleatum*.

H0: No existe efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *E. giganteum* L. sobre cepas de *F. nucleatum*.

3.5. Operacionalización de variables

- I. Variable independiente: Extracto etanólico de *E. giganteum* L.

- II. Variable dependiente: Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *E. giganteum* L. frente a *F. nucleatum*.
- III. Variables de control
- Control positivo: Gluconato de clorhexidina al 0.12 %
 - Control negativo: Suero fisiológico

Tabla N° 01. Operacionalización de la variable independiente

VARIABLE INDEPENDIENTE	CONCEPTUALIZACIÓN	INDICADOR	ESCALA	CATEGORÍA
Extracto etanólico de <i>E. giganteum</i> L.	Extracto obtenido de la maceración de etanol con tallos estériles disecados de <i>E. giganteum</i> L., seguida de la evaporación de dicho solvente por un procedimiento físico.	Concentración	Razón	6.25 % 12.5 % 25 % 50 % 100 %

Tabla N° 02. Operacionalización de la variable dependiente

VARIABLE DEPENDIENTE	CONCEPTUALIZACIÓN	INDICADOR	ESCALA	VALOR
Efecto antibacteriano <i>in vitro</i> del extracto etanólico de <i>E. giganteum</i> L. frente a <i>F. nucleatum</i>	Es la inhibición en el desarrollo o crecimiento de <i>F. nucleatum</i> debido a la presencia del extracto etanólico de <i>E. giganteum</i> L.	Escala de Duraffourd	Ordinal	<p>Sensibilidad nula: <8 mm</p> <p>Sensibilidad límite: 8-14 mm</p> <p>Sensibilidad media: 15-19 mm</p> <p>Sumamente sensible: ≥20 mm</p>

IV. METODOLOGÍA

4.1. Tipo de investigación

El presente estudio fue de tipo:

- **Experimental**, porque se manipularon artificialmente las condiciones de investigación para valorar el efecto de una o más variables.
- **In vitro**, porque el estudio se realizó en un ambiente controlado y favorable, fuera de un organismo vivo dentro de un laboratorio.

Tuvo un enfoque cualitativo y cuantitativo.

4.2. Población y muestra

4.2.1. Población

- Cultivo de cepas estándares de *F. nucleatum* ATCC 25586.

4.2.2. Muestra

La selección de la muestra se determinó de manera no probabilística por conveniencia del investigador.

El tamaño de la muestra fue:

- 10 placas Petri, cada placa con 05 discos en concentraciones al en concentraciones al 6.25 %, 12.5 %, 25 %, 50 %, 100 % + 01 disco de control positivo + 01 disco de control negativo, sembradas con *F. nucleatum*.

Repeticiones: 10 por cepa

Total: 10 placas Petri

Unidad muestral:

- Placa Petri sembrada con *F. nucleatum*.

4.2.2.1. Criterios de inclusión

- 10 placas con cultivo de *F. nucleatum* ATCC 25586, con los discos conteniendo las diversas concentraciones del extracto alcohólico de *E. giganteum* L.

4.2.2.2. Criterios de exclusión

Placas con cultivos contaminados o sin crecimiento de las cepas correspondientes.

4.2.2.3. Unidad de análisis

Halo de inhibición medido en milímetros del disco de papel embebido en cada una de las concentraciones del extracto etanólico de *E. giganteum* L., el control positivo y negativo.

4.3. Procedimientos y técnicas

4.3.1. Obtención de la planta *E. giganteum* L.

A tempranas horas de la mañana a mediados del mes de mayo, en el distrito de Huaquirca, provincia Abancay, departamento de Apurímac, localizado a 3100 m.s.n.m, se ubicó una plantación natural de “cola de caballo”, sobre un suelo húmedo y arcilloso, las plantas tenían un tamaño de 2.5 a 03 m de altura. Se procedió a realizar la cosecha de 05 kg de planta entera con unas tijeras de podar y se almacenó en una bolsa de papel Kraft debidamente rotulada para su posterior transporte a Lima. Una muestra de la planta fue llevada al herbario del Museo de Historia Natural de la UNMSM, y presentada ante la PhD. Blanca León, bióloga con amplia trayectoria en investigación de Equisetos, la cual realizó el respectivo reconocimiento taxonómico de la especie determinando que la muestra correspondía a *E. giganteum* L.

4.3.2. Procesamiento de *E. giganteum* L.

Se transportaron 05 kg de planta entera al laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la UNMSM. Se procedió a separar los tallos

principales y tallos estériles en buen estado, de las impurezas de la planta, quedando 01 kg en total de muestra lista para ser procesada. Luego se lavó y desinfectó con NaOCl al 0.5 %. Se colocó esta muestra escogida y desinfectada sobre papel Kraft y se sometió al secado en la estufa a 37 °C durante 05 días. Se pesó 500 gr de planta seca y se procedió a triturar en un molino manual hasta obtener una muestra pulverizada que pasó por un proceso de tamizaje para estandarizar la medida de las partículas. Esto dio como resultado 200 gr de muestra pulverizada y estandarizada que fue utilizada para su posterior maceración.

4.3.3. Obtención del extracto etanólico de *E. giganteum* L.

Se vertió 200 gr de *E. giganteum* L. en polvo, en dos frascos de vidrio BOECO (100 gr en cada frasco), y se añadió 700 ml de etanol de 70° en cada frasco, con la finalidad de macerar la muestra con una consistencia que le permita extraer de manera adecuada los principios activos de la planta. Se colocaron los frascos de vidrio en la sombra a temperatura ambiente, y se maceró durante 05 días realizando 02 agitaciones al día, de 10 minutos, en cada frasco. Se separó la fase líquida de la fase sólida del macerado resultante, la fase líquida pasó por un filtrado en papel Whatman N° 04 con ayuda de una bomba de succión; se obtuvo 735 ml de solución filtrada que fue depositada sobre una bandeja de vidrio Pyrex y llevada a la estufa a 35 °C durante 03 días hasta obtener un extracto etanólico seco que pesó 7.6 gr. Luego se procedió a reconstituir este extracto etanólico seco con 76 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), importante disolvente orgánico, con ayuda de un agitador magnético, obteniendo así una solución madre de extracto etanólico al 100 %.

Posteriormente se prepararon las 05 concentraciones de extracto en frascos color ámbar previamente rotulados, de la siguiente manera:

- 10 ml de extracto etanólico puro = Concentración al 100 %
- 05 ml de extracto etanólico + 05 ml de DMSO = Concentración al 50 %

-2.5 ml de extracto etanólico + 7.5 ml de DMSO = Concentración al 25 %

-1.25 ml de extracto etanólico + 8.75 ml de DMSO = Concentración al 12.5 %

-0.625 ml de extracto etanólico + 9.375 ml de DMSO = Concentración al 6.25 %

4.3.4. Obtención de las cepas ATCC de *F. nucleatum*

Se obtuvieron cepas estándar ATCC 25586 de *F. nucleatum*, previamente identificadas por laboratorios MICROBIOLOGICS, las cuales se importaron a través de la casa comercial GENLAB S.A.C., posteriormente se transportaron al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, almacenándolas a una temperatura de 06 °C hasta su uso.

4.3.5. Preparación de los medios de cultivo

En el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la UNMSM, se realizó la preparación de los medios de cultivo y la siembra de los microorganismos.

Se utilizó agar Schaedler enriquecido con sangre, como medio de cultivo para el crecimiento de ambas bacterias. El agar Schaedler se preparó a partir de 42 gr de polvo homogenizado, siguiendo las indicaciones del fabricante, se procedió a mezclar con 01 L de agua destilada estéril. Se mezcló bien y disolvió por calentamiento agitando con frecuencia, se hirvió durante un minuto hasta lograr su completa disolución. Se le añadió 05 ml de sangre extraída de donantes voluntarios y se homogenizó la mezcla con cuidado. Finalmente se distribuyeron 20 ml de esta mezcla en cada placa Petri, se emplearon 20 placas Petri de 09 cm de diámetro y se conservaron hasta su siguiente uso.

4.3.6. Prueba de actividad antibacteriana frente a *F. nucleatum*

La cepa de *F. nucleatum* ATCC 25586 se retiró del vial liofilizado y fue sembrado asépticamente (con la ayuda de un mechero Bunsen que brindó un halo de esterilización

para evitar la contaminación de la placa Petri), con un asa de siembra estéril en una placa de agar Schaedler enriquecida con 5 % de sangre, se colocó dentro de una jarra de anaerobiosis y se llevó a la incubadora durante 05 días a 37 °C para su reactivación.

Una vez reactivada la cepa, se tomaron las colonias con un asa de siembra estéril y se colocaron dentro de un tubo de ensayo con caldo BHI, se homogeneizó la muestra mediante una escala de turbidez de 01 de Mc Farland, que equivalió a 01×10^8 UFC/ml, esto con el objetivo de obtener la concentración adecuada de bacterias para su crecimiento.

Se realizó el método de difusión en agar que consistió en sembrar 100 uL de la suspensión del caldo BHI y diseminarlo mediante un hisopo sobre el agar Schaedler. Seguidamente se procedió a depositar sobre los discos de papel filtro, estériles, 10 uL de concentración de extracto al 6.25 %, 12.5 %, 25 %, 50 % y 100 % y sobre 01 disco de papel filtro se depositó 10 uL de gluconato de clorhexidina al 0.12 % y sobre otro disco de papel filtro se depositó 10 uL de suero fisiológico. En total estos 07 discos se colocaron sobre la superficie sembrada del agar Schaedler a una distancia no menor de 15 mm y a 1.5 cm del borde de la placa. Este procedimiento se realizó de manera repetida en 10 placas Petri idénticas sembradas con *F. nucleatum*.

Estas placas Petri debidamente sembradas y con los discos, se transportaron inmediatamente a la jarra de anaerobiosis con el reactivo de anaerobiosis y se incubaron a 37 °C durante 07 días.

4.4. Recolección de datos

Se realizaron las mediciones de los halos con un vernier digital sobre la superficie de la placa Petri.

Para recolectar los datos se utilizó un instrumento de recolección de datos (véase Anexo 04), que fue llenado por el investigador.

4.5. Análisis de resultados

Al obtener resultados negativos el análisis no utilizó pruebas estadísticas, se basó en describir detalladamente mediante el instrumento de recolección de datos los resultados de la investigación.

IV. RESULTADOS

Se evaluaron 10 placas Petri sembradas mediante el método de difusión en agar y se procedió a la lectura de cada placa con un vernier digital para posteriormente introducir las medidas de los halos de inhibición en la tabla de recolección de datos.

Tabla N° 03. Consolidación de resultados de los halos de inhibición de las 10 placas Petri

	Halos de inhibición										PROMEDIO \bar{X}
	Placa Petri N° 01	Placa Petri N° 02	Placa Petri N° 03	Placa Petri N° 04	Placa Petri N° 05	Placa Petri N° 06	Placa Petri N° 07	Placa Petri N° 08	Placa Petri N° 09	Placa Petri N° 10	
Extracto etanólico al 100 %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Extracto etanólico al 50 %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Extracto etanólico al 25 %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Extracto etanólico al 12.5 %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Extracto etanólico al 6.25 %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Control positivo	16.79 mm	17.62 mm	17.74 mm	17.39 mm	16.83 mm	16.91 mm	16.72 mm	16.67 mm	16.85 mm	17.25 mm	17.077 mm
Control negativo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

1. No se evidenciaron halos de inhibición significativos para ser medidos en ninguna de las concentraciones del extracto etanólico en estudio, en ninguna de las placas.
2. Los controles positivos de gluconato de clorhexidina al 0.12 % sí evidenciaron halos de inhibición de 16.79, 17.62, 17.74, 17.39, 16.83, 16.91, 16.72, 16.67, 16.85 y 17.25 mm, respectivamente, posicionándose estas medidas dentro del rango de sensibilidad media en la escala de Duraffourd.
3. Los controles negativos de suero fisiológico no generaron halos de inhibición en ninguna de las placas en estudio.
4. Todos los resultados aceptaron la hipótesis nula.

V. DISCUSIÓN

El empleo de la fitoterapia en la búsqueda de terapias alternativas para contrarrestar la enfermedad periodontal trae consigo un gran reto desde el inicio, para los investigadores de esta área, ya que es primordial hacer una correcta identificación taxonómica de las especies de plantas a estudiar; para lograr esto, es necesario hacer una amplia revisión bibliográfica y contrastarlo con un adecuado trabajo de campo bajo la asesoría de un botánico especialista, para certificar que se esté trabajando con la especie de planta que se requiere y no existan errores en la investigación. Además del lugar de recolección de *E. giganteum* L. que crece en diferentes climas y tipos de suelo y podrían afectar su composición^{8,20,80}.

Durante la revisión bibliográfica, previa a la ejecución de este proyecto, se encontraron estudios realizados en Perú, que utilizaron el término de *Equisetum arvense* para referirse a una especie de “cola de caballo” en autores como Choque (2020)²⁰ y Cáceres (2018)⁸, sin embargo, durante la etapa de recolección de la planta, se evidenció que existe una confusión en la identificación taxonómica de esta, siendo *E. giganteum* L., la especie más abundante que crece en territorio peruano, situación que no sucede con *E. arvense* que crece en otros países con otros tipos de clima; este aspecto metodológico posiblemente contribuyó en la obtención de los resultados contradictorios del presente estudio frente a las investigaciones mencionadas, ya que al tratarse del mismo género pero diferente especie de planta varían aspectos cuantitativos en la composición química y obtención de metabolitos secundarios de dicha planta medicinal^{8,20}. Pese a esto, la gran cantidad de investigaciones que se encuentran en revistas internacionales pertenecen a *E. arvense*, por lo cual se tomaron como base de referencia para la elaboración de esta investigación.

A partir de los resultados encontrados, aceptamos la hipótesis nula, la cual establece que no existe efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *E. giganteum* L. frente a cepas ATCC de *F. nucleatum*.

Si bien es cierto, hasta el momento no existe literatura publicada sobre el efecto antibacteriano de la “cola de caballo” frente a esta cepa, sí se han publicado algunos estudios de su efectividad frente a otras bacterias periodontopatógenas como *P. gingivalis*, lo cual en un inicio nos llevó a deducir que podría existir tal efecto frente a *F. nucleatum*.

Los resultados obtenidos en este estudio contradicen a Chuquipiondo (2021)¹⁹ quien investigó el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *E. giganteum* L. frente a cepas ATCC de *P. gingivalis*, concluyendo que la mencionada planta medicinal presentaba efectividad antibacteriana ubicándose como muy sensible según la escala de Duraffourd, siendo incluso mayor al gluconato de clorhexidina al 0.12 %. Al analizar su metodología se encontró que utilizaron un lugar diferente (Chaclacayo-Lima) para la cosecha de la “cola de caballo”, en comparación con el lugar de cosecha de la presente investigación (Huaquirca-Apurímac). Sin embargo, en la elaboración del extracto se siguió una metodología muy similar a la del presente estudio. En la experimentación con las bacterias se utilizó el mismo método de difusión en agar utilizando bacterias ATCC y realizando 12 repeticiones por concentración, similar a las 10 repeticiones por concentración que se realizaron en esta investigación.

De igual manera el presente estudio contradice a Choque (2020)²⁰, que concluyó que las cepas ATCC de *P. gingivalis* presentan sensibilidad antibacteriana ante el extracto etanólico de *E. arvense* “cola de caballo”, esta planta fue obtenida en Ilabaya-Tacna difiriendo de nuestra metodología de obtención realizada en Apurímac. Además en el proceso de elaboración si bien es cierto se siguió una metodología muy similar en el procesamiento de la planta, al realizar las disoluciones para las concentraciones del

extracto se utilizó etanol de 70°, a diferencia del DMSO utilizado como disolvente como parte de nuestra metodología. Es importante la utilización del DMSO como disolvente orgánico para la disolución de este tipo de extractos medicinales, ya que garantiza que todos los metabolitos secundarios sean homogenizados en la solución. En cuanto a la metodología de siembra de las bacterias, se utilizaron cepas ATCC y el método de difusión en agar con concentraciones de 100, 75, 50 y 25 % muy similares a la del presente estudio, sin embargo Choque (2020)²⁰ hizo una mejora de su metodología al comparar la inoculación de extracto en los discos en diluciones de 15, 20, 25 y 30 uL en 20 repeticiones por concentración, a diferencia de nuestro estudio en donde solo se utilizó una dilución de 10 uL en 10 repeticiones por concentración de extracto. Otra diferencia metodológica en contraste a la investigación de Choque (2020)²⁰ fue la utilización del agar Trypticase Soya como medio cultivo de anaerobios estrictos ya que el agar Schaedler enriquecido con 5 % de sangre de cordero es el medio de cultivo ideal para bacterias anaerobias estrictas tales como *P. gingivalis* y *F. nucleatum*. Otro punto importante a mencionar es la elección del control positivo, ya que Choque (2020)²⁰, utilizó el gluconato de clorhexidina en la presentación de la marca Perio·Aid®, sin embargo en nuestra metodología lo utilizamos en la marca Periogard®, esto con fines de pureza de producto ya que la primera marca mencionada además de tener el principio activo contiene aditivos como el CPC (cloruro de cetilpiridinio) lo cual podría causar sesgos en la investigación al no tratarse del antiséptico puro, a diferencia de Periogard® que solo contiene en su composición básicamente al gluconato de clorhexidina al 0.12 %.

Las bacterias periodontopatógenas que conforman el complejo rojo y naranja de Socransky y Haffajee⁷¹, tienen la característica de ser bastante exigentes para su crecimiento, por lo cual requieren un medio de cultivo enriquecido y un ambiente de anaerobiosis estricta, esto último genera algunas limitaciones durante la ejecución de los estudios experimentales ya que su delicado manejo origina que en muchas

ocasiones las cepas no presenten el crecimiento que se requiere y se necesitan varios intentos hasta obtener resultados óptimos, esto genera que publicar este tipo de estudios involucre una mayor cantidad de inversión de tiempo y esfuerzo por parte del investigador. Hasta el momento no se ha reportado en la literatura específicamente sobre el efecto antibacteriano de *E. giganteum* L. frente a cepas de *F. nucleatum*, limitando la comparación de antecedentes que utilizan otras bacterias periodontopatógenas, pero si tenemos en cuenta la naturaleza de ambas bacterias que si bien son complementarias y pertenecen a la microbiota periodontopatógena, son microorganismos con distintos factores de virulencia que podría hacer a uno más resistente que a otro.

Por otro lado, los resultados obtenidos en esta investigación guardan relación con García (2013)²⁴ y Pensantes-Sangaray y cols. (2020)⁸¹ quienes al evaluar el efecto antibacteriano de determinadas plantas medicinales frente a bacterias como *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, obtuvieron como resultado que *F. nucleatum* tiene un mayor grado de resistencia antibacteriana en comparación a bacterias periodontopatógenas como *P. gingivalis*. Autores como Ramos y cols. (2020)⁷³ apoyan los resultados de la presente investigación ya que en su estudio de revisión bibliográfica refiere que *F. nucleatum* ha presentado en algunas investigaciones una alta resistencia, incluso a medicamentos como amoxicilina y metronidazol, que, a pesar de no formar parte del complejo rojo, esta bacteria se posiciona como una de las más versátiles y resistentes de la microbiota periodontopatógena.

VI. CONCLUSIONES

1. No existe efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *E. giganteum* L. sobre cepas ATCC de *F. nucleatum*.
2. No existe efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *E. giganteum* sobre cepas de *F. nucleatum* en las siguientes concentraciones: 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 %.

VII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda experimentar el efecto antibacteriano de *E. giganteum* con otros tipos de formulaciones más concentradas como aceites esenciales y oleorresinas.
2. Realizar estudios posteriores con una mayor cantidad de muestra.
3. Se recomienda estudiar la misma especie recolectada en distintos departamentos, como sugiere Acosta de la Luz (2003)⁸⁰, en su estudio donde menciona que las condiciones climatológicas como la luz y temperatura, además de la calidad de suelo, juegan un papel importante en la producción de metabolitos secundarios de las plantas medicinales.
4. Se recomienda realizar estudios que formulen los extractos en diferentes estaciones del año para evaluar y comparar si existe alguna variación en su efectividad antibacteriana.
5. Realizar estudios experimentando con otras especies de “cola de caballo”.
6. Se recomienda realizar estudios frente a otras especies periodontopatógenas.
7. Se recomienda no desistir en publicar investigaciones que presenten resultados contrarios a la hipótesis de trabajo ya que se consideran igual de útiles que las investigaciones con resultados positivos, porque pueden redireccionar la metodología de los futuros investigadores del área, además de economizar tiempo y dinero⁸².

VIII. BIBLIOGRAFÍA

01. World Health Organization. Programme on Traditional Medicine. Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide review [Internet]. Ginebra: WHO; 1998. [cited 2020 Jul 23]. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/63801>
02. Mandal SC, Mandal V, Das AK. History and Background on the Use of Natural Products Obtained from Plants as Therapeutic Agents. En: Mandal SC. Essentials of Botanical Extraction. Massachusetts, Estados Unidos: Academic Press Book [Internet]. 2015 [cited 2020 Jul 23]; 7-17. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128023259000021?via%3Dihub>
03. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. J Nat Prod [Internet]. 2012 [cited 2020 Jul 24]; 75(3):311-35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22316239/>
04. Martínez Y, Gómez LL. Impacto social de una estrategia de intervención sobre prescripción racional de medicina verde en Céspedes durante 2011. Rev Cuba Plantas Med. [Internet]. 2013 [citado 24 de julio de 2020]; 18(4):609-18. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962013000400012
05. Maldonado C, Paniagua-Zambrana N, Bussmann RW, Zenteno-Ruiz FS, Fuentes AF. La importancia de las plantas medicinales, su taxonomía y la búsqueda de la cura a la enfermedad que causa el coronavirus (COVID-19). Ecol En Bolív. [Internet]. 2020 [citado 30 de julio de 2020]; 55(1):1-5. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S160525282020000100001
06. León B. La cola de caballo (Equisetum, Equisetaceae) comercializada y exportada del Perú. Rev. peru. biol. [Internet]. 2013 [citado 30 de julio de 2020]; 19(3):345-346. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v19n3/a18v19n3.pdf>

07. Paniagua-Zambrana NY, Bussman RW, Romero C. Ethnobotany of the Andes. New York: Springer; 2020. Available from: <https://link.springer.com/referencework/10.1007/978-3-030-28933-1>
08. Caceres K. Efecto antibacteriano in vitro del extracto de Equisetum arvense (cola de caballo) sobre el Streptococcus mutans, Puno – 2018 [Tesis]. Puno: Universidad Nacional del Altiplano, 2018. [citado 7 de agosto de 2020]; Disponible en: <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/9628>
09. De Oliveira F, Alavarce RA, Bosqueiro AL, Lara V. Antimicrobial Activity of Equisetum Giganteum Extract Against Clinical Strains of Candida Albicans, Escherichia Coli, And Standard Strain of Staphylococcus Aureus. J Prosthet Dent [Internet]. 2014 [cited 2020 Aug 08]; 117(2): 198. Available from: [https://www.oooojournal.net/article/S2212-4403\(13\)01942-1/fulltext](https://www.oooojournal.net/article/S2212-4403(13)01942-1/fulltext)
10. Spedo CR. Efeito da modificação da superfície de materiais resilientes temporários para base de prótese por Equisetum giganteum na inibição do biofilme de Candida albicans [Tesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2017. [citado 9 de agosto de 2020]; Disponible en: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/25/25146/tde-29112021-102819/en.php>
11. Mota IB de O, Cunha LS, Braga LLA, Lima CC, Dietrich L. FITOTERAPIA NA ODONTOLOGIA: LEVANTAMENTO DOS PRINCIPAIS PRODUTOS FITOTERÁPICOS USADOS PARA A SAÚDE BUCAL. Psicodebate [Internet]. 2018 [cited 2020 Aug 12]; 4(1):71-75. Available from: <http://psicodebate.dpgpsifpm.com.br/index.php/periodico/article/view/417>
12. Preshaw PM. Detection and diagnosis of periodontal conditions amenable to prevention. BMC Oral Health [Internet]. 2015 [cited 2020 Aug 15]; 15(1):1-15. Available from:

<https://www.researchgate.net/publication/282127512> Detection and diagnosis of periodontal conditions amenable to prevention

13. Flemmig TF. Periodontitis. *Ann Periodontol* [Internet]. 1999 [cited 2020 Aug 20]; 4(1):32-8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10863373/>

14. Burt B; Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. Position paper: epidemiology of periodontal diseases. *J Periodontol* [Internet]. 2005 [cited 2020 Aug 22]; 76(8):1406-19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16101377/>

15. Dye BA. Global periodontal disease epidemiology. *Periodontol 2000* [Internet]. 2012 [cited 2020 Aug 25]; 58(1):10-25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22133364/>

16. Roberts MC. Antibiotic toxicity, interactions and resistance development. *Periodontol 2000* [Internet]. 2002 [cited 2020 Aug 27]; 28:280-97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12013346/>

17. Guillon JM. Molecular phylogeny of horsetails (*Equisetum*) including chloroplast *atpB* sequences. *J. Plant Stud* [Internet]. 2007 [cited 2020 Aug 28]; 120(1):569-574. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10265-007-0088-x>

18. Francescato LN, Debenedetti SL, Schwanz TG, Bassani VL, Henriques AT. Identification of phenolic compounds in *Equisetum giganteum* by LC–ESI-MS/MS and a new approach to total flavonoid quantification. *Talanta* [Internet]. 2013 [cited 2020 Aug 29]; 105(15):192-203. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.11.072>

19. Chuquipiondo PF. Estudio in Vitro del efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Equisetum Giganteum* L Cola de Caballo frente a cepas de *Porphyromona Gingivalis*

[Tesis]. Lima: Universidad Alas Peruanas, 2021. [citado 30 de agosto de 2020]; Disponible en: <https://repositorio.uap.edu.pe/handle/20.500.12990/9411>

20. Choque RB. "EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE Equisetum arvense (COLA DE CABALLO) SOBRE LA Porphyromona gingivalis ATCC 33277 - ESTUDIO IN VITRO. TACNA 2020" [Tesis]. Tacna: Universidad Privada de Tacna, 2020. [citado 30 de agosto de 2020] Disponible en: <https://repositorio.upt.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12969/1614/Choque-Quispe-Erika.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

21. Silva RA, Bernardo LP, Moreno JML, Lara VS, Porto VC. Equisetum giganteum influences the ability of Candida albicans in forming biofilms over the denture acrylic resin surface. Pharm. Biol. [Internet]. 2017 [cited 2020 Aug 30]; 55(1):1698-1702. Available from: <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1321024>

22. Pardo C, Monsalve G, Erika A, Espinosa Y, Jaramillo G. Efecto antimicrobiano del aceite esencial de Citrus reticulata sobre Fusobacterium nucleatum asociada a enfermedad periodontal. Rev. Colomb. Biotecnol. [Internet]. 2017 [cited 2020 Aug 30]; 19(2):7-14. Available from: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/57921>

23. Pachamango V. "EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO DE Plantago major (LLANTÉN) Y DEL PerioAid® 0.12% SOBRE Fusobacterium nucleatum ATCC 25586". [Tesis]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo, 2016. [citado 30 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/7527>

24. García R. Efecto antimicrobiano de la Óleo-resina de Copaifera officinalis sobre principales cepas bacterianas periodontopatógenas de la cavidad bucal [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2013. [citado 20 de septiembre de 2020]. Disponible en: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/3460>

25. Collahuacho V. Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo peruano sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2010. [citado 26 de septiembre de 2020]. Disponible en: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/3273>
26. Ramos D. Actividad antibacteriana de *Copaifera reticulata* sobre *Porphyromonas gingivalis* aislado de pacientes con periodontitis [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2014. [citado 30 de septiembre de 2020]. Disponible en: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/9766>
27. Ramos D. Efectividad clínica y antibacteriana de la oleorresina de *Copaifera reticulata* “copaiba” en el tratamiento de la periodontitis en pacientes diabéticos tipo II [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2019. [citado 10 de octubre de 2020]. Disponible en: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/10320>
28. WHO. Oral health [Internet]. Ginebra: WHO; 2020. [cited 2020 Oct 15]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>
29. Cabral-Romero C, Hernández-Delgadillo R. Efectos citotóxicos del gluconato de clorhexidina en células epiteliales. *Rev Mex Estomatol* [Internet]. 2016 [citado 20 de octubre de 2020];3(1):20-8. Disponible en: <https://www.remexesto.com/index.php/remexesto/article/view/55/87>
30. Henry A. Recommended Medicinal Plants as Source of Natural Products: A Review. *Digital Chinese Medicine*. 2018 [cited 2020 Oct 20]; 1(2):131-142. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2589377719300187>
31. Lara A, Trevisani AC, Santos ICD, Barbosa LN, Matta RD, Gonçalves DD. Medicinal plants Antimicrobial Activity against *Staphylococcus* spp. – Literature Review *Braz. J. of*

Develop [Internet]. 2019 [cited 2020 Oct 29]; 5(10):18612-18631. Available from: <https://brazilianjournals.com/ojs/index.php/BRJD/article/viewFile/3714/4459>

32. Bussmann RW, Sharon D. Plantas medicinales de los Andes y la Amazonía - La flora mágica y medicinal del Norte del Perú. *Ethnobot. Res. Appl.* [Internet]. 2018 [citado 02 de noviembre de 2020]; 15(1):1-293. Disponible en: <https://ethnobotanyjournal.org/index.php/era/article/view/1281>

33. Echegaray JR, Echegaray P, Mosquera A, Gerrikaetxebarria J. Fitoterapia y sus aplicaciones. *Rev. esp. podol.* [Internet]. 2011 [citado 10 de noviembre de 2020]; 12(6):258-267. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-espanola-podologia-224-pdf-X0210123811501573>

34. Avello M, Cisternas I. Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Rev Med Chile* [Internet]. 2010 [citado 10 de noviembre de 2020]; 138:1288-1293. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rmc/v138n10/art%2014.pdf>

35. Francisco KSF. FITOTERAPIA: UMA OPÇÃO PARA O TRATAMENTO ODONTOLÓGICO. *Rev. Saúde* [Internet]. 2020 [cited 2020 Nov 17]; 4(1):18-24. Available from: <http://revistas.ung.br/index.php/saude/article/view/432/631>

36. Reis L, Farias A, Bollella A, Silva H, Canuto M, Zambelli J, et al. Conhecimentos, atitudes e práticas de Cirurgiões-Dentistas de Anápolis-GO sobre a fitoterapia em odontologia. *Rev. odontol. UNESP* [Internet]. 2014 [cited 2020 Nov 23]; 43(5):319-325. Available from: <https://www.scielo.br/j/rounesp/a/xgYWFtMKtQhFLgXtJg3JRhM/?format=html&lang=pt>

37. Santana, RC. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y DOSIS DE APLICACIÓN DE COLA DE CABALLO (*Equisetum arvense*) PARA EL CONTROL ECOLÓGICO DE ROYA (*Puccinia* sp.) EN EL CULTIVO DE CEBOLLA BLANCA (*Allium fistulosum*) [Tesis]. Ambato: Universidad Técnica de Ambato, 2014. [citado 30 de

noviembre de 2020]. Disponible en:

<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/7557/1/tesis019%20Maestr%C3%ADa%20en%20Agroecolog%C3%ADa%20y%20Ambiente%20-%20CD%20240.pdf>

38. Valderrama M. Prospección de uso del género Equisetum como producto biodegradable alternativo al uso de tubos plásticos de beber por succión (pitillos) [Tesis]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana, 2018. [citado 03 de diciembre de 2020].

Disponible en:

<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/40122/Tesis.pdf?sequence=22&isAllowed=y>

39. Feitosa IS, Reinaldo RCPS, Santiago ACP, Albuquerque UP. Equisetum giganteum L. Medicinal and Aromatic Plants of South America. [Internet]. New York: Springer, 2018.

Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-024-1552-0_19

40. Rico R, Agudelo I, Garcés M, Evelson P, Wagner M, Gurni A. Polifenoles y actividad antioxidante en Equisetum giganteum L. (Equisetaceae). B LATINOAM CARIBE PL. [Internet]. 2011 [cited 2020 Dec 05]; 10(4):325-332. Available from:

<https://www.redalyc.org/pdf/856/85619300005.pdf>

41. Vieira GT, Oliveira TT, Carneiro MAA, et al. Antidiabetic effect of Equisetum giganteum L. extract on alloxan-diabetic rabbit. J. Ethnopharmacol. [Internet]. 2020 [cited

2020 Dec 07]; 260(5):112898. Available from: <https://www-sciencedirect-com.unmsm.lookproxy.com/science/article/pii/S037887411934855X>

42. Churqui MP, Lind L, Thorn K, Svensson A, et al. Extracts of Equisetum giganteum L and Copaifera reticulata Ducke show strong antiviral activity against the sexually transmitted pathogen herpes simplex virus type 2. J. Ethnopharmacol. [Internet]. 2018

[cited 2020 Dec 10]; 210(10):192-197. Available from: <https://www-sciencedirect-com.unmsm.lookproxy.com/science/article/pii/S0378874117312394>

43. Escárcega A, Del Noval B, Prado D. Equisetum arvense L. / Cola de caballo. Santiago: BCulinaryLAB, 2017. Disponible en: <http://www.bculinarylab.com/2017/05/30/equisetum-arvense-l-cola-de-caballo/>
44. Ferriol M, López C. Los equisetos: caracteres vegetativos. [Internet]. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia; 2018 [citado 17 de enero de 2021]. Disponible en: <https://m.riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/100903/Ferriol%3BL%C3%B3pez%20-%20Los%20equisetos.%20Caracteres%20vegetativos..pdf?sequence=1&isAllowed=y>
45. Hernández M. Tizón apical en cola de caballo (Equisetum arvense L.) en la Comarca Lagunera de Coahuila. [Tesis]. Coahuila: Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, 2011. [citado 20 de enero de 2021]. Disponible en: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/2513/Tiz%C3%B3n%20apical%20en%20cola%20de%20caballo%20%28Equisetum%20arvense%20L.%29%20en%20la%20Comarca.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
46. Boeing T, Tafarelo KG, Gasparotto JA, Mota da Silva L, de Souza P. Phytochemistry and Pharmacology of the Genus Equisetum (Equisetaceae): A Narrative Review of the Species with Therapeutic Potential for Kidney Diseases. Evid Based Complement Alternat Med. [Internet]. 2021 [cited 2021 Jan 20]; (1):1-17. Available from: https://www.researchgate.net/publication/349844272_Phytochemistry_and_Pharmacology_of_the_Genus_Equisetum_Equisetaceae_A_Narrative_Review_of_the_Species_with_Therapeutic_Potential_for_Kidney_Diseases
47. Berdonces J. La cola de caballo en fitoterapia. Natura Medicatrix [Internet]. 1985 [citado 26 de enero de 2021]; 10:25-28. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/6991857.pdf>
48. Botirov E, Bonacheva V, Kolomiets N. CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF METABOLITES OF THE GENUS EQUISETUM. Chem.

Plant Raw Mater. [Internet]. 2021 [cited 2021 Jan 30]; (1):5-26. Available from: <http://journal.asu.ru/cw/article/view/7760>

49. Campos, E. Uso terapéutico de la cola de caballo (*Equisetum arvense*) en pobladores de la ampliacion Victor Raúl Haya de la Torre. La Victoria-Chiclayo, setiembre 2014-agosto 2015 [Tesis]. Chimbote: Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, 2016. [citado 06 de febrero de 2021]. Disponible en: <http://repositorio.uladech.edu.pe/handle/123456789/1525>

50. Steinborn C, Potterat O, Meyer U, Trittler R, Stadlbauer S, Huber R, Gründemann C. In Vitro Anti-inflammatory Effects of *Equisetum arvense* Are Not Solely Mediated by Silica. *Planta Med* [Internet]. 2021 [cited 2021 Feb 11]; 84(8):519-526. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29202511/>

51. Shiba F, Miyauchi M, Chea C, Furusho H, Iwasaki S, Shimizu R, Ohta K, Nishihara T, Takata T. Anti-inflammatory effect of glycyrrhizin with *Equisetum arvense* extract. *Odontology* [Internet]. 2021 [cited 2021 Feb 15]; 109(2):464-473. Available from: <https://www.semanticscholar.org/paper/Anti-inflammatory-effect-of-glycyrrhizin-with-Shiba-Miyauchi/71fb79932c95daa1e58fb9139a3d7997e6531070>

52. Carrillo de Albornoz A, García A, Bascones A. Papel de la IL-6 y TNF-alfa en la enfermedad periodontal. *Av. periodoncia implantol. oral.* [Internet]. 2006 [citado 20 de febrero de 2021]; 18(2): 83-89. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/28140971_Papel_de_la_IL-6_y_TNF-a_en_la_enfermedad_periodontal

53. Das G, Kumar J, Shi H. Biosynthesis, and potential effect of fern mediated biocompatible silver nanoparticles by cytotoxicity, antidiabetic, antioxidant and antibacterial, studies. *Mater. Sci. Eng.* [Internet]. 2020 [cited 2021 Feb 28]; 114(111011):1-8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0928493119323203>

54. Bhat AA, Ahamad B, Rehman M, Ahmad P. Impact of ethanolic extract of Equisetum arvense (EA1) on pancreatic carcinoma AsPC-1 cells. Saudi Journal of Biological Sciences [Internet]. 2020 [cited 2021 Mar 15]; 27(5):1260-1264. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32346333/>
55. Uslu M, Mele A, Bayraktar O. Evaluation of the hemostatic activity of Equisetum arvense extract: the role of varying phenolic composition and antioxidant activity due to different extraction conditions. Biointerface Res. Appl. Chem. [Internet]. 2019 [cited 2021 Mar 23]; 9(4):4157-4164. Available from: https://www.researchgate.net/publication/350820148_Evaluation_of_the_hemostatic_activity_of_Equisetum_arvense_extract_the_role_of_varying_phenolic_composition_and_antioxidant_activity_due_to_different_extraction_conditions
56. Proaño J. COMPROBACIÓN DEL EFECTO CICATRIZANTE DE UNA CREMA A BASE DE ROMERO (Rosmarinus officinalis), MATICO (Piper aduncum) Y COLA DE CABALLO (Equisetum arvense) EN HERIDAS INDUCIDAS EN RATONES (Mus musculus) [Tesis]. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2013. [citado 26 de abril de 2021]. Disponible en: <https://1library.co/document/q7worxvz-comprobacion-cicatrizante-rosmarinus-officinales-caballo-equisetum-heridas-inducidas.html>
57. Grados Pomarino S, Castro Rodriguez Y, Bravo Castagnola F. Consideraciones clínicas en el tratamiento quirúrgico periodontal. Caracas: Amolca; 2014.
58. García C, García R, San Juan M. Clasificación de las condiciones y enfermedades periodontales y periimplantares desde una perspectiva evolutiva. MediSur [Internet]. 2021 [citado 01 de mayo de 2021]; 19(4):642-655. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-897X2021000400642

59. Corona J, Pérez E, Sánchez V. Identificación molecular de bacterias en salud y enfermedad periodontal. Rev. Odont. Mex. [Internet]. 2019 [citado 12 de mayo de 2021]; 23(1):23-30. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=87195>
60. Pardo F, Hernández L. Enfermedad periodontal: enfoques epidemiológicos para su análisis como problema de salud pública. Rev. Salud Pública [Internet]. 2018 [citado 22 de mayo de 2021]; 20(2):258-264. Disponible en: <https://www.scielosp.org/article/rsap/2018.v20n2/258-264>
61. Horna P. Prevalencia de la enfermedad periodontal y factores asociados en adultos jóvenes entre 18 - 24 años en Lima 2016 [Tesis]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2021. [citado 22 de mayo de 2021]. Disponible en: <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/9015>
62. Morales A, Bravo J, Baeza M, Werlinger F, Gamonal J. Las enfermedades periodontales como enfermedades crónicas no transmisibles: Cambios en los paradigmas. Rev Clín Periodoncia Implantol Rehabil Oral [Internet]. 2016 [citado 30 de mayo de 2021]; 9(2):203-207. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0719-01072016000200019
63. Herrera D, Figuero E, Shapira L, Jin L, Sanz M. La nueva clasificación de las enfermedades periodontales y periimplantarias. Revista científica de la Sociedad Española de Periodoncia [Internet]. 2018 [citado 07 de junio de 2021] ; 4(11):94-110. Disponible en: https://www.sepa.es/web_update/wp-content/uploads/2018/10/p11ok.pdf
64. Chapple I. Salud periodontal y gingivitis. Revista científica de la Sociedad Española de Periodoncia [Internet]. 2019 [citado 17 de junio de 2021]; 5(15):10-16. Disponible en: https://www.sepa.es/web_update/wpcontent/uploads/2019/08/01_PeriodontalHealth_Gingivitis_Castellano.pdf

65. Sanz M, Tonetti M. Periodontitis. Revista científica de la Sociedad Española de Periodoncia [Internet]. 2019 [citado 25 de junio de 2021]; 5(15):18-24. Disponible en: https://www.sepa.es/web_update/wp-content/uploads/2020/01/Revista-Periodoncia-Cl%C3%ADnica-N%C3%BA-15-FINAL.pdf
66. Papapanou P, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine D, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. J. Periodontol. [Internet]. 2018 [cited 2021 Jul 07]; 45(20):162-170. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29926951/>
67. Milovanova-Palmer J, Pendry B. Is there a role for herbal medicine in the treatment and management of periodontal disease?. J Herb Med. [Internet]. 2018 [cited 2021 Jul 20]; 12:33-48. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2210803318300149>
68. Isola G. Current Evidence of Natural Agents in Oral and Periodontal Health. Nutrients [Internet]. 2020 [cited 2021 Jul 31]; 12(2):585. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32102287/>
69. Moro M, Silveira Souto M, Franco G, Holzhausen M, Pannuti C. Efficacy of local phytotherapy in the nonsurgical treatment of periodontal disease: A systematic review. J Periodontal Res. [Internet]. 2018 [cited 2021 Aug 05]; 53(3):288-297. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29352465/>
70. de Sousa E, de Araújo J, Pires A, Lira dos Santos E. Local delivery natural products to treat periodontitis: a systematic review and meta-analysis. Clin Oral Investig. [Internet]. 2021 [cited 2021 Aug 13]; 25(7):4599-4619. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33527193/>

71. Socransky S, Haffajee A. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000. [Internet]. 2002 [cited 2021 Aug 16]; 28:12–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12013340/>
72. Curtis M, Diaz P, Van Dyke T. The role of the microbiota in periodontal disease. *Periodontol* 2000 [Internet]. 2020 [cited 2021 Aug 19];83(1):14-25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32385883/>
73. Ramos-Perfecto D, Maita L, Piscoche-Botello C. *Fusobacterium nucleatum* un comensal puente con otros microorganismos patógenos de la periodontitis. *KIRU* [Internet]. 2020 [citado 13 de octubre 2021]; 17(4): 230-236. Disponible en: <https://www.aulavirtualusmp.pe/ojs/index.php/Rev-Kiru0/article/view/2022>
74. Narváez A. Estudio in vitro del efecto antimicrobiano del aceite esencial *Citrus reticulata* en cepas de *Fusobacterium nucleatum* asociados a enfermedad periodontal [Tesis]. Quito: Universidad Central de Ecuador; 2019. [citado 19 de octubre de 2021]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/18824>
75. García K. “EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Cinnamomum Zeylanicum* (CANELA) SOBRE EL *Fusobacterium Nucleatum* ATCC 25586.” [Tesis]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2016. [citado 25 de octubre de 2021]. Disponible en: <https://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/4239>
76. Han Y. *Fusobacterium nucleatum*: a commensal-turned pathogen. *Curr Opin Microbiol*. [Internet]. 2015 [cited 2021 Oct 29]; 23:141-7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25576662/>
77. Vinogradov E, San Miguel F, Homma K, Sharma A, Cox A. Structure of the LPS-O chain from *Fusobacterium nucleatum* strain 10953, containing sialic acid. *Carbohydr Res*. [Internet]. 2017 [cited 2021 Oct 31];440-441:38-42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28199859/>

78. Pocanschi C, Apell HJ, Puntervoll P, Høgh B, Jensen H, Welte F, et al. The Major Outer Membrane Protein of *Fusobacterium nucleatum* (FomA) Folds and Inserts into Lipid Bilayers via Parallel Folding Pathways. *J. Mol. Biol.* [Internet]. 2006 [cited 2021 Nov 06]; 35(3):548-561. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022283605013203>
79. Stokowa-Sołtys K, Wojtkowiak K, Jagiello K. *Fusobacterium nucleatum* – Friend or foe? *J. Inorg. Biochem.* [Internet]. 2021 [cited 2021 Nov 10]; 224(1):2-10. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0162013421002336?via%3Dihub>
80. Acosta de la Luz Lérica. Principios agroclimáticos básicos para la producción de plantas medicinales. *Rev Cubana Plant Med.* [Internet]; 2003(1):1-3. [citado 20 de noviembre de 2021]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102847962003000100008&lng=e
[S.](#)
81. Pensantes-Sangay SJ, Calla-Poma RD, Requena-Mendizabal MF, Alvino-Vales MI, MillonesGómez PA. Chemical composition and antibacterial effect of *Plantago Major* extract on periodontal pathogens. *Pesqui Bras Odontopediatria Clín Integr.* [Internet]. 2020 [cited 2021 Nov 10]; 20(12):1-10. Available from: <https://doi.org/10.1590/pboci.2020.100>
82. Bosio R, De Menezes G, Martins V, Schmidt A, De Menezes R. Resultados negativos en la investigación científica: aspectos éticos. *Rev. Bioét.* [Internet]. 2018 [citado 23 de Noviembre de 2021]; 26(2):245-250. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/bioet/a/vGsZKrFK5kVgdQjzxCw7mb/?lang=es>

IX. ANEXOS

Anexo 01

Constancia de Clasificación taxonómica de *E. giganteum* L.

  	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO MUSEO DE HISTORIA NATURAL</p>
<p><i>"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"</i></p>	
<p>CONSTANCIA N° 034-USM-MHN-2022</p>	
<p>LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:</p>	
<p>La muestra vegetal (muestra fértil), recibida de Elizabeth Mery HUACHACA ZEVALLOS, alumna de la Facultad de Odontología, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha sido estudiada y clasificada como: <i>Equisetum giganteum</i> L.; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Smith, A.R. et al. (2006):</p>	
<p>SUB DIVISION: POLYPODIOPHYTINA</p>	
<p>CLASE: POLYPODIOPSIDA</p>	
<p>ORDEN: EQUISETALES</p>	
<p>FAMILIA: EQUISETACEAE</p>	
<p>GENERO: Equisetum</p>	
<p>SUB GENERO: HIPPOCHAETE</p>	
<p>ESPECIE: <i>Equisetum giganteum</i> L.</p>	
<p>Nombre vulgar: "cola de caballo". Determinado por: Dra. Blanca León</p>	
<p>Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.</p>	
<p>Lima, 30 de mayo de 2022</p>	
<p> Dra. Joaquina Albán Castillo JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)</p>	
	
<p>JAC/ddb.</p>	

Anexo 02

Constancia de elaboración de extracto etanólico de *E. giganteum* L.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA
Central: 619 7000 anexos 1202, 1203, 1205, 1206, 1207 Telefax: 1209, 1218
Ciudad Universitaria – Av. Venezuela s/n – Lima 1

CONSTANCIA

DE PARTICIPACIÓN EN ELABORACIÓN DE EXTRACTO ETANÓLICO

A quien corresponda:

Quien suscribe deja constancia que la tesista **Huachaca Zevallos, Elizabeth Mery**, participó en la elaboración del extracto etanólico en sus diferentes concentraciones de la planta denominada "*Equisetum giganteum* L.", además, del respectivo análisis cualitativo (Marcha fitoquímica) de los principales metabolitos secundarios del mencionado extracto; para la implementación de su tesis titulada: "**Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Equisetum giganteum* L. (cola de caballo) frente a bacterias periodontopatógenas: *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum***", en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la UNMSM.

Se expide el presente documento a solicitud de la interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 17 de julio del 2022.



Firmado digitalmente por CASTRO
MANDUJANO Olivio Nino FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 17.07.2022 10:54:45 -05:00

Dr. Olivio Nino Castro Mandujano
Docente Asociado a D.E.
Director del Departamento Académico de Química Orgánica
934-761-759; ocastrom@unmsm.edu.pe

Anexo 03

Análisis cualitativo de los principales metabolitos secundarios del extracto etanólico de *E. giganteum* L.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA
Central: 619 7000 anexos 1202, 1203, 1205, 1206, 1207 Telefax: 1209, 1218
Ciudad Universitaria – Av. Venezuela s/n – Lima 1

ANÁLISIS CUALITATIVO (MARCHA FITOQUÍMICA) EXTRACTO ETANÓLICO *Equisetum giganteum* L. (cola de caballo)

Muestra: 200 gramos de *Equisetum giganteum* L. (cola de caballo), seca y molida.

Objetivo: análisis cualitativo (marcha fitoquímica) del extracto etanólico de *Equisetum giganteum* L. (cola de caballo)

Metodología: se aplicó la metodología de Olga Lock de Ugaz, (2016), "Investigación Fitoquímica", Editorial PUCP, Lima, Perú.

Resultados: ver tabla

N°	Metabolitos secundarios	Reactivos	Resultados
01	Alcaloides	R. Dragendorff	++
		R. Wagner	++
		R. Mayer	+
02	Taninos	R. Gelatina 1%	+
		R. FeCl ₃ 1%	+++
03	Flavonoides	R. Shinoda	+++
		Cambio de pH	++
04	Quinonas	R. Bornträger	++

Notación: +++: abundante, ++: regular; +: poco; -: no hay metabolitos.

Conclusión: el extracto etanólico de *E. giganteum* L. contiene en forma abundante de los siguientes metabolitos secundarios: alcaloides, taninos, flavonoides y quinonas

Lima, 17 de julio del 2022.



Firmado digitalmente por CASTRO
MANDUJANO Olivio Nino FAU
20146992282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 17.07.2022 11:40:40 -0500

Dr. Olivio Nino Castro Mandujano
Docente Asociado a D.E.
Director del Departamento Académico de Química Orgánica
934-761-759; ocastrom@unmsm.edu.pe
CQP No. 784

Anexo 04

Instrumento de recolección de datos

Tabla N° 04. Instrumento de recolección de datos de *F. nucleatum*.

Placa Petri sembrada con <i>F. nucleatum</i>	Efecto antibacteriano de <i>E. giganteum</i> L. frente a <i>F. nucleatum</i>						
	Halo de inhibición al 6.25 %	Halo de inhibición al 12.5 %	Halo de inhibición al 25 %	Halo de inhibición al 50 %	Halo de inhibición al 100 %	Halo de inhibición de control positivo (Gluconato de clorhexidina al 0.12 %)	Halo de inhibición de control negativo (Suero fisiológico)
	Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones
Placa 01	0	0	0	0	0	16.79 mm	0
Placa 02	0	0	0	0	0	17.62 mm	0
Placa 03	0	0	0	0	0	17.74 mm	0
Placa 04	0	0	0	0	0	17.39 mm	0
Placa 05	0	0	0	0	0	16.83 mm	0
Placa 06	0	0	0	0	0	16.91 mm	0
Placa 07	0	0	0	0	0	16.72 mm	0
Placa 08	0	0	0	0	0	16.67 mm	0
Placa 09	0	0	0	0	0	16.85 mm	0
Placa 10	0	0	0	0	0	17.25 mm	0
PROMEDIO	0	0	0	0	0	17.077 mm	0

Anexo 05

Obtención de *E. giganteum* L.



Fig 04. Cosecha de la planta denominada *E. giganteum* L., a tempranas horas de la mañana en el distrito de Huaquirca, provincia Abancay, departamento de Apurímac.



Fig 05. Plantación de *E. giganteum* L., donde se observan los tallos principales y sus ramas laterales estériles.

Anexo 06

Procesamiento de *E. giganteum* L.



A



B

Fig 06. Selección de la muestra de planta a procesar. **A.** *E. giganteum* L. recolectado y almacenado sobre papel Kraft. **B.** Separación de los tallos principales y laterales de las impurezas.



A



B

Fig 07. Desinfección y secado de la muestra a procesar. **A.** Lavado con NaOCl al 0.5 %. **B.** Se coloca la muestra de la planta en la estufa a 37 °C durante 05 días.

Anexo 07

Elaboración del extracto etanólico de *E. giganteum* L.



A



B

Fig 08. Trituración de *E. giganteum* L. **A.** Se observa la muestra de planta deshidratada en la estufa. **B.** Proceso de trituración de planta en un molino manual previamente desinfectado.



A



B

Fig 09. Tamizaje y pesado de la muestra molida. **A.** Tamizaje para estandarizar el tamaño de la muestra. **B.** Se realizó 02 veces el peso de la muestra de 100 gr cada una.

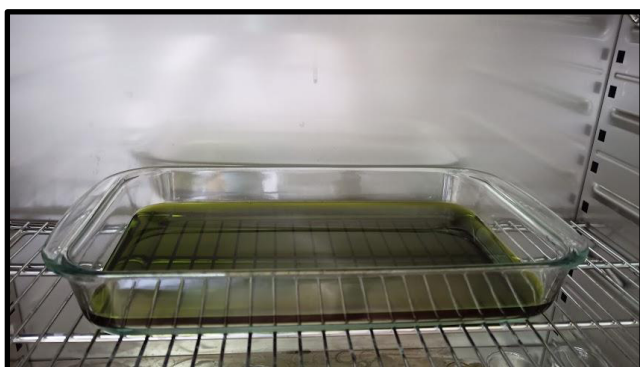


A



B

Fig 10. Maceración y filtrado de la muestra. **A.** Se maceró la planta con etanol de 70° en dos botellas herméticamente cerradas. **B.** Después de 05 días se filtró la fase líquida en papel Whatman N° 04 con ayuda de una bomba de succión.



A



B

Fig 11. Obtención de extracto etanólico seco. **A.** Se somete la muestra filtrada a la estufa a 35 °C durante 03 días. **B.** Se observa el extracto etanólico seco resultante (7.6 gr).



Fig 12. Reconstitución del extracto etanólico seco con 70 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), donde se observa la homogeneización de la muestra, hasta obtener un extracto etanólico al 100 %.



Fig 13. Se realizaron las respectivas diluciones a partir del extracto etanólico al 100 % para obtener las diferentes concentraciones de extracto que fueron almacenados en botellas de vidrio de color ámbar.

Anexo 08

Obtención de cepas ATCC de *F. nucleatum*



Fig 14. Tambor que contiene la cepa de *F. nucleatum*.



A

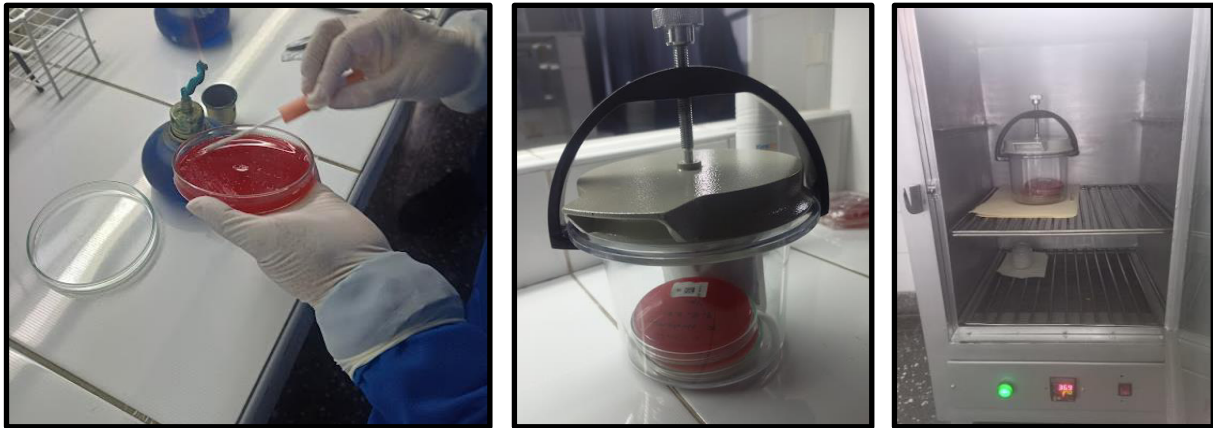


B

Fig 15. **A.** Dispositivo que contiene el pellet liofilizado. **B.** Pellet liofilizado con su hisopo inoculador y ampolla de fluido hidratante de *F. nucleatum*.

Anexo 09

Prueba de actividad antibacteriana frente a *F. nucleatum*

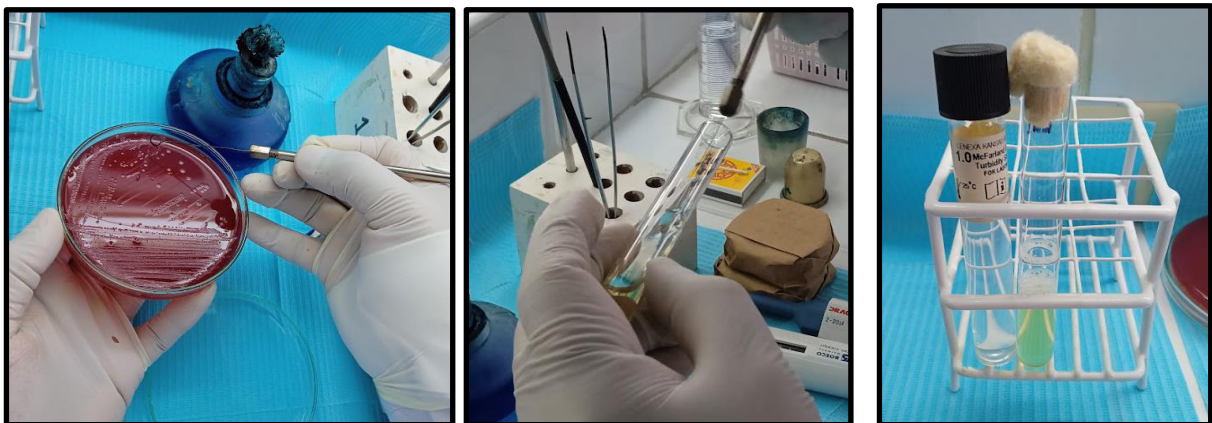


A

B

C

Fig 16. Activación de cepa ATCC. **A.** Se retira el hisopo del vial liofilizado y se siembra sobre el agar Schaedler en un ambiente aséptico. **B.** Se coloca la placa Petri sembrada junto al reactivo de anaerobiosis en una jarra de anaerobiosis. **C.** Se incuba a 37 °C durante 05 días.



A

B

C

Fig 17. Homogeneización de la muestra en la escala de McFarland. **A.** Se toman las colonias que han crecido producto de la activación de la cepa ATCC. **B.** Se inoculan sobre caldo BHI hasta obtener la turbidez adecuada. **C.** Se compara la turbidez con la escala de 01 de McFarland hasta obtener una consistencia similar al reactivo.



Fig 18. Control positivo, control negativo y extracto etanólico de *E. giganteum* L. en sus diferentes concentraciones.

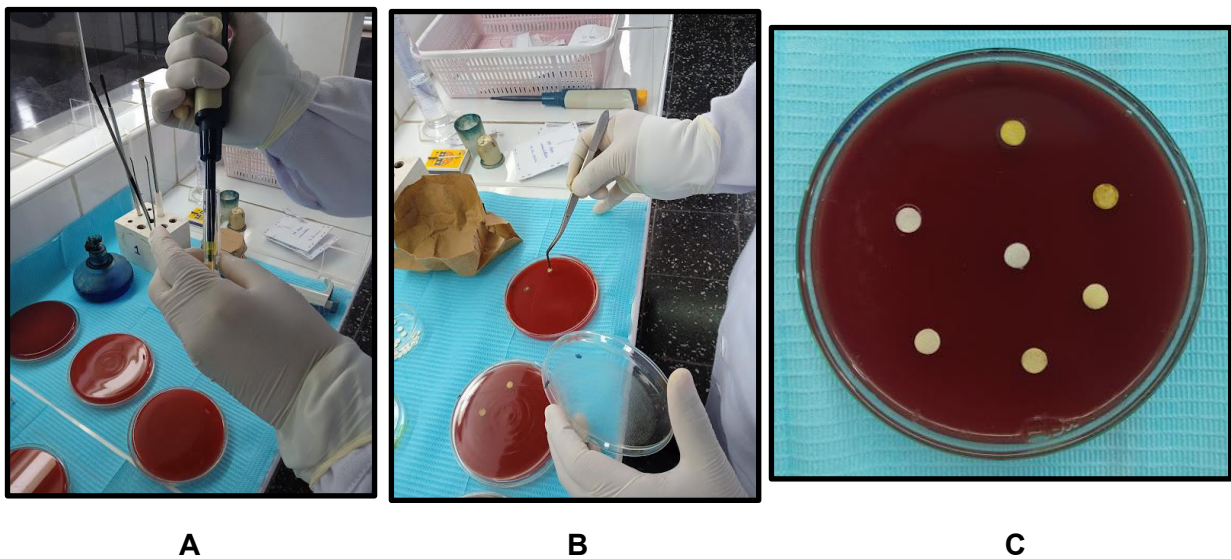


Fig 19. Siembra mediante el método de difusión en agar. **A.** Se extrae 100 uL de muestra homogeneizada para depositarla sobre cada placa y diseminarla con un hisopo por toda la superficie. **B.** Se colocan los discos embebidos con los extractos, el control positivo y el control negativo. **C.** Ejemplo de una placa Petri sembrada lista para su incubación.

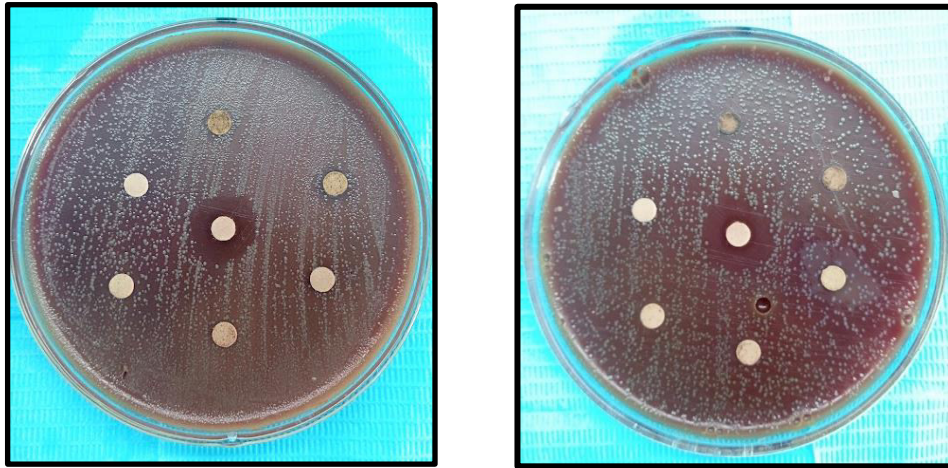


Fig 20. Se observan dos placas representativas de la muestra donde se observan evidentemente los halos de inhibición formados por los discos del control positivo, y el nulo efecto antibacteriano que mostraron las diferentes concentraciones de extracto junto al control negativo.

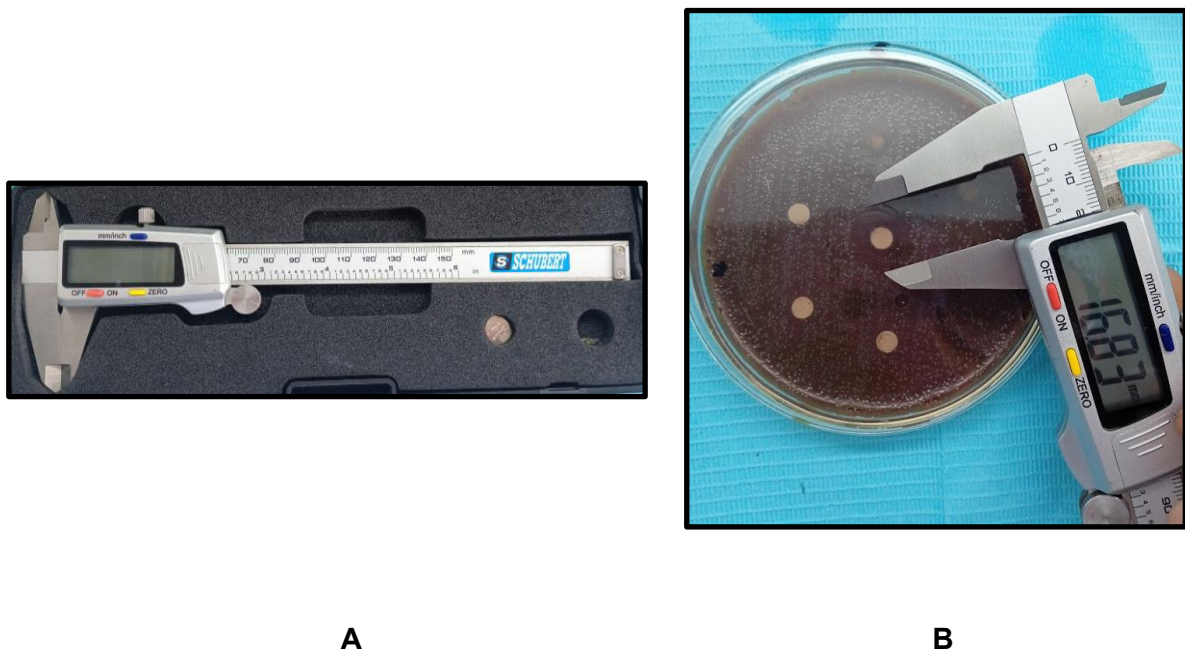


Fig 21. Recolección de resultados. **A.** Se observa el vernier digital que será utilizado como instrumento de medición de los halos de inhibición. **B.** Se observa la medición del halo de inhibición del gluconato de clorhexidina al 0.12 %.

Anexo 10

Características morfológicas de *F. nucleatum*

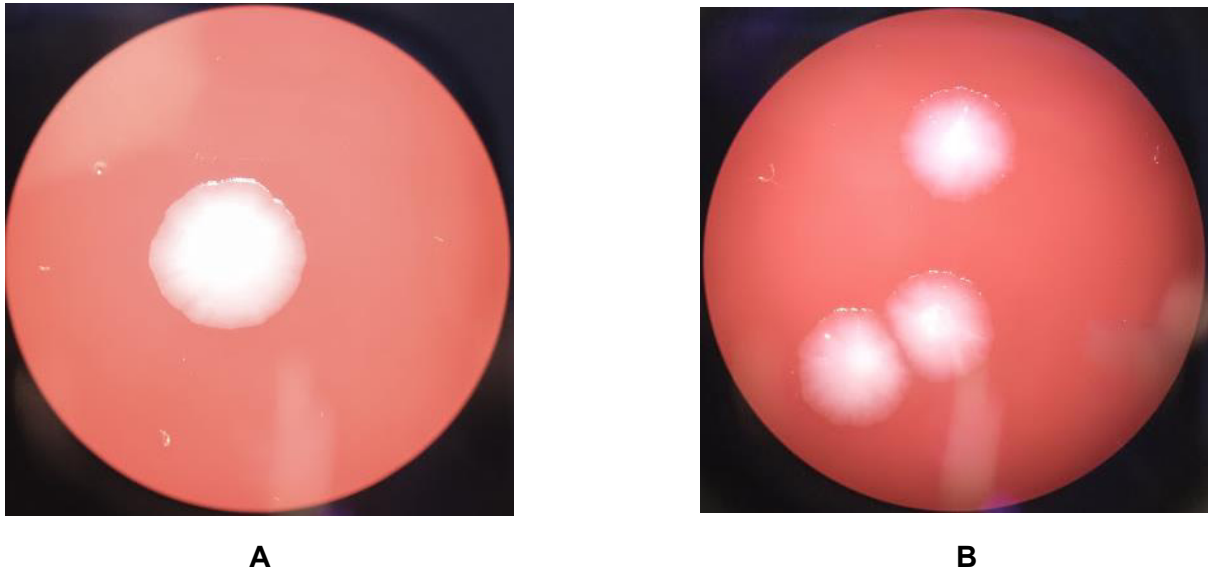


Fig 22. Características macroscópicas de *F. nucleatum*. **A** y **B**. Se observan colonias blanquecinas de aproximadamente 02 mm de diámetro con apariencia “manchada” o “miga de pan” como menciona la literatura.

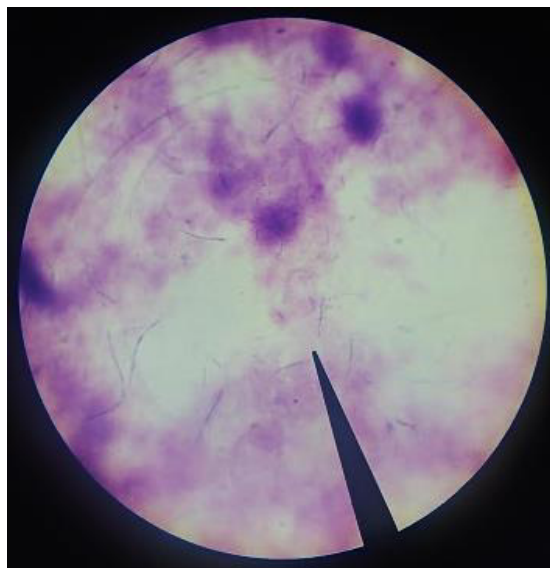


Fig 23. Características microscópicas de *F. nucleatum*. Bacilo Gram negativo, delgado, en forma de huso con extremos puntiagudos que se presentan individualmente en la figura.