

**UNIVERSIDAD PRIVADA DE TACNA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA**



TESIS

Efecto antibacteriano de un enjuague bucal experimental a base de extracto etanólico de Tara (*Caesalpinia spinosa*) frente a patógenos orales. Estudio *in vitro*.

Presentado por:

AUTOR

Bach. Cristell Darian Valerie Esquivel Luque
ORCID 0000-0002-7834-2954

ASESORA

Mag. Gladys Karina Portugal Motocanche
ORCID 0000-0002-5803-0582

Para optar por el título profesional de:

Cirujano Dentista

TACNA – PERU

2024

DEDICATORIA.

Dedico este trabajo de tesis, a mis queridos padres: Cesar y Zulema, por brindarme la oportunidad de alcanzar este importante logro en mi formación profesional, cuyo apoyo incondicional y presencia constante han sido el pilar fundamental en mi vida. A mis amados hermanos, quienes siempre estuvieron a mi lado, expresándome su apoyo, su amor y respaldo que han sido la fuerza impulsora detrás de mis logros.

AGRADECIMIENTO.

Deseo expresar mi profundo agradecimiento a mis docentes, por permitirme vivir una experiencia enriquecedora durante mi paso por la universidad, quienes con su dedicación y compromiso en este proceso integral de aprendizaje y crecimiento académico, me ha permitido alcanzar una meta más en mi formación profesional. Asimismo, agradezco a mis padres por ser mi guía en todo este proceso, que ha contribuido de manera invaluable como profesional y ser humano.

DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD

Yo, Cristell Darion Valeria Esquivel Luque, en calidad de Bachiller de la Escuela Profesional de Odontología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Privada de Tacna, identificado con DNI 72220583, declaro bajo juramento que:

1. Soy autor de la tesis titulada:

"Efecto antibacteriano de un enjuague bucal experimental a base de extracto etanólico de Tava (Caesalpinia spinosa) frente a Patógenos Orales. Estudio in vitro."

Asesorada por Mag. Gladys Karina Portugal Motocanche, la cual presente para optar el: Título Profesional de Cirujano Dentista.

2. La tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente, habiéndose respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas.

3. La tesis presentada no atenta contra los derechos de terceros.

4. La tesis no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.

5. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falsificados, ni duplicados, ni copiados.

Por lo expuesto, mediante la presente asumo frente a La Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse por la autoría, originalidad y veracidad del contenido de la tesis, así como por los derechos sobre la obra.

En consecuencia, me hago responsable frente a La Universidad de cualquier responsabilidad que pudiera ocasionar, por el incumplimiento de lo declarado o que pudiera encontrar como causa del trabajo presentado, asumiendo todas las cargas pecuniarias que pudieran derivarse de ello a favor de terceros con motivo de acciones, reclamaciones o conflictos derivados del incumplimiento de lo declarado o las que encontrasen causa en el contenido de la tesis.

De identificarse fraude, piratería, plagio, falsificación o que el trabajo de investigación haya sido publicado anteriormente; asumo las consecuencias y sanciones que de nuestra acción se deriven, sometiéndonos a la normatividad vigente de la Universidad Privada de Tacna.



DNI: 72220583

Fecha: 06/11/24

RESUMEN

Objetivo: Demostrar el efecto antibacteriano del enjuague bucal experimental a base del extracto etanólico de la *Caesalpinia spinosa* (Tara) frente a *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 y *Porphyromona gingivalis* ATCC 3327. **Material y Método:** Se ejecutó un estudio experimental realizando un extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (Tara) a distintas concentraciones, cuya técnica de obtención usada fue la maceración en alcohol a 70° por 45 días, y se procedió a las diluciones, para lograr concentraciones al 25%, 50%, 75% y 100%: Para evaluar el efecto antibacteriano se usó la técnica de difusión de disco de Kirby Bauer. La concentración mínima inhibitoria (CMI), se adquirió por la técnica de microdilución y la concentración mínima bactericida (CMB) por la UFC. Finalmente, se elaboró el enjuague bucal a base del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (Tara) empleando el CMB para después comprobar su efecto antibacteriano; en dicho ensayo se realizaron 9 repeticiones para *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 y *Porphyromona gingivalis* ATCC 3327 respectivamente.

Resultados: El estudio por Cromatografía Líquida constató metabolitos secundarios, compuestos fenólicos y flavonoides, triterpenos, esteroides, y taninos. El efecto antibacteriano sobre *Porphyromona gingivalis* ATCC 3327 en las concentraciones de 25%, 50%, 75%, 100% con resultados de 21.69mm, 27.72mm, 31.33mm, 35.18mm halos de inhibición y sobre *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, la concentración del 100%, con promedio de 14.62mm y 75% con 13.20mm y en las concentraciones del 25%, 50% y el control negativo el halo de inhibición no fue registrable. La CMI sobre *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 es de 5.41744996 mg/ml y la CMB es 5,7457831 mg/ml; mientras que para *Porphyromona gingivalis* ATCC 3327 la CMI es de 0.95211665 mg/ml y la CMB fue de 1.2148331mg/ml. Se elaboró un enjuague bucal a base del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (Tara) frente a *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 con una concentración de 5.7457831mg/ml que es el 97.2% formando halos >25mm en promedio y de la Clorhexidina al 0,12% fue de 14.35mm, frente a *Porphyromona gingivalis* ATCC 3327 , el diámetro de halo de inhibición fue >25 mm a una concentración de 1.2148331 mg/ml que es el 20.5% y de la Clorhexidina al 0,12%, fue de 36.36mm.

Conclusiones: El enjuague bucal a base del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (Tara) presenta efecto antibacteriano frente a *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 y *Porphyromona gingivalis* ATCC 3327.

Palabras clave: Efecto antibacteriano, extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (Tara), *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromona gingivalis*.

ABSTRACT

Antibacterial effect of an experimental mouthwash based on ethanolic extract of Tara (*Caesalpinia spinosa*) against oral pathogens. In vitro study.

Objective: To demonstrate the antibacterial effect of the experimental mouthwash based on the ethanolic extract of *Caesalpinia spinosa* (Tara) against *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 and *Porphyromona gingivalis* ATCC 3327. **Material and**

Method: An experimental study was carried out with an ethanolic extract of *Caesalpinia spinosa* (Tara) at different concentrations, whose obtaining technique used was maceration in alcohol at 70° for 45 days, and dilutions were carried out to achieve concentrations of 25%, 50%, 75% and 100%: To evaluate the antibacterial effect Kirby Bauer's disk diffusion technique was used. The minimum inhibitory concentration (MIC) was acquired by the microdilution technique and the minimum bactericidal concentration (MBC) by the CFU. Finally, the mouthwash was prepared based on the ethanolic extract of *Caesalpinia spinosa* (Tara) using CMB to then verify its antibacterial effect; In this test, 9 repetitions were carried out for *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 and *Porphyromona gingivalis* ATCC 3327 respectively.

Results: The Liquid Chromatography study confirmed secondary metabolites, phenolic compounds and flavonoids, triterpenes, steroids, and tannins. The antibacterial effect on *Porphyromona gingivalis* ATCC 3327 in concentrations of 25%, 50%, 75%, 100% with results of 21.69mm, 27.72mm, 31.33mm, 35.18mm inhibition zones and on *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, the concentration of 100%, with an average of 14.62mm and 75% with 13.20mm and in the concentrations of 25%, 50% and the negative control the zone of inhibition was not recordable. The MIC on *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 is 5.41744996 mg/ml and the MBC is 5.7457831 mg/ml; while for *Porphyromona gingivalis* ATCC 3327 the MIC is 0.95211665 mg/ml and the MBC was 1.2148331 mg/ml. A mouthwash was prepared based on the ethanolic extract of *Caesalpinia spinosa* (Tara) against *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 with a concentration of 5.7457831 mg/ml, which is 97.2%, forming halos >25mm on average, and Chlorhexidine at 0.12%. was 14.35mm, compared to *Porphyromona gingivalis* ATCC 3327, the diameter of the inhibition zone was >25 mm at a concentration of 1.2148331 mg/ml, which is 20.5%, and for Chlorhexidine at 0.12%, it was 36.36mm. **Conclusions:** The mouthwash based on the ethanolic extract of *Caesalpinia spinosa* (Tara) has an antibacterial effect against *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 and *Porphyromona gingivalis* ATCC 33277.

Keywords: Antibacterial effect, ethanolic extract of *Caesalpinia spinosa* (Tara), *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromona gingivalis*.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MATERIAL Y MÉTODOS	9
II.1.1. Diseño del estudio.....	9
II.1.2. Tipo de investigación.....	9
II.1.3. Población y muestra.....	9
1.3.1. Tamaño muestral	10
1.3.2. Criterios de inclusión:.....	12
1.3.3. Criterios de exclusión:	12
II.1.4. Operacionalización de variables	13
II.1.5. Técnicas y procedimientos.....	14
1.5.1. Técnica de recolección de datos	14
1.5.2. Ficha de recolección de datos.....	14
II.1.5.3 Instrumentos	14
1.5.4. Procedimientos	17
II.1.6. Plan de análisis.....	37
II.1.7. Consideraciones éticas	38
III. RESULTADOS	39
IV. DISCUSIÓN.....	55
V. CONCLUSIONES.....	59
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICA	60
VII. ANEXOS	65

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: Formulación del Enjuague Bucal.....	29
TABLA 2: Prueba de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la <i>Caesalpinia spinosa</i> (Tara), frente a <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586 y <i>Porphyromona Gingivalis</i> ATCC 33277 por el método de difusión de disco (KirbyBauer).....	36
TABLA 3: Resultados estadísticos descriptivos de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la <i>Caesalpinia spinosa</i> (Tara), en diferentes concentraciones 25% ,50%,75% y 100% frente a <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586 <i>Porphyromona Gingivalis</i> ATCC 33277.....	38
TABLA 4: Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de la <i>Caesalpinia spinosa</i> (Tara), frente a <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586.....	41
TABLA 5: Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de la <i>Caesalpinia spinosa</i> (Tara), frente a <i>Porphyromona Gingivalis</i> ATCC 33277.....	42
TABLA 6: Resultados de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del extracto etanólico de la <i>Caesalpinia spinosa</i> (Tara), frente a <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	43
TABLA 7: Resultados de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del extracto etanólico de la <i>Caesalpinia spinosa</i> (Tara), frente a <i>Porphyromona Gingivalis</i> ATCC 33277.....	44
TABLA 8: Resultados del efecto antibacteriano del enjuague bucal experimental a base de extracto etanólico de la <i>Caesalpinia spinosa</i> (Tara), con el Gluconato de clorhexidina al 0,12% frente a <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586 y <i>Porphyromona Gingivalis</i> ATCC 33277.....	45
TABLA 9: Resultados estadísticos descriptivos del efecto antibacteriano del enjuague bucal experimental a base del extracto etanólico de la <i>Caesalpinia</i>	

spinosa (Tara), con el Gluconato de clorhexidina al 0,12% frente a <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586 y <i>Porphyromona Gingivalis</i> ATCC 33277.....	46
TABLA 10: Contraste de hipótesis, prueba de normalidad, Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk.....	48
TABLA 11. Contraste de hipótesis, prueba de normalidad, prueba de ANOVA	49
TABLA 12: Contraste de hipótesis, prueba de normalidad, prueba de Tukey.....	50

INDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1:** Diagrama de caja y bigotes de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la *Caesalpinia spinosa* (Tara), en diferentes concentraciones 25%, 50%, 75% y 100% frente a *Porphyromona gingivalis* ATCC 3327.....**39**
- FIGURA 2:** Diagrama de caja y bigotes de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la *Caesalpinia spinosa* (Tara), en diferentes concentraciones 25%, 50%, 75% y 100% frente a *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586.....**40**
- FIGURA 3:** Diagrama de caja y bigotes del efecto antibacteriano del enjuague bucal experimental a base de *Caesalpinia spinosa* (Tara), con el gluconato de clorhexidina 0,12%, frente a *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 y *Porphyromona gingivalis* ATCC 3327.**47**

I. INTRODUCCIÓN

Se sabe que las infecciones crónicas más comunes de la cavidad bucal, son originadas principalmente por la colonización de bacterias disbióticas que rompen el equilibrio del medio bucal (1).

Se ha precisado más de 600 especies bacterianas en la cavidad bucal; convenientemente a su disposición topológica, éstas están incididas por diversos factores como la dieta, higiene bucal, el tabaco, entre otros (2).

Una de estas infecciones mencionadas, corresponde a una condición inflamatoria de las estructuras de sostén del diente, que termina en la pérdida del periodonto que llevará a la pérdida del diente, cuya enfermedad es la periodontal (3).

Fusobacterium nucleatum (Fn), asociada fuertemente con el establecimiento y sostenimiento de la biopelícula oral, por la capacidad de fomentar la coagregación bacteriana y actuando como puente con otros colonizadores, que a fin de cuentas termina generando múltiples enfermedades en la cavidad bucal como la periodontitis (4).

En cuanto a la *Porphyromona gingivalis (Pg)*, es estimada como una de las más importantes bacterias periodontopatógenas, encargada de producir proteasas que juegan un papel importante en su patogenicidad ineludiblemente, bacteria Gram negativa anaerobia que contiene fimbrias favoreciendo su mejor adhesión al tejido periodontal (5).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), reconoce el valor de incorporar prácticas de la medicina tradicional en la salud pública. Esto puede contribuir a disminuir los costos y la dificultad de acceso a medicamentos basados en productos químicos, especialmente en áreas rurales, contribuyendo así a mejorar la salud

oral de estas poblaciones. Es importante seguir investigando y promoviendo estas prácticas, para lograr un mejor acceso a la atención médica en todo el mundo. (6)

La medicina tradicional en el Perú es utilizada desde tiempos pasados, en la cual distintas plantas medicinales se emplearon para mitigar dolores y aliviar

enfermedades, atribuyéndoseles eficientes propiedades terapéuticas por la flora muy rica que presenta (7). En la Actualidad, se conserva una inmutable investigación de opciones en la variedad de plantas farmacéuticas; una de ellas, es la *Caesalpinia spinosa* (*C. spinosa*) (*Tara*), es un árbol de legumbres originario de América del Sur (8), siendo nuestro país beneficiado con esta planta medicinal, específicamente en las ciudades de Tacna, Huánuco, La Libertad, Lambayeque, Ancash, Amazonas, Cajamarca y Ayacucho, siendo estas las principales productoras de Tara con un 80% de producción en el mundo (9) (10).

El efecto antibacteriano, se describe como el impedimento y la aniquilación de las bacterias mediante el uso de diferentes compuestos. Entre los más empleados tenemos el enjuague bucal, que también es un agente anti placa seguro y eficaz que resiste tanto a la actividad metabólica, adhesión bacteriana, la invasión y la proliferación. Sin embargo; los enjuagues bucales químicos disponibles comercialmente a pesar de su rentabilidad, tienden a crear efectos secundarios indeseables como la alteración del gusto y cambio de color de los dientes. Por lo tanto, para que supere tales efectos secundarios, se quiere implementar enjuagues bucales a base de plantas no tóxicas (11). En este sentido; el advenimiento de la fitoterapia de la Tara (*C. spinosa*) y sus múltiples enfoques, se plasman en las siguientes investigaciones:

R. Avilés y col. ¹² en su investigación dio a conocer que la *Caesalpinia spinosa*, los constituyentes de la vaina de la tara, disponen una beneficiosa actividad antioxidante, con un IC50 de 10 µg/mL, buena cantidad de polifenoles totales, hasta 150 mg EAG/g de muestra, y elevada cantidad de taninos, hasta 80% siendo también antibacteriano.

Wilder J y col. ¹³ demostró la actividad antioxidante *in vitro* (DPPH y ABTS) del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (*tara*), fue superior que el Trolox, también reprime la enzima colagensa con máxima potencia que el control positivo EGCG, aunque no reprime la elastasa. También dispone de dosis antiinflamatorias con diferencias relevantes entre las medias de las sustancias

entre la segunda y sexta horas, aun cuando, esta no es relevante al relacionarla con la (indometacina) a las mismas concentraciones.

Aylas C y col. ¹⁴ indican que el enjuague bucal formulado a base de aceites esenciales de eucalipto y Muña, demostró la eficacia antimicrobiana diferente en comparación con el enjuague bucal comercial. En el caso de *Staphylococcus aureus* ATCC 29737, con un p-valor=0,6039, el tratamiento formulado no fue tan eficaz como el enjuague popular; mientras que para *Candida albicans* ATCC 10231, ambos mostraron la misma eficacia.

Rupali Mahajan y col. ¹⁵ evaluaron la eficacia y las propiedades antimicrobianas de cinco enjuagues bucales a base de hierbas con gluconato de clorhexidina in vitro, en pacientes sanos y con periodontitis con placa dental establecida. Arrojando diferencias estadísticamente no relevantes entre clorhexidina, hiora y granada ($p > 0,005$). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre clorhexidina, tulsi, clavo y neem ($p < 0,005$).

Pachamango Leiv y col. ¹⁶ muestran en su investigación que tanto el extracto etanólico (EE) de *Plantago major* al 75% como el PerioAid® 0.12% tienen un efecto antibacteriano similar in vitro, sobre *Fn* ATCC 25586. Esto sugiere que, EE de *Plantago major* al 75% puede ser tan efectivo como el enjuague PerioAid® en la inhibición del crecimiento de *Fn* ATCC 25586 en condiciones de laboratorio.

María Pareja-Vásquez y col. ¹⁷ los resultados del estudio indican que el EE de *C. spinosa* (Tara), demostró acción antimicrobiana in vitro contra la biopelícula bucal. Se observó que la zona de inhibición formada por el EE de *C. spinosa*, fue significativamente mayor que la obtenida con clorhexidina 0,12% ($p < 0,000$), frente a *S. aureus* y también fue considerable en comparación con los controles frente a *S. sanguinis* ($p < 0,000$). Sin embargo; no se registró actividad inhibidora sobre la Pg.

Mariella Huarino Acho y col. ¹⁸ concluye que el extracto alcohólico de la *C. spinosa*, muestra acción antibacteriana sobre la flora bacteriana salival mixta. Esta acción antibacteriana, aumenta en función al incremento de la concentración del extracto, como se observa en el aumento del diámetro del halo de inhibición desde 6.25 mg/mL hasta 75 mg/mL.

Sonia Macedo Valdivia y col. ¹⁹ comprobaron que los resultados del estudio muestran que la infusión de *C. spinosa* en concentraciones del 50%, 75% y 100%, exhibió efecto inhibitorio sobre las cepas de *Streptococcus mutans*. A las 24 horas, se observaron diámetros promedio de zona de inhibición de 14,20 mm, 16,57 mm y 17,11 mm, correspondientemente. Sin embargo, el aceite esencial al 100% de *C. spinosa*, mostró un efecto inhibitorio aún superior, con un diámetro estándar de zona de inhibición de 18,09 mm a las 24 horas.

Este estudio tiene como objetivo formular un enjuague bucal experimental a base de *C. spinosa* (Tara), y demostrar su efecto antibacteriano frente a *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 y *Porphyromona gingivalis* ATCC 3327.

JUSTIFICACIÓN

La cavidad oral, es un entorno muy interactivo e intrincado donde se extiende una diversidad de hábitats, que disponen de la relación entre los microorganismos en los diferentes medios bucales. Generalmente, el cuerpo humano vive en simbiosis con dichas bacterias, para poder sobrellevar a dichas especies a interacción hospedador-huésped, es fruto de años de convivencia y evolución.

Así como, algunas bacterias aerobias gramnegativas como la *Pg* y *Fn* tienen un influyente papel en el inicio y posterior progresión de la periodontitis, concurriendo en el daño del tejido conectivo, formación de bolsa periodontal y pérdida de hueso alveolar por medio de un proceso inmunopatogénico.

La medicina natural es favorable para el tratamiento, diagnóstico y prevención de enfermedades bucodentales, a través del uso de terapias naturales, como la *C. spinosa* (*Tara*) por su efecto antibacteriano, siendo factible para el presente proyecto.

Gracias a sus propiedades químicas frente a los patógenos orales la *C. spinosa* (*Tara*), favorece a la prevención en la Odontología. Por algunos estudios ya realizados sobre la *C. spinosa*, se conoce su interés y los beneficios terapéuticos de dicha planta, es por eso nuestra inclinación y necesidad de investigación de la *C. spinosa*, que nos ofrece una opción terapéutica medicinal, habiéndose adquirida mediante el extracto etanólico de la *C. spinosa*, favoreciendo en la salud bucal.

Con este estudio, pretendemos evidenciar que, el enjuague bucal a base del extracto etanólico (EE) de la *C. spinosa*, tiene un efecto antibacteriano similar a productos convencionales como la clorhexidina frente a los patógenos orales, es

decir, impedir el desarrollo bacteriano, debido a que existen algunas investigaciones experimentales que hablan de los beneficios de esta planta farmacéutica o curativa, sobre algunos microorganismos orales en la cavidad bucal. Siendo éste; un suplemento novedoso al tratamiento a futuro, sobre las enfermedades bucodentales y caries dental utilizándolo como un recurso alternativo natural.

La presente Investigación, contribuye a la segunda línea de investigación en relación a la innovación tecnología y biomateriales dentales, con el interés de formular un enjuague bucal experimental y su efecto antimicrobiano, frente a bacterias presentes en la boca, como una elección en el tratamiento de las principales enfermedades bucales.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto antibacteriano in vitro de un enjuague bucal experimental a base de un extracto etanólico de la *Caesalpinia spinosa* (Tara), frente a *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 y *Porphyromona gingivalis* ATCC 3327?

HIPÓTESIS

- **Hipótesis Alterna. -**

El enjuague bucal experimental a base de extracto etanólico de la *Caesalpinia spinosa* (Tara), presenta efecto antibacteriano frente a *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 y *Porphyromona gingivalis* ATCC 3327.

- **Hipótesis Nula. -**

El enjuague bucal experimental a base de extracto etanólico de la *Caesalpinia spinosa (Tara)*, no presenta efecto antibacteriano frente a *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 y *Porphyromona gingivalis* ATCC 3327.

OBJETIVOS

V1. Objetivo General:

Determinar el efecto antibacteriano in vitro del enjuague bucal experimental a base de extracto etanólico de la *Caesalpinia spinosa (Tara)*, frente a *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 y *Porphyromona gingivalis* ATCC 3327.

V2. Objetivos Específicos:

- Determinar la sensibilidad antibacteriana del extracto etanólico de la *Caesalpinia spinosa (Tara)*, frente a frente a *Fusobacterium nucleatum* ATCC25586 y *Porphyromona gingivalis* ATCC 3327.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) del extracto etanólico de la *Caesalpinia spinosa (Tara)*, frente a *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 y *Porphyromona gingivalis* ATCC 3327.
- Determinar la Concentración Mínima Bactericida (MBC) del extracto etanólico de la *Caesalpinia spinosa (Tara)*, frente a *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 y *Porphyromona gingivalis* ATCC 3327.
- Comparar el efecto antibacteriano del enjuague bucal experimental a base de *Caesalpinia spinosa (Tara)*, con el gluconato de clorhexidina 0,12% frente a *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 y *Porphyromona gingivalis* ATCC3327.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

II.1.1. Diseño del Estudio. -

Diseño experimental en vista de, que se utilizó métodos in vitro en el que participaron cultivos de microorganismos, sobre los que se dejó efectuar distintas concentraciones de extracto etanólico a base de *Caesalpinia spinosa* (*Tara*), para evaluar su efecto antimicrobiano.

II.1.2. Tipo de Investigación. -

- **Experimental:** La investigación se ejecutó en un medio de cultivo que son beneficiados para la formación de las bacterias y la naturaleza del estudio, fue manipulada de manera intencional demostrando así la actividad antibacteriana in vitro.
- **Transversal:** Este estudio se ejecutó y fue medido en una sola circunstancia, comparando la actividad antibacteriana del enjuague a base de extracto etanólico de la *C. spinosa* con la Clorhexidina de 0.12%.
- **Prospectivo:** Debido a que fueron datos propios para el estudio, de primera fuente, se realizó la examinación y observación de las respuestas, a medida que va ocurriendo los hechos.
- **Analítico:** Ya que se valoraron los resultados obtenidos para conocer la actividad antibacteriana, CMI y CMB del extracto etanólico de *C. spinosa*, así como el efecto antibacteriano del enjuague a base de extracto etanólico *C. spinosa* ante *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 y *Porphyromona gingivalis* ATCC 3327 comparándolo con la Clorhexidina al 0.12%.

II.1.3. Población y Muestra. -

- **Unidad de Estudio:** Está formado por discos cargados del extracto etanólico en distintos porcentajes, 25%, 50%, 75% y 100% que fueron colocadas en las placas petri cultivadas con colonias de *Pg* ATCC 3327 y *Fn* ATCC 25586.
- **Unidades de Muestreo Microbiano:** Colonia de microorganismos de *Fn* ATCC 25586 y *Pg* ATCC 3327.
- **Unidades de Muestreo Biológico:** Extracto etanólico de *C. spinosa* (*Tara*) en distintas concentraciones y enjuague bucal a base de EE de *C. spinosa* (*Tara*).

II.1.4. Tamaño Muestral. -

Para determinar la cantidad de muestras a realizar, utilizamos el programa “GPOWER 3.1.9.7.”, en lo que nos da un efecto de 1.0010180, con un error de alfa de 0.05, un poder de defecto de 0.80 y con 12 grupos experimentales, teniendo un cálculo final de muestra de 36 elementos. (ANEXO 1).

Por medidas de contingencia; se trabajó con 9 repeticiones para cada porcentaje del EE de la *Tara*, 25%, 50%, 75% y 100%, incluyendo a los controles (+ y -), lo que hace un total de 54 muestras por bacteria.

- En el grupo 1: se usaron 3 placas Petri, cultivada la bacteria (siembra por diseminación) *Fn* ATCC 25586 en porcentaje de 25%, teniendo un total de 9 repeticiones del EE de la *C. spinosa* (*Tara*).
- En el grupo 2: se usaron 3 placas Petri, cultivada la bacteria (siembra por diseminación) *Fn* ATCC 25586 en porcentaje de 50%, teniendo un total de 9 repeticiones del EE de la *C. spinosa* (*Tara*).
- En el grupo 3: se usaron 3 placas Petri, cultivada la bacteria (siembra por diseminación) *Fn* ATCC 25586 en porcentaje de 75%, teniendo un total de 9

repeticiones del EE de la *C. spinosa* (Tara).

- En el grupo 4: se usaron 3 placas Petri, cultivada la bacteria (siembra por diseminación) *Fn ATCC 25586* en porcentaje de 100%, teniendo un total de 9 repeticiones del EE de la *C. spinosa* (Tara).
- En el grupo 5: se usaron 3 placas Petri, cultivada la bacteria (siembra por diseminación) *Pg ATCC 3327* en porcentaje de 25%, teniendo un total de 9 repeticiones del EE de la *C. spinosa* (Tara).
- En el grupo 6: se usaron 3 placas Petri, cultivada la bacteria (siembra por diseminación) *Pg ATCC 3327* en porcentaje de 50%, teniendo un total de 9 repeticiones del EE de la *C. spinosa* (Tara).
- En el grupo 7: se usaron 3 placas Petri, cultivada la bacteria (siembra por diseminación) *Pg ATCC 3327* en porcentaje de 75%, teniendo un total de 9 repeticiones del EE de la *C. spinosa* (Tara).
- En el grupo 8: se usaron 3 placas Petri, cultivada la bacteria (siembra por diseminación) *Pg ATCC 3327* en porcentaje de 100%, teniendo un total de 9 repeticiones del EE de la *C. spinosa* (Tara).
- En el grupo 9: se usarán 3 placas Petri para el control positivo (clorhexidina 0.12%) para la *Fn ATCC 25586*, teniendo un total de 9 repeticiones.
- En el grupo 10: se usaron 3 placas Petri, para el control negativo (agua destilada) para la *Fn ATCC 25586*, teniendo un total de 9 repeticiones.
- En el grupo 11: se usaron 3 placas Petri, para el control positivo (clorhexidina 0.12%) para la *Pg ATCC 3327*, teniendo un total de 9 repeticiones.
- En el grupo 12: se usaron 3 placas Petri, para el control negativo (agua destilada) para la *Pg ATCC 3327*, teniendo un total de 9 repeticiones.

1.4.1. Criterios de Inclusión. _

- Placas Petri aptas para ser inoculadas.
- Discos de sensibilidad en buen estado.
- Cepas de Fn ATCC 25586 aptas para su uso.
- Cepas de Pg ATCC 3327 aptas para su uso.
- Vainas de Tara en buen estado, sin hongos.

1.4.2. Criterios de Exclusión:

- Placas Petri con medio de cultivo irregular/contaminadas.
- Discos de sensibilidad en mal estado.
- Cepas de Fn ATCC 25586 contaminadas.
- Cepas de Pg ATCC 3327 contaminadas.
- Vainas de tara contaminadas.

II.1.5. Operacionalización de Variables. -

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	VALOR FINAL	ESCALA DE MEDICIÓN
ENJUAGUE BUCAL (INDEPENDIENTE)	Herramienta complementaria medicinal para enjuagarse la boca durante un tiempo determinado y después expulsarlo.	Herramienta complementaria medicinal a base de <i>C. spinosa</i> (<i>Tara</i>) para enjuagarse la boca, similar a productos convencionales.	Enjuague experimental a base de extracto etanólico de <i>Tara</i>	Concentración al: 25%, 50%, 75% y 100%	Categórica Nominal
		Compuesto químico de amplio espectro frente a los microorganismos de la placa dentobacteriana.	Enjuague de Gluconato de Clorhexidina	Concentración al 0.12%	
EFFECTO ANTIBACTERIANO (DEPENDIENTE)	Sustancia que impide el crecimiento de una bacteria y que causan enfermedad.	Sensibilidad de los patógenos orales bajo la acción de las diluciones de los EE de <i>C. spinosa</i> (<i>Tara</i>).	Halos de inhibición	Milímetros (mm)	Ordinal De razón
			MIC	Turbidez (mg/ml)	
			CMB	UFC	
CEPA BACTERIANA (DEPENDIENTE)	Conjunto de microorganismos, que comparten características similares	Conjunto de microorganismos, que comparten ciertas características en la cavidad bucal.	Tipo de cepa bacteriana	Fusobacterium nucleatum ATCC 25586 , Porphyromona gingivalis ATCC 3327	Categórica Nominal

II.1.6. Técnicas y Procedimientos.

1.6.1 Técnica de Recolección de Datos:

Observación directa, es la técnica a usar para este proyecto. Usaremos una ficha de recolección de datos personalizada para los valores recolectados para su análisis posterior.

1.6.2. Ficha de Recolección de Datos:

- La ficha personalizada se diseñó para registrar los halos de inhibición, la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC), la Concentración Mínima Bactericida (MBC) de cada concentración del enjuague bucal experimental a base de *C. spinosa (Tara)*, expresados en mg/ml, así como el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) (ANEXO 3,4).
- Las informaciones recopiladas en la ficha de recolección de resultados se ingresaron en el programa Microsoft Office Excel, para llevar a cabo el análisis correspondiente. En este anexo se expone la tabulación de los resultados obtenidos, incluyendo los halos de inhibición, MIC, MBC y UFC, para cada concentración del enjuague bucal experimental.

1.6.3. Instrumentos:

1.6.3.1. Equipos:

- Balanza analítica
- Autoclave lab
- Equipo Vórtex IKA

- Incubadora
- Jarra de Anaerobiosis
- Vernier digital
- Horno de calor seco
- Refrigeradora
- Micropipeta (TIPS) 2000 ul
- Micropipeta (TIPS) 1000 ul
- Micropipeta (TIPS) 100 ul
- Micropipeta (TIPS) 10 ul

1.6.3.2. Biomateriales de Cultivo, Bacteria y Reactivos:

- Agar Mueller Hinton (MH)
- Caldo Infusion Cerebro Corazon (BHI)
- Agar Nutritivo (AN)
- Bacteria *Fm ATCC 25586*
- Bacteria *Pg ATCC 33277*
- Perio Aid. Clorhexidina 0.12%
- 70° Alcohol
- Discos de sensibilidad oxid

1.6.3.3. Materiales de Laboratorio:

- 100 ml Matraces Shott Duran
- 250 ml Matraces Shott Duran
- 500 ml Matraces Shott Duran
- 10 ml Pipeta Graduada
- 15 ml Pipeta Graduada
- 20 ml Pipeta Graduada
- 250ml Frascos de vidrio

- 500ml Frascos de vidrio
- 30 ml Frasco ámbar
- 250ml Vaso Precipitado
- 400ml Vaso Precipitado
- 600ml Vaso Precipitado
- 100ml Probeta
- 10ml Tubo de ensayo
- 20ml Tubo de ensayo con tapa Pirex

1.6.3.4. Otros Materiales:

- Campo de trabajo
- Licuadora Portátil
- N95 Mascarilla
- Gorros Descartable
- Mandilones para laboratorio
- Algodón
- Papel Aluminio
- Papel Toalla
- Papel Filtro
- Papel kraft
- Marcador color Negro
- Regla marca Artesco
- Micropipeta (TIPS) 1000 ul
- Encendedor clipper
- Cinta masking Adhesiva
- Ron para quemar
- Placa descartable Petri
- Calculadora científica

1.6.4. Procedimientos:

1.6.4.1. Recolección de muestra vegetal de la *C. spinosa (Tara)*

Para la recolección del ejemplar vegetal de la *C. spinosa (Tara)*, se siguió el procedimiento descrito por Sánchez (20) y Vidal (21).

-Recolección: Las vainas de *C spinosa (Tara)* fueron obtenidas en la Asociación Pecuaria, ubicada en la Villa Panamericana de la ciudad de Tacna. Se realizó, mediante un cuidadoso proceso para garantizar su conservación y calidad durante el traslado. Las vainas fueron colocadas en sobres de papel Kraft, para conservar su totalidad.

Se recolectaron un total de 2000 g de vaina, asegurando que estuvieran en buen estado y manteniéndolos en un ambiente sin iluminación, siendo ello, adecuado para evitar la humedad y su deterioro.

Además, se gestionó la compenetración taxonómica de esta especie botánica en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional “Jorge Basadre Grohmann” de Tacna, donde fue incorporada en un sobre para su estudio y análisis posterior. (ANEXO 2).

-Lavado: Este proceso inició en el "Laboratorio de Microbiología", donde se procedió a la segregación de posibles sustancias ajenas que podrían estar presentes en las vainas del ejemplar recibido, lavando el ejemplar con agua destilada para eliminar cualquier residuo superficial y se dejó orear.

-Secado: Las vainas de *C. spinosa (Tara)*, se distribuyeron sobre papel kraft y se sometieron a un proceso de secado en una estufa a una temperatura constante de 40 °C durante un lapso de 48 horas. Este método de secado controlado permite quitar la humedad de las vainas de manera gradual, preservando así sus propiedades y características naturales.

-Pulverización y Tamización: Las vainas de *C. spinosa(Tara)*,

fueron seleccionadas meticulosamente para su posterior procesamiento. Se procedió a pulverizar las vainas utilizando una licuadora Oster, asegurando así una molienda uniforme y eficiente. Posteriormente, la materia prima pulverizada fue sometida a un proceso de tamización. Este paso tuvo como objetivo estandarizar el tamaño de las partículas de la planta, garantizando una consistencia deseada en el producto final.

-Almacenamiento: El producto resultante se transfirió con precaución a frascos de vidrio de color ámbar. Los frascos de vidrio ámbar proporcionan un ambiente adecuado para el almacenamiento, protegiendo el material de posibles alteraciones causadas por la exposición a la luz. Esta medida de precaución se tomó con el objetivo de preservar la integridad y condición del producto durante el período previo a su posterior análisis.

1.6.4.2. Procesamiento del EE de la *C. spinosa* (Tara)

Para la obtención del EE *C. spinosa* (Tara), se siguió el procedimiento descrito por Vidal (20).

-En un envase de vidrio Ambar se colocó 1500 g de polvo del ejemplar de la vaina.

-Seguidamente, se adicionó 5000 ml de alcohol a 70° y se dejó para que se macere envuelto con papel aluminio a temperatura ambiente en un cuarto oscuro por 45 días agitando durante 10 min 3 veces al día.

-Posteriormente, se hizo la filtración con papel filtro, así eliminando material no deseado.

1.6.4.3. Determinación de la Concentración del EE de la *C. spinosa* (Tara)

Se estipuló la densidad del EE de la *C. spinosa* (Tara) Placa Petri

$$\text{vacía} = 224,62 \text{ g.}$$

Primero se consigue el peso de la Placa Petri vacía, así de esta forma se determinará el peso del EE de la *C. spinosa* (Tara).

$$\text{Placa Petri con extracto etanólico seco} = 234,47 \text{ g.}$$

Al determinar el peso la Placa Petri junto con el extracto etanólico, se hace una sustracción para definir la masa del EE de la *C. spinosa* (Tara)

$$\text{Masa} = 234,47 - 224,62 = 9,85\text{g}$$

Para determinar el volumen sabemos que se trabajó con 50mL, de esta manera sabemos que el volumen del EE de la *C. spinosa* (Tara) es de 50mL.

$$\text{Volumen} = 50\text{mL.}$$

Para poder hallar la densidad de nuestro EE de la *C. spinosa* (Tara) se empleó la siguiente fórmula, para esto requerimos los datos alcanzados con anteriormente como lo son:

$$D = \text{densidad (g/mL)}$$

$$M = \text{masa (g)}$$

$$V = \text{volumen (mL)}$$

$$M = 9,85\text{g}$$

$$V = 50 \text{ mL}$$

$$D = M/V$$

Se comienza a colocar los datos en la fórmula de modo que consigamos el resultado con g/mL

$$D = 9,85\text{g} / 50 \text{ mL}$$

$$D = 9,85\text{g} \dots\dots\dots 50\text{mL}$$

$$D = X \dots\dots\dots 1 \text{ mL}$$

$$D = 0,197 \text{ g/ml}$$

Ya obtenidos los resultados en gramos, esta tendrá que ser pasada a miligramos, realizaremos, regla de tres simples.

$$1\text{g} \dots\dots\dots 1 \text{ 000 mg}$$

$$0,197 \text{ g/mL} \dots\dots\dots x$$

$$D = 197 \text{ mg/mL}$$

Al adquirir el resultado ya en mg/ml se cambia en la unidad a trabajar la densidad.

$$197\text{mg/mL} \text{-----} 1 \text{ 000 mcl}$$

$$197\text{mg/mL} \text{-----} 1 \text{ 000 } \mu\text{l}$$

conseguimos que en 1 mL del EE de la *C. spinosa* encontramos 0,197mg/mL , que es el 100%.

Así respectivamente para el 75% será 4,4325mg, para el 50% será 2,955mg y para el 25% será 1,4775mg.

-Obtuvimos 197mg/mL de extracto etanólico siendo el 100%.

-Ya con este extracto seco se dispuso de las concentraciones de 25%, 50%, 75%.

-Posteriormente se prepararon las tres concentraciones:

- Se empleó 750 μl de EE + 250ul de agua destilada para la adquisición de una concentración al 75%

- Se empleó 500 µl de EE + 500ul de agua destilada para la adquisición de una concentración al 50%
 - Se empleó 250 µl de EE + 750ul de agua destilada para la adquisición de una concentración al 25%
- Para finalizar se pondrán en tarros estériles color ámbar debidamente etiquetado, preservándolos en la refrigeradora hasta su uso posterior. (14)

1.6.4.4. Obtención de las Cepas Bacterianas

Las cepas bacterianas estándar se obtuvieron del laboratorio de GenLab del Perú. Se empleó una cepa bacteriana estándar de colonias de *Fn* ATCC 25586 y *Pg* ATCC 3327.

1.6.4.5. Activación de las Cepas bacteriana

Para la activación de las cepas bacterianas, se siguió el método descrito por Vidal (21).

El proceso de activación de las bacterias *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 y *Porphyromona gingivalis* ATCC 3327, comenzó con la rotura del sobre que contenía las bacterias liofilizadas obtenidas de la empresa (GemLab). Posteriormente, se rompió la ampolla de activación y se agitó durante 5 minutos para garantizar la dispersión adecuada de las cepas bacterianas.

Para esto, se sembraron las cepas en placas de Agar Base Sangre, utilizando 4 placas para cada bacteria. Las placas fueron empaquetadas dentro de las jarras de anaerobiosis y luego fueron trasladadas a la incubadora a una temperatura de 37°C de *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 y *Porphyromona gingivalis*

ATCC 3327, se incubó durante 24 horas,

Se siguió el método definido por Mendo Rubio, 1995 (22).

-Inoculación en caldo BHI: Se tomó colonias de la placa con Agar sangre y con un asa bacteriológica se trasladó a un tubo de ensayo con caldo de infusión de cerebro-corazón (BHI), se incubaron a una temperatura de 37°C durante 24 horas. Este paso permitió que las bacterias se desarrollaran y se multiplicaran en un medio líquido adecuado.

-Resiembra en Agar Nutritivo: Después de 1 día de incubación en caldo BHI, se realizó una resiembra de las bacterias en agar nutritivo. Esta resiembra, se llevó a cabo en viales estériles y se incubaron a 37°C. Las colonias resultantes fueron utilizadas como células base y almacenadas para su posterior uso.

-Enfrentamiento: Para el enfrentamiento de las bacterias, se preparó un inóculo utilizando las colonias base obtenidas anteriormente. Un asa de kholle fue empapada con el inóculo preparado, que contenía ambas bacterias, y se sembró en viales de anaerobiosis para su mantenimiento. Después, se estandarizaron las colonias y se incubaron a una temperatura de 37°C durante 6 horas. Esto permitió alcanzar una concentración final de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml, que se equiparó con un tubo 0,5 en la escala de McFarland. De su crecimiento y desarrollo bajo estas condiciones controladas.

Durante el proceso de incubación, se observó que las colonias de *Fn* ATCC 25586 y *Pg* ATCC 3327, pasaron por cambios característicos en su apariencia, comenzando con colonias blanquecinas que luego se colorearon de crema. Estos cambios en la coloración de las colonias son indicativos del proceso de crecimiento y metabolismo de las bacterias en el medio de cultivo.

1.6.4.6. Evaluación de la actividad antibacteriana

Sensibilidad bacteriana método de Kirby Bauer al EE de la *C. spinosa* (Tara) frente a *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 y *Porphyromona gingivalis* ATCC 3327.

a) Preparación de los Discos de Sensibilidad:

Se siguió el procedimiento realizado por Vidal (21).

-Obtención de los discos antibióticos y EE: Se obtuvieron los discos antibióticos marca Liofilchem del distribuidor GenLab, así como el EE de *C. spinosa* en concentraciones del 100%, 75%, 50% y 25%.

-Preparación de los discos de sensibilidad: Se solicitaron un total de 54 discos de sensibilidad por bacteria, con 9 repeticiones por cada concentración de extracto etanólico. Además, se incluyeron 3 discos de clorhexidina al 0,12% como control positivo y 3 discos con agua destilada como control negativo. Los discos se dispusieron en un vaso precipitado de 100 ml con agua destilada para su desnaturalización y esterilización del antibiótico.

-Esterilización y desnaturalización: Los discos se esterilizaron en autoclave a 121°C, con una presión de 15 PSI por 15 minutos. Una vez esterilizados, se retiró el agua destilada y los discos se sometieron a calor seco a 180°C por una hora dentro del horno del laboratorio para desnaturalizar el antibiótico (imipenem). Antes de colocarlos en el horno, se separaron y apoyaron en las paredes del vaso precipitado para evitar que se adhirieran entre sí.

El efecto inhibitorio se analizó en discos empapados y anticipadamente esterilizados de 6 mm de diámetro.

b) Inoculación:

Los tubos de caldo BHI, fueron activadas con la suspensión anticipadamente estandarizada de *Fn* ATCC 25586 y *Pg*ATCC 3327 respectivamente, a una concentración de 1.5×10^8 UFC/ml, continuando el reglamento descrito por Mendo Rubio 1995 (22), después con una micropipeta de 100µl- 1000µl, se comenzó a sacar de cada tubo de ensayo 100µl de caldo BHI, inoculado con las cepas puras de la solución y se colocó en cada placa de MHA, luego con un asa Digralsky, realizando así una siembra por dispersión, se esparció en forma circular por toda la superficie del agar.

Por último, se asignaron de la siguiente forma los discos de sensibilidad sobre el medio MHA de las 36 placas:

Se asignaron los discos de sensibilidad en las 18 placas para *Fn* ATCC 25586 , siguiendo el procedimiento realizado por Vidal (21):

Se emplearon un total de 18 placas.

- Cada placa tiene 3 discos, por concentración experimental (25%, 50%, 75%, 100%).
- Además, se utilizaron 3 placas para el grupo control positivo y 3 placas para el grupo control negativo.
- Se empaparon 30 µl de EE en cada uno de los 54 discos de sensibilidad, distribuidos de la siguiente manera:
 - 9 discos para cada concentración experimental (25%, 50%, 75%, 100%).
 - 9 discos para el control positivo, impregnados con 30 µl de Clorhexidina al 0.12%.
 - 9 discos para el control negativo, impregnados con aguadestilada.

Se asignaron los discos de sensibilidad en las 18 placas para *Pg* ATCC 3327, siguiendo el procedimiento realizado por Vidal (21):

- Se emplearon un total de 18 placas.
- Cada placa tiene 3 discos por concentración experimental (25%, 50%, 75%, 100%).
- Además, se utilizaron 3 placas para el grupo control positivo y 3 placas para el grupo control negativo.
- Se empaparon 30 µl de EE en cada uno de los 54 discos de sensibilidad, distribuidos de la siguiente manera:
 - 9 discos para cada concentración experimental (25%, 50%, 75%, 100%).
 - 9 discos para el control positivo, impregnados con 30 µl de Clorhexidina al 0.12%.
 - 9 discos para el control negativo, impregnados con agua destilada.

Esta distribución permite realizar pruebas de sensibilidad antimicrobiana contra *Fn* ATCC 25586 y *Pg* ATCC 3327 utilizando diferentes concentraciones de extracto etanólico, así como los controles positivos y negativos para verificar la eficacia de los ensayos.

c) Incubación:

Para este proceso se empaquetaron las placas en papel Kraft y se trasladó a una cámara de anaerobiosis a 37°C durante 24 horas, para hacer la lectura de los resultados día siguiente.

d) Lectura:

Después de las 24 horas de incubación, se lleva a cabo la lectura de los resultados, centrándose en la medición de los halos de inhibición. El proceso se detalla de la siguiente manera:

Medición de los Halos de Inhibición:

-Se utiliza un Vernier digital con medida en milímetros para una lectura precisa.

-Se mide el diámetro obtenido por los halos de inhibición alrededor de cada disco de sensibilidad en las placas.

-Este diámetro es una indicación directa de la actividad antibacteriana del extracto etanólico sobre los microorganismos estudiados.

-Cuanto mayor sea el diámetro del halo de inhibición, mayor será la eficacia del EE en inhibir el crecimiento bacteriano.

Interpretación de los Resultados:

-Se comparan los diámetros de los halos de inhibición adquiridos con los distintos tratamientos (distintas concentraciones del EE, control positivo y control negativo).

-Se analiza la relación entre el tamaño del halo de inhibición y la concentración del extracto etanólico, para determinar la concentración más efectiva en la inhibición del crecimiento bacteriano.

Como alusión se tomó, las pautas por Duraffourd y Lapraz (23), según los halos de crecimiento:

- Sensibilidad Nula (-): menor o igual a 9 mm.
- Sensible (+): entre 9 a 14 mm.
- Muy sensible (++) : mayor 15 a 19mm.
- Sumamente sensible (+++): mayor a 20 mm.

e) Actividad Antibacteriana: Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

Para la obtención de la CMI para las respectivas bacterias se utilizó la técnica de microdilución en una microplaca de 96 pocillos en un medio caldo BHI, En una balanza analítica se pesó 2,442 g de caldo BHI sobre papel aluminio, siguiendo el protocolo dado por Vidal (21), preparando diluciones del EE de la *C. spinosa* (Tara) a distintas concentraciones, seguidamente se incorporó una suspensión microbiana constante de acuerdo al estándar de turbidez de 0,5 de Mc Farland. Fueron necesarias 4 microplacas de 96 pocillos dos por bacteria a los que se les agrego caldo BHI, EE de *C. spinosa* y microorganismos de Fn y Pg. Tomando en cuenta que la concentración inicial del extracto fue disuelta en 30 µl de volumen final, resultando en la concentración final de la solución lista para pasar la prueba de CMI. Las microplacas se llevaron a incubación a 37°C en el transcurso de 1 día. Pasadas esas 24 hrs. se observó la turbidez de las soluciones significando la presencia de microorganismos. El tratamiento sin turbidez mostró la ausencia del crecimiento bacteriano (igualando al control negativo), que se denomina Concentración Mínima Inhibitoria. (ANEXO 5,6)

f) Determinar la Concentración Mínima Bactericida (MBC)

En concreto, una gota de los pocillos que no presentaron turbidez, se transfirió 50ul de suspensión contenida y se incubaron en las mismas condiciones explicadas con anterioridad para determinar la (CMB), dando como referencia el protocolo de Mendo Rubio 1995 (22), estableciendo a qué concentración fueron inhibidos los microorganismos del inóculo inicial, pero no serán estropeados por la sustancia examinada. (19). El CMB, es considerada como la concentración más baja de la solución capaz de suprimir la bacteria. (ANEXO 5,6)

1.6.4.7. Desarrollo de la formulación del enjuague

- **Formulación de los Enjuagues Bucales**

Teniendo en cuenta el CMB hallado podemos elaborar el enjuague bucal a base del EE de la *C. spinosa (Tara)*. En la elaboración, se tuvo en cuenta las materias primas más importantes: el medio de partida adecuado (utilizaremos una solución de alcohol absoluto), el humectante (sorbitol, glicerol y texapon) y el principio activo (extracto seco solubilizado de Tara) teniendo como fundamento la formulación ejecutada en el estudio de Venancio (24) y Becerra (35).

TABLA 1.

MATERIA PRIMA	CANTIDAD UNITARIA
EXTRACO ETANOLICO DE LA TARA	
SORBITOL (4.0%)	0,2 ml.
GLICERINA (4.0%)	0,2 ml.
TEXAPON (15.0%)	1.5ml
ETANOL ABSOLUTO (100%)	1ml
AGUA PURIFICADA C.S.P	10ml

Asesoría.

Bajo la vigilancia del Biólogo Edwin Obando, que además nos orientó en la formulación del enjuague bucal. Todo este método se ejecutó en el laboratorio de biología de la Universidad Nacional “Jorge Basadre Grohmann” de Tacna.

- **Proceso de Manufactura de los Enjuagues Bucales:**

Primero hicimos una regla de tres simples para obtener la cantidad exacta del EE seco de la *C. spinosa (Tara)*. Se sabe que:

$$\begin{array}{r} 197\text{mg} \text{ ----- } 1000 \mu\text{l} \\ x \text{ } 30\mu\text{l} \\ \hline 5,91\text{mg} \end{array}$$

Porphyromona gingivalis:

$$\begin{array}{r} 30 \mu\text{l} \text{ ----- } 5,91\text{mg} \\ x \text{ ----- } 1,2148331\text{mg (CMB)} \\ \hline 6,2 \mu\text{l} \end{array}$$

Fusobacterium nucleatum:

$$\begin{array}{r}
 30 \mu\text{l} \text{-----} 5,91\text{mg} \\
 \times \text{-----} 5,7457831\text{mg (CMB)} \\
 \hline
 29,2 \mu\text{l}
 \end{array}$$

Entonces se pesaron para la cepa de *Pg* 52,90mg de EE seco de la *C. spinosa (Tara)*.

$$\begin{array}{r}
 6,2 \mu\text{l} \text{-----} 1,2148331\text{mg} \\
 270 \mu\text{l(vial)} \text{-----} \times \\
 \hline
 52,90\text{mg}
 \end{array}$$

Y para la cepa de *Fn* se pesaron 53,12mg de EE seco de la *C. spinosa (Tara)*.

$$\begin{array}{r}
 29,2 \mu\text{l} \text{-----} 5,7457831\text{mg} \\
 270 \mu\text{l (vial)} \text{-----} \times \\
 \hline
 53,12\text{mg}
 \end{array}$$

Ya teniendo las cantidades exactas de los ingredientes para la receta, mezclaremos el EE seco de la *C. spinosa (Tara)*, el texapon, glicerol y sorbitol se vibró en un equipo vortex IKA por 5 minutos y gradualmente agregaremos $\frac{3}{4}$ del disolvente el etanol-agua hasta que se disuelva por completo. Por tanto, se completó la fórmula con el restante del disolvente continuamente hasta llegar al volumen específico total en el proceso de formulación.

Luego, el enjuague bucal se encapsulo y se etiquetó en una botella adecuada.

1.6.4.8. Comparación del enjuagatorio bucal a base de *C. Spinosa* (Tara) y la clorhexidina al 0,12%

El enjuague bucal se ha aceptado durante mucho tiempo como la forma más sencilla y fácil de ayudar a la higiene bucal. Este puede ser el método principal de higiene oral en ancianos y pacientes médicamente en riesgo, donde mantener una buena higiene oral puede ser una preocupación importante. La clorhexidina (CHX) es el enjuague bucal más empleado y ha sido estimado como el estándar de oro en la práctica dental durante aproximadamente tres décadas, pero tiene algunos inconvenientes, como cambios en el gusto, cambio de color de los dientes, úlceras bucales.

Una vez obtenidos los valores de actividad antibacteriana el CMI y CMB de la Tara, se comparó con el estándar de oro que es Gluconato de clorhexidina al 0,12%, para determinar cuál es más eficaz para la actividad antibacteriana.

Para establecer la actividad antibacteriana del colutorio experimental se ejecutó un ensayo de difusión en Agar. Se dispusieron 9 placas para cada cepa bacteriana con Agar Müller-Hinton, inoculadas con 50µL de caldo cerebro-corazón (BHI, Himedia®), un medio de cultivo nutritivo que favorece el aumento bacteriano, lo que concede que las bacterias se desarrollen sobre la superficie del Agar, las placas se pusieron a secar por 10 min. Se destruyeron 30µL del colutorio experimental; empleando como solución control, clorhexidina al 0,12 % (PERIO-AID®), también para su comparación se dejó 3 placas con el enjuague bucal sin el EE de la Tara, en la misma proporción de repeticiones por cepa bacteriana. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas en un sistema GasPack para anaerobiosis. Esta incubación proporciona las condiciones óptimas para el crecimiento bacteriano.

Después de la incubación, se realizó la lectura de los halos de inhibición en las 9 placas por cepa bacteriana en total 18 placas, se midió con un compás digital (Ubermann©), para concluir el grado de sensibilidad. (25) (26).

1.6.4.9. Cromatografía

La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), es una técnica analítica poderosa que se utiliza para separar y analizar compuestos en una mezcla. Funciona mediante la interacción de los componentes, con una fase estacionaria dentro de una columna, lo que permite su separación y posterior identificación (27). Aquí hay una descripción detallada de cómo funciona y sus características distintivas:

-Principio de Funcionamiento:

En la HPLC, una muestra se introduce en un flujo continuo de solvente (fase móvil) que lleva los componentes a través de una columna rellena con un material estacionario. Los componentes de la muestra interactúan de manera diferente con la fase estacionaria y móvil, lo que resulta en su separación a medida que pasan por la columna. La velocidad de separación y el tiempo de retención de cada componente dependen de su afinidad relativa con la fase estacionaria y móvil.

-Aplicaciones:

La HPLC, es especialmente útil para el análisis de compuestos poco volátiles, iónicos y termolábiles que no son adecuados para la cromatografía de gases. Se utiliza en una amplia gama de industrias, incluyendo la farmacéutica, la alimentaria, la química y la ambiental, para el análisis de muestras complejas.

Se realizó un análisis físico-químico del EE de la *C. spinosa* (Tara), realizado en el “Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría”, de la Universidad Nacional de San Antonio Abad de Cusco - Perú, es una parte crucial para entender la composición química y las posibles propiedades medicinales de la planta. (ANEXO 7).

El análisis de Compuestos Fenólicos y Marcha Fitoquímica por el método de HPLC (Cromatografía líquida de alto rendimiento). Se examinó de manera cuantitativa, se encontró la existencia de metabolitos secundarios, como:

-Compuestos fenólicos y flavonoides: Estos compuestos son conocidos por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Su presencia en el extracto etanólico indica el potencial para actividades biológicas beneficiosas, incluida la inhibición bacteriana. Dentro de los flavonoides, se halló a la rutina y la quercitina que poseen una alta capacidad antioxidante (28).

-Triterpenos y esteroides: Son metabolitos secundarios que también pueden contribuir a las propiedades medicinales de la planta. Se han asociado con una variedad de actividades biológicas, como propiedades antiinflamatorias y antimicrobianas.

-Los taninos son compuestos fenólicos, que se ubican comúnmente en plantas y se sabe que tienen propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Su presencia en el extracto puede contribuir significativamente a sus propiedades antibacterianas.

Estos hallazgos respaldan la afirmación de que los metabolitos secundarios presentes en el extracto de Tara, podrían ser responsables de sus propiedades de inhibición bacteriana. El análisis cuantitativo realizado mediante HPLC, proporciona una comprensión más

profunda de la composición química del extracto, lo que puede ayudar a explicar su actividad antimicrobiana.

Plan de Análisis

-Luego de recolectar los datos minuciosamente de los ensayos que se han obtenido de las fichas de recolección de datos, tabularemos la data en Microsoft Excel 2016. Posteriormente los resultados se pasarán a un programa de análisis estadístico utilizando SPSS Statistics versión 22.0.

-La estadística descriptiva para cada microorganismo la actividad antimicrobiana, se describió en medias y desviación estándar,

-Para elegir la prueba estadística inferencial se tuvo que valorar la repartición de los datos obtenidos a través de la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov^a y Shapiro-Wilk, después de confirmar que hay normalidad y no hay normalidad de las variables se realizó una prueba estadística inferencial paramétrica y no paramétrica. Se elaboraron gráficos con un intervalo de confianza del 95 % y error 5 %.

-La prueba estadística inferencial paramétrica empleada fue la prueba de Análisis de la Varianza ANOVA y la prueba de Tukey para disponer la variabilidad en grupo por cada microorganismo.

Consideraciones Éticas

En este estudio se manipularon medios de cultivo, bacterias para ejecutar los ensayos correspondientes, se cumplieron con las normas éticas de bioseguridad y las buenas prácticas en los ambientes de laboratorio. Los métodos se realizaron sin que exista ninguna manipulación, en los resultados obtenidos para la credibilidad y autenticidad de nuestra investigación.

Al inicio de la investigación está supeditada a la aprobación por parte del Comité de Ética de la Escuela de la UPT con el código de aprobación de FACSA-CEI/120-09-2023, de la misma forma se gestionó la autorización para el uso de laboratorio y los equipos necesarios de los laboratorios de biología de la Universidad Nacional “Jorge Basadre Grohmann”.

III. RESULTADOS

Los resultados logrados en las distintas pruebas ejecutadas han sido reunidos en cuadros que se precisan seguidamente, se empleó el diseño completamente aleatorio por ser un diseño de sencilla distribución al azar, siendo de utilidad para técnicas y métodos de laboratorio.

Objetivo específico 1:

TABLA 2. Prueba de la actividad antibacteriana del EE de la *C. spinosa* (*Tara*) frente *Pg* ATCC 33277 y *Fn* ATCC 25586 por el método de difusión de disco (Kirby Bauer) evaluando la formación de halos de inhibición.

Especie	Diámetro (mm)	Concentraciones (%)				Control	
		25	50	75	100	+	-
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	D1	22,41	26,76	33,20	36,51	38,97	8,70
	D2	21,30	27,23	32,59	35,83	39,11	8,72
	D3	22,77	27,23	31,81	34,17	38,54	8,87
	D4	19,69	24,96	30,97	33,77	34,87	9,71
	D5	23,14	26,62	31,22	35,70	32,12	8,76
	D6	22,11	27,23	30,81	34,20	34,53	8,67
	D7	20,69	29,08	33,07	38,92	39,75	8,62
	D8	22,62	30,92	28,20	38,23	37,96	8,01
	D9	20,51	29,47	30,06	29,31	31,42	8,49
	Promedio		21,69	27,72	31,33	35,18	36,36
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	D1	<6	<6	13,18	14,64	13,21	<6
	D2	<6	<6	12,98	14,71	14,99	<6
	D3	<6	<6	13,03	14,84	15,05	<6
	D4	<6	<6	12,84	15,15	14,63	<6
	D5	<6	<6	12,89	14,56	14,22	<6
	D6	<6	<6	13,29	14,27	14,14	<6
	D7	<6	<6	13,69	14,18	13,90	<6
	D8	<6	<6	13,60	14,38	14,26	<6
	D9	<6	<6	13,30	14,88	14,76	<6
	Promedio		<6	<6	13,20	14,62	14,35

INTERPRETACIÓN:

En la tabla 2, (prueba de Kirby Bauer), se aprecia los diámetros obtenidos al enfrentar las diferentes concentraciones 25%, 50%, 75% y 100% del EE de *C. spinosa* (*Tara*), a *Fn* ATCC 25586 y *Pg* ATCC 3327; donde se tiene que los diámetros alcanzados cuando se enfrentó el extracto etanólico a *Pg* ATCC 3327, se observa una relación directamente proporcional a medida que aumenta la concentración y donde superan los 14 mm, basta que se supere los 14mm para afirmar que una bacteria es sensible frente al extracto empleado, siendo estas 21.69mm, 27.72mm, 31.33mm, 35.18mm. Por otro lado, en la misma tabla se observa los resultados de los diámetros del extracto frente a *Fn* ATCC 25586, donde se puede estimar que solo existe efecto antibacteriano, cuando se empleó concentraciones del extracto del 75% y 100% con 13,20mm y 14,62mm.

TABLA 3. Resultados estadísticos descriptivos de la actividad antibacteriana del EE de la *C. spinosa* (Tara) en diferentes concentraciones

Especie	Concentración (%)	N	Rango	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
<i>Porphyromona gingivalis</i> ATCC 33277	25	9	3,45	19,69	23,14	21,69	1,19232
	50	9	5,96	24,96	30,92	27,72	1,78961
	75	9	5,00	28,20	33,20	31,33	1,58762
	100	9	9,61	29,31	38,92	35,18	2,83234
	Control +	9	8,33	31,42	39,75	36,3633	3,18452
	Control -	9	1,70	8,01	9,71	8,7278	0,44350
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	25	9	4,00	2,00	6,00	3,8889	1,36423
	50	9	3,00	2,00	5,00	3,2222	0,97183
	75	9	,85	12,84	13,69	13,2000	0,30033
	100	9	,97	14,18	15,15	14,6233	0,31277
	Control +	9	1,84	13,21	15,05	14,3511	0,58280
	Control -	9	2,00	4,00	6,00	5,2222	0,83333

25%,50%,75%y100% frente a *Fn* ATCC 25586 y *Pg* ATCC 3327.

INTERPRETACIÓN:

En la tabla 3 se valora la distribución por estadísticos descriptivos, donde las medias de los diámetros productos del efecto antibacteriano del EE de *C. spinosa* frente a *Pg* ATCC 33277 son mayores en comparación de las medias obtenidos frente a *Fn* ATCC 25586.

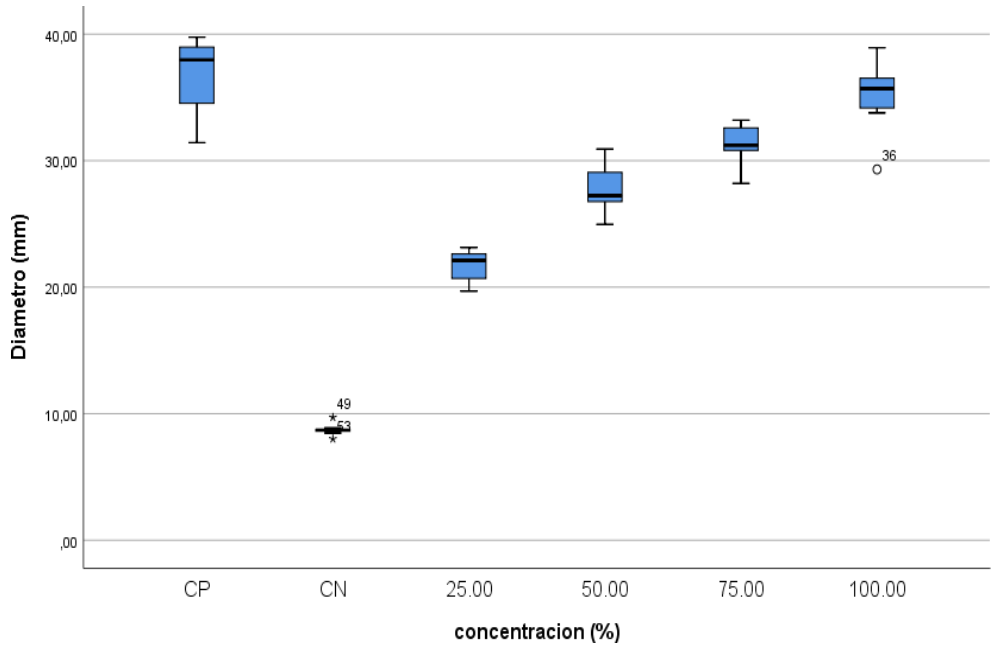


Figura 1. Diagrama de caja y bigotes de la actividad antibacteriana del EE de la *C. spinosa* (Tara) en diferentes concentraciones 25%, 50%, 75% y 100% frente a *Pg* ATCC 3327.

INTERPRETACIÓN:

En la figura 1, se valora que la distribución de los datos, productos de efecto antibacteriano del EE de *C. spinosa* frente a *Pg* ATCC 3327, sobre todo en las concentraciones por encima del 50% se encuentran muy próximos a los valores obtenidos por el control positivo.

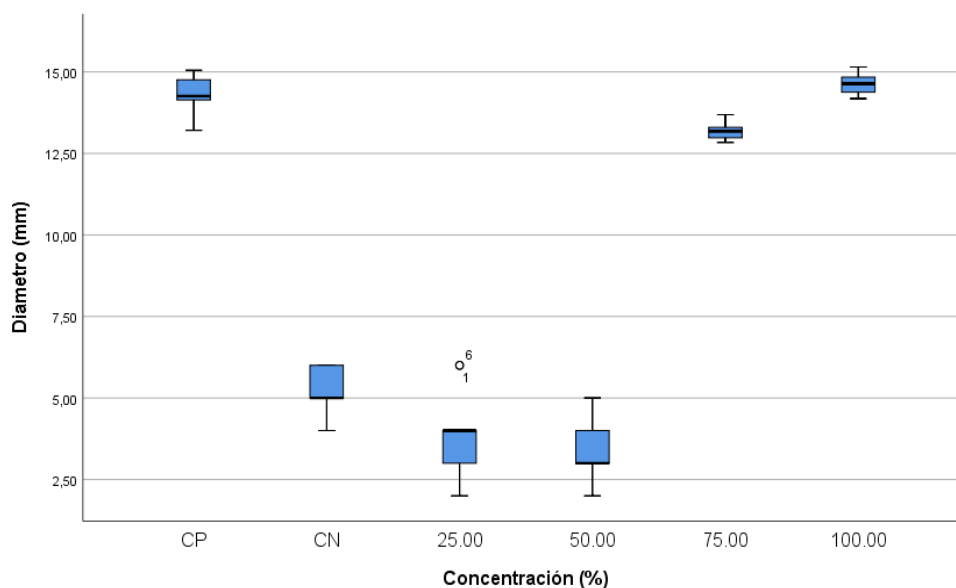


Figura 2. Diagrama de caja y bigotes de la actividad antibacteriana del EE de la *C. spinosa* (Tara) en diferentes concentraciones 25%, 50%, 75% y 100% frente a *Fn* ATCC 25586.

INTERPRETACIÓN:

En la figura 2, se valora que los datos a concentraciones del 25 y 50% están por debajo incluso del control negativo, no siendo así para las concentraciones del 75% y 100% ya que estos están muy cercanos a los valores del control positivo.

Objetivo específico 2:

Tabla 4. Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del EE de *C. spinosa* (Tara) frente a *Fn* ATCC 25586.

Ensayo	Concentración	
	mg/ml	Turbidez
A1	4.432	+
B2	4.596	+
C3	4.760	+
D4	4.924	+
E5	5.089	+
F6	5.253	+
G7	5.417	-
H8	5.581	-
I9	5.745	-
J10	5.91	-
P	Control Positivo	+
N	Control Negativo	-

Positivo (+): Indica turbidez (crecimiento bacteriano)

Negativo (-): Indica ausencia de turbidez (no crecimiento)

INTERPRETACIÓN:

En la tabla 4, se valora que a partir de la concentración **5.417 mg/ml** no se observa turbidez en los pocillos lo que indica soluciones con ausencia de microorganismos por lo que, la CMI para *Fn* ATCC 25586 es de **5.417 mg/ml**.

Tabla 5. Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del EE de *C. spinosa* (Tara) frente a *Pg* ATCC 33277.

Ensayo	Concentración	
	mg/mL	Turbidez
A1	0.295	+
B2	0.426	+
C3	0.558	+
D4	0.689	+
E5	0.820	+
F6	0.952	-
G7	1.083	-
H8	1.214	-
I9	1.346	-
J10	1.477	-
P	Control Positivo	+
N	Control Negativo	-

Positivo (+): Indica turbidez (crecimiento bacteriano)

Negativo (-): Indica ausencia de turbidez (no crecimiento)

INTERPRETACIÓN:

En la tabla 5, se valora que a partir de la concentración **0.952mg/ml** no se observa turbidez en los pocillos lo que indica soluciones con ausencia de microorganismos por lo que, la CMI para *Pg*ATCC 33277 es de **0.952mg/ml**.

Objetivo específico 3:

Tabla 6. Resultados de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del EE de la *C. spinosa* (Tara) frente a *Fn* ATCC 25586.

Especie	Tratamiento	Concentración del extracto etanólico (mg/ml)	CMB (%)
<i>Fusobacterium</i>	7	5.417	91,6
<i>nucleatum</i>	8	5.581	94,4
ATCC 25586	9	5.745	97,2

INTERPRETACIÓN:

En la tabla 6, se valora que después de tomar los pocillos 7,8, y 9 los cuales no presenta turbidez se puede observar que la CMB se halla en el pocillo número 9 cuya concentración es **5.745 mg/ml**.

Tabla 7. Resultados de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del EE de la *C. spinosa* (Tara) frente a *Pg* ATCC 33277.

Especie	Tratamiento	Concentración del extracto etanólico (mg/ml)	CMB (%)
<i>Porphyromona gingivalis</i>	6	0.952	16,1
	7	1.083	18,30
ATCC 3327	8	1.214	20,50

INTERPRETACIÓN:

En la tabla 7, se valora que luego de tomar los pocillos 6,7 y 8 los cuales no presenta turbidez se puede advertir que la CMB se halla en el pocillo número 8 cuya concentración es **1.214mg/ml**.

Objetivo específico 4:

Tabla 8. Resultados del efecto antibacteriano del enjuague bucal experimental a base de EE de *C. spinosa* (tara) con el gluconato de clorhexidina 0,12% frente a *Fn* ATCC 25586 y *Pg* ATCC 3327.

	Halo de inhibición (mm)	Enjuague bucal a base de extracto etanólico de <i>Caesalpinia spinosa</i> (tara)	Control positivo (clorhexidina 0,12%)	Control negativo (enjuague sin extracto etanólico)
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	Halo 1	25	14,35	6
	Halo 2	26	14,28	4
	Halo 3	27	14,32	4
<i>Porphyromona gingivalis</i> ATCC 3327.	Halo 1	25	36,36	6
	Halo 2	26	36,20	5
	Halo 3	27	36,30	6

INTERPRETACIÓN:

En la tabla 8, se valorar que los halos de inhibición frente a las dos bacterias puestas en prueba presentan valores similares, siendo el mínimo de 25mm y el máximo de 27mm de diámetro. Así también se visualiza que los halos de inhibición registrados por el control positivo son mayores frente a *Pg* ATCC 3327.

Tabla 9. Resultados estadísticos descriptivos del efecto antibacteriano del enjuague bucal experimental a base de EE de la *C. spinosa* (tara) con el gluconato de clorhexidina 0,12% frente a *Fn* ATCC 25586 y *Pg* ATCC 3327.

Especie	Tratamientos	N	Rango	Mínimo	Máximo	Desv.	
						Media	Desviación
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	Enjuague bucal a base de <i>Caesalpinia spinosa</i>	3	2,00	25,00	27,00	26,0000	1,00000
	gluconato de clorhexidina 0,12% (Control +)	3	,07	14,28	14,35	14,3167	,03512
	Enjuague sin extracto etanólico (control -)	3	2,00	4,00	6,00	4,6667	1,15470
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 3327	Enjuague bucal a base de <i>Caesalpinia spinosa</i>	3	2,00	25,00	27,00	26,0000	1,00000
	gluconato de clorhexidina 0,12% (Control +)	3	,16	36,20	36,36	36,2867	,08083
	Enjuague sin extracto etanólico (control -)	3	2,00	4,00	6,00	4,6667	1,15470

INTERPRETACIÓN:

En la tabla 9, se valora la distribución por estadísticos descriptivos, donde se puede observar que la media de los diámetros productos del efecto antibacteriano del EE de *C. spinosa* frente a *Fn* ATCC 25586 es mayor al que registra cuando se emplea el control positivo (gluconato de clorhexidina 0,12%), no observándose el mismo comportamiento para el caso de *Pg* ATCC 3327 ya que la media es menor cuando se empleó el enjuague bucal a base de *C. spinosa* con respecto al control positivo.

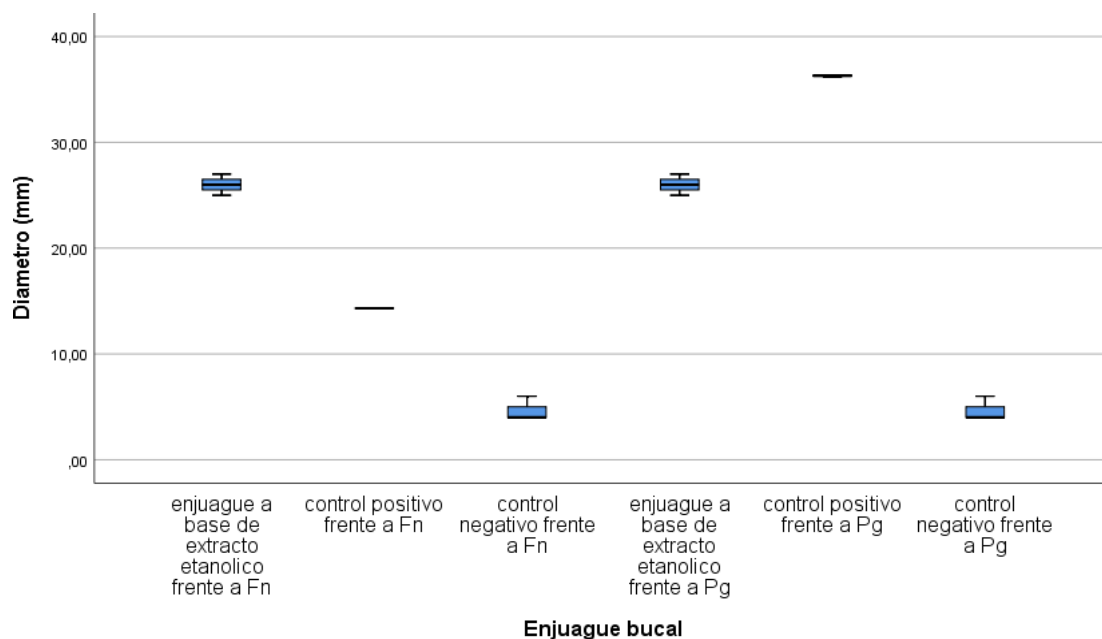


Figura 3. Diagrama de caja y bigotes del efecto antibacteriano del enjuague bucal experimental a base de *C. spinosa* (tara) con el gluconato de clorhexidina 0,12% frente a *Fn* ATCC 25586 y *Pg* ATCC 3327. Nota: *Fn*: *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586; *Pg*: *Porphyromona gingivalis* ATCC 3327.

INTERPRETACIÓN:

En la figura 3, se valora que la repartición de los datos cuando se empleó el enjuague bucal a base de *C. spinosa* (tara) frente a las 2 bacterias puestas en prueba, el cual se encuentra por encima del control positivo para el caso de *Fn* ATCC 25586 y por debajo del control positivo para el caso de *Pg* ATCC 3327.

CONTRASTE DE HIPÓTESIS:

Antes de comprobar estadísticamente nuestra hipótesis se sometió los datos de los diámetros a pruebas de normalidad para conocer el comportamiento de los datos y poder determinar el tipo de estadístico a utilizar para la comprobación de la hipótesis.

Tabla 10. Pruebas de normalidad.

	Pruebas de normalidad					
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístic			Estadístic		
	O	Gl	Sig.	o	gl	Sig.
Diámetro (mm)	0,200	18	0,06	0,870	18	0,02

a. Corrección de significación de Lilliefors

INTERPRETACIÓN:

Se aprecia en la tabla 10, según la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, por ser su p-valor mayor a 0,05, esto nos dice que los datos presentan una distribución normal, por lo que podemos emplear una estadística paramétrica, como es la prueba de ANOVA.

Tabla 11. Prueba de ANOVA.

Diámetro (mm)					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2486,825	5	497,365	638,407	,000
Dentro de Grupos	9,349	12	,779		
Total	2496,174	17			

Ho: El enjuague bucal experimental a base de la *C. Spinosa (Tara)* no presenta efecto antibacteriano frente a *Fm* ATCC 25586 y *Pg* ATCC 3327.

H1: El enjuague bucal experimental a base de la *C. Spinosa (Tara)* presenta efecto antibacteriano frente a *Fn* ATCC 25586 y *Pg* ATCC 3327.

INTERPRETACIÓN:

Se aprecia en la tabla 11, el p-valor es menor a 0,05, por lo que aceptamos la hipótesis alternativa, lo que quiere decir que el enjuague bucal a base de *C. Spinosa (Tara)* presenta efecto antibacteriano frente a *Fn* ATCC 25586 y *Pg* ATCC 3327.

Asimismo, para reafirmar entre que tratamientos existe la diferencia se realizó la prueba de Tukey.

Tabla 12. Prueba de Tukey.

HSD Tukey ^a	Diámetro (mm)				
	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
Enjuague bucal		1	2	3	4
Control negativo frente a Fn	3	4,6667			
Control negativo frente a Pg	3	4,6667			
Control positivo frente a Fn	3		14,3167		
Enjuague a base de extracto etanólico frente a Fn	3			26,0000	
Enjuague a base de extracto etanólico frente a Pg	3			26,0000	
Control positivo frente a Pg	3				36,2867
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

INTERPRETACIÓN:

Según la prueba de Tukey que se visualiza en la tabla 12, se observa que los valores de los diámetros obtenidos cuando se aplicó el extracto etanólico frente a *Fn* ATCC 25586 y *Pg* ATCC 3327 se encuentran en la columna 3 y los diámetros de los enjuagues sin el extracto etanólico se encuentran en la columna 1, por lo que podemos decir que existe diferencias entre los diámetros con y sin extracto etanólico, es así que podemos afirmar que el EE presenta efecto antibacteriano frente a *Fn* ATCC 25586 y *Pg* ATCC 3327.

IV. DISCUSIÓN

Las enfermedades periodontales, son la segunda enfermedad más prevalente en la cavidad bucal, que afecta en un 85% de la población en el Perú según el MINSA, siendo un problema de salud pública, afectando, especialmente a los sectores más pobres, según la Organización Mundial de la Salud (29). Es por ello que se han formulado diferentes alternativas para prevenir y controlar dichos padecimientos, como la fitoterapia, es decir, en el uso de plantas medicinales que puedan proporcionar tratamientos con medicina natural como alternativa evidente, de poco gasto y de fácil adquisición sin afectar el equilibrio de la microflora oral.

En el Perú, existen una diversidad de plantas con dominios terapéutico; algunas con más base científica y otras con alusiones propiamente culturales. Según Guevara (30), nos posicionamos en el primer lugar en la producción de Tara en el mercado mundial, siendo una opción terapéutica confirmando las propiedades de sus constituyentes como: analgésicas, antiinflamatorias, antibacterianas y antihemorrágicas. (31), Por lo cual se dirigió este estudio que tiene como objetivo comprobar la actividad antibacteriana de un enjuague bucal a base del EE de la *C. spinosa* (Tara) sobre cepas periodontales.

En este contexto, Huarino y Montenegro (18) (31) entre otros; quienes hallaron cantidades altas en porcentaje en las vainas de la Tara llamados (taninos) en comparación con las hojas y semillas. En este estudio, éste fue el primer procedimiento, extraer EE de *C. spinosa* “tara”, al que después se le realizó un perfil de Compuestos Fenólicos, Marcha fitoquímica y Análisis por HPLC (Cromatografía líquida de alto rendimiento). Se estudió de forma cuantitativa, se encontró en disposición metabolitos secundarios: compuestos fenólicos, flavonoides, triterpenos, esteroides, y taninos. Estos metabolitos secundarios supeditan la actividad antimicrobiana por ende las propiedades de inhibición bacteriana se asignan a estos componentes químicos.

El efecto antibacteriano del EE de *C. spinosa* (*Tara*), se puede observar en distintas concentraciones frente a *Pg ATCC 33277*, observando una relación directamente proporcional a medida que incrementa las concentraciones del extracto etanólico (25%,50%,75%,100%), encontrando mayor formación de halos de inhibición 21.69,27.72,31.33,35.18. Estos resultados son similares a los alcanzados por Huarino (17), que, en el mencionado trabajo, se evidencia que los halos de inhibición que se encontraron son superiores a los 9 mm de diámetro al mismo tiempo que incrementa la concentración del extracto alcohólico de *C. spinosa* (de 6.25 mg/mL a 75 mg/mL), obteniendo un mayor diámetro del halo de inhibición de la actividad antimicrobiana del EE de *C. spinosa*.

Como también Recines (32), concluye que al 100% del extracto de *C. spinosa* (*Tara*) en equiparación con la Clindamicina (60 mg/mL), disponen un efecto antibacteriano frente a la *Pg*; demostrando actividad antibacteriana de 24.38 mm en las 24 h, un mayor efecto a las 48 h dando una medida inhibitoria de 25.50 mm y perdurando su efecto hasta las 72 h con un promedio de 26.75 mm. Infiriendo que es superior el efecto antibacteriano a medida que incrementa la concentración.

Frente a *Fn ATCC 25586*, se puede observar que la concentración del 100% con promedio de 14.62mm y 75% con 13.20mm llevan una relación directamente proporcional al incremento de dicha concentración y el diámetro de las concentraciones del 25% ,50% y el control negativo del halo de inhibición no fue registrable. Asemajándose a Benites (33) con respecto al halo de inhibición, resulto lograr una media de 8.6 mm al 25%, 10.2 mm al 50%, obteniéndose al medir según escala de Durafford una sensibilidad límite y al 75% y al 100% una media de 17.75 mm; como se puede examinar dicha sensibilidad se logra de manera ascendente según las concentraciones administradas.

En el presente trabajo de investigación se halló el CMI del EE de la *C. spinosa* (Tara), a *Pg* ATCC 33277, registrando una concentración mínima inhibitoria al 16.1% de 0.952 mg/ml y de *Fn* ATCC 25586 al 91.6% es de 5.417mg/ml.

En cuanto al CMB del EE para la *Pg* ATCC tuvo una característica bactericida total (20,5%), al nivel de concentración de 1.214 mg/ml y para *Fn* ATCC 25586 el (97.2%) del crecimiento al nivel de concentración de 5,74mg/ml. Como Añanca (34), donde se encontró que la inhibición del crecimiento de *S. aureus* del cual la (CMI) fue de 13.7 µg/ml y la (CMB) fue de 16.25 µm/ml a base del extracto acuoso de la *C. spinosa* (Tara).

También realizamos la comparación del enjuague bucal a base del EE de la *C. spinosa* (Tara), con el el gluconato de clorhexidina al 0,12%, se pudo observar que, al comparar el efecto antibacteriano causado por el EE de la Tara y el efecto antibacteriano provocado por el gluconato de clorhexidina, observamos que estadísticamente el efecto del EE de la Tara, es mejor frente a *Fn* ATCC 25586 que la clorhexidina ya que se obtuvo diámetros de halos de inhibición mayores a 25mm y la clorhexidina menores a 14mm .

Así como también frente a *Pg* ATCC 3327, se examina que al confrontar el efecto antibacteriano causado por el EE del enjuague bucal de Tara y el efecto antibacteriano provocado por el gluconato de clorhexidina al 0,12%, observamos que los halos de inhibición del efecto del enjuague bucal a base de EE de la Tara es menor con diámetros de 25 ,26 y 27 mm y la clorhexidina con valores de 36 mm , esto nos indica que hubo efecto antibacteriano del enjuague bucal a base del EE de la Tara y de la clorhexidina al 0,12%, con respecto a las dos cepas bacterianas. Así como Díaz (35), que sus resultados sobre la cepa de *Fn*, no presentaron disimilitud estadísticamente significativa en comparación con los resultados de los halos de inhibición del EE de propóleo al 10% y, de clorhexidina al 0,12% (p=0,63). En tanto el EE de propóleo al 10%, manifestó una superior actividad antibacteriana que la clorhexidina al 0,12% (p=0,02) sobre la cepa de

Pg.

Luego de haber demostrado la presencia de efecto antibacteriano de un enjuague bucal experimental a base de EE de *C. spinosa(tara)*, sobre cepas *Pg* ATCC 3327 y *Fn* ATCC 25586n sin embargo; se tuvo algunas limitaciones como el tiempo y alcance , siendo las siguientes : Como obtener la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y la marcha fitoquímica análisis que se realizaron en la Universidad Nacional de San Antonio Abad de Cusco, teniendo dificultad para la agilidad de los resultados y para finalizar poder obtener las cepas bacterianas de *Pg* ATCC 3327 y *Fn* ATCC 25586 traídas desde Genlab ,Lima –Perú.

V.CONCLUSIONES. -

1. Se determinó la existencia del efecto antibacteriano in vitro de un enjuague bucal a base de EE de *C. spinosa*(*Tara*), sobre cepas de *Pg* ATCC 3327 y *Fn* ATCC 25586, corroborando un efecto antibacteriano positivo.
2. Se determinó el efecto antibacteriano del EE de *C. spinosa* (*Tara*), frente a *Pg* ATCC 3327, observando una relación directamente proporcional a medida que aumenta la concentración al 25%, 50%, 75%, 100%, Para *Fn* ATCC 25586 hubo resultado positivo en las concentraciones de 100% y 75%, y para las concentraciones del 25% y 50% y el control negativo el halo de inhibición, no fue registrable.
3. La concentración mínima inhibitoria (CMI) del EE de la *C. spinosa* (*Tara*), sobre *Pg* ATCC 3327 al 16.1% es de 0.952 mg/ml y para *Fn* ATCC 25586 al 91.6% es de 5.417 mg/ml.
4. La concentración mínima bactericida (CMB) del EE del *C. spinosa* (*Tara*), sobre la *Pg* ATCC al 20,5% es de 1.214 mg/ml. Y para *Fn* ATCC 25586 al 97.2% es de 5,745 mg/ml.
5. El halo de inhibición del enjuague bucal a base de EE del *C. spinosa* (*Tara*), sobre *Pg* ATCC 33277 Y *Fn* ATCC 25586 fue >25 mm (sumamente sensible) y de la de la Clorhexidina al 0,12% sobre *Pg* ATCC 33277 fue de 36.36mm y sobre *Fn* ATCC 25586 fue de 14.35mm, Siendo más eficiente que la Clorhexidina al 0,12%.

RECOMENDACIONES. -

1. Se sugiere continuar con la línea de investigación, ya que se obtuvo resultados óptimos de acción antibacteriana.
2. Se recomienda el uso de plantas medicinales en otros tratamientos odontológicos, por ser un producto natural, como la Tara, siendo el Perú el principal productor de Tara en el mundo.
3. Se recomienda extrapolar esta investigación hacia una aplicación clínica, debido a los resultados satisfactorios obtenidos, pruebas *in vivo* y clínicas para analizar el papel de la *C. spinosa* (Tara), como enjuague bucal para la práctica odontológica.
4. Se recomienda determinar la presencia de toxicidad del enjuague bucal experimental a base de EE de la *C. spinosa* (Tara) para un posterior uso clínico.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. -

1. Vinod KS, Sunil KS, Sethi P, Bandla RC, Singh S, Patel D. A novel herbal formulation versus chlorhexidine mouthwash in efficacy against oral microflora. *J Int Soc Prev Community Dent* [Internet]. 2018;8(2):184–90.
2. J, Lee C, Ko G. Oral Microbiota: Microbial biomarkers of metabolic syndrome independent of host genetic factors. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2017;7.
3. Tonetti MS, Eickholz P, Loos BG, Papapanou P, van der Velden U, Armitage G, et al. Principles in prevention of periodontal diseases: Consensus report of group 1 of the 11th European Workshop on Periodontology on effective prevention of periodontal and peri-implant diseases. *J Clin Periodontol* [Internet]. 2015;42(S16).
4. Flanagan L. y col. *Fusobacterium nucleatum* se asocia con etapas del desarrollo de neoplasia colorrectal, cáncer colorrectal y resultados de la enfermedad. [Internet]. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 2014, 33(8),1381-1390.
5. Orrego Cardozo M, Parra Gil MA, Salgado Morales YP, Muñoz Guarín E, Fandiño Henao V. *Porphyromonas gingivalis* y enfermedades sistémicas. *CES odontol.* [Internet]. 10 de agosto de 2015 [citado 26 de marzo de 2023];28(1):57-73.
6. Bornaz Acosta JG, Jiménez Sullasi LB, Bornaz Arenas VL, Mendoza Chávez M. Efecto antibacteriano in vitro de la *Caesalpinia Spinosa* (tara) en diferentes concentraciones sobre *Lactobacillus acidophilus*. *Revista Médica Basadrina* [Internet]. 2022;15(4):47–56.
7. Mariella Huarino Acho, Donald Ramos; Efecto antibacteriano de *Caesalpinia Spinosa* (Tara) sobre flora salival mixta; *Odontol. Sanmarquina* [Internet]. 2012; 15(1):27 – 30.
8. Chambi F, Chirinos R, Pedreschi R, Betalleluz-Pallardel I, Debaste F, Campos D. Potencial antioxidante de extractos polifenólicos hidrolizados de vainas de Tara (*Caesalpinia Spinosa*). *Ind Crops Prod* [Internet]. 2013; 47:168-175.
9. Rivera M y col. Vista de Efecto antimicrobiano del extracto etanólico de *Caesalpinia Spinosa* “tara” sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comparado con eritromicina. [Internet]. *Rev Med Vallejana*, marzo del 2020; 9(1): 52–5.
10. Juan Guillermo Bornaz Acosta y col, Efecto antibacteriano in vitro de *Caesalpinia Spinosa* (tara) en diferentes concentraciones sobre *Lactobacillus acidophilus*, *Revista Médica Basadrina* [Internet], diciembre 31 del 2021; Vol 15, Núm 4.
11. Shohreh Alipur y col, Preparación y elaboración de un enjuague bucal a base de

- hierbas que contiene cascara d roble, Departamento de Control de Calidad, Facultad de Farmacia, Universidad de Ciencias Médicas de Shiraz, Shiraz, Irán [Internet],2018 agosto,13(3) e13420.
12. R. Avilés,¹ J. Carrión² y col, Actividad antioxidante, polifenoles totales y contenido de taninos de extractos de tara, *Caesalpinia spinosa*. Rev. Per. Quím. Ing. Quím. Vol. 13 N.º 2, 2010. Págs. 05-11.
 13. Nuñez WJ, Quispe R, Ramos NJ, Castro AJ, Gordillo g. Actividad antioxidante y antienzimática in vitro y antiinflamatoria in vivo del extracto hidroalcohólico de caesalpinia spinosa “tara”. ciencia e investigación [internet]. 2017 aug. 2 [cited 2024 sep. 23];19(1):35-42.
 14. Aylas C ER. Evaluación de la efectividad antimicrobiana de un colutorio a base de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* Labill (Eucalipto) y *Minthostachys* sp. (Muña), frente a *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 y *Candida albicans* ATCC 10231. [Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima Perú], [Internet]. Universidad Privada Norbert Wiener; 2018, tesis de pregrado, [citado 26 de julio de 2023].
 15. Mahajan R, Kaur Khinda P, Singh Gill A, Kaur J, Saravanan SP, Shewale A, Taneja M, Joshi V. Comparación de la eficacia del gluconato de clorhexidina al 0,2 % y de los enjuagues bucales a base de hierbas sobre la placa dental: un estudio comparativo in vitro. Euro. J. Med. Plants. [Internet]. 11 de marzo de 2016 [citado el 18 de septiembre de 2024];13(2):1-11.
 16. Pachamango Leiva, V. I. Efecto antibacteriano in vitro del extracto de plantago mayor (llantén) y del perioaid® 0.12% sobre *fusobacterium nucleatum atcc 25586*, Universidad Nacional d Trujillo 2017, tesis de pregrado.
 17. Pareja-Vásquez, M., y cols, Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Caesalpinia Spinosa* sobre bacterias de la biopelícula bucal, [Internet]. Enero-Marzo 2020 Vol. 59(1).
 18. Huarino M. Efecto antibacteriana de la *Caesalpinia spinosa* (Tara) sobre la flora salival mixta. Odontología, Sanmarquina 2012;15(1):27-30, [Internet].
 19. Macedo Valdivia S, Cano Araujo D, Quispe Eduardo BA, Machaca Huancollo KY, Loayza Mamani WD, Padilla Caceres TC. Efecto in vitro de la infusión y aceite esencial de *Caesalpinia Espinosa* (TARA) sobre *Streptococcus mutans*. Revista De Investigaciones, [Internet]. 30 de junio de 2023 [citado 26 de septiembre de 2023];12(2):81- 92.
 20. Arturo Sánchez-González y Manuel González Ledesma, TÉCNICAS DE RECOLECTA DE PLANTAS Y HERBORIZACIÓN, Revista de Investigación, [Internet]. Club Universidad Autónoma de Hidalgo, cap 12.

21. Vidal J, Efecto antifúngico in vitro del extracto etanólico obtenido de vainas de *Caesalpinia spinosa* (Tara) comparado con discos de sensibilidad de nistatina, sobre un cultivo de *Candida albicans* obtenido en pacientes con diagnóstico de estomatitis subprótesis que acuden al centro de salud ciudad nueva de Tacna en el año 2020. Tesis. Perú 2021.

22. Mendo Rubio M. Lecciones de Microbiología y Medios de Cultivo. 4th ed. Lima: Ediciones Laborales S.R.L.;1995.200 p

23. Duraffourd C, Hervicourt L d', Lapraz JC. Cuadernos de fitoterapia clínica. 1st ed. Barcelona: Masson; 1987.

24. Gisely Naura Venancio y cols. Enjuague bucal a base de hierbas libidibia ferrea: control microbiológico, características sensoriales, sedimentación, pH y densidad, Rev. Odontol UNESP. [Internet]. 2015 Mar.Abr.
25. Sánchez Tito Marco, Araujo Hanco Jhener. Actividad antibacteriana de un gel experimental de *Eucalyptus globulus* Labill frente a *Porphyromonas gingivalis*. Rev cubana Invest Bioméd [Internet]. 2021 Jun [citado 2022 Oct 28]; 40(2): e1104.

26. Rivera Delgado ML, Llaque Sánchez MR del P. Efecto antimicrobiano del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* "tara" sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comparado con eritromicina. rmv [Internet]. 29 de marzo de 2020 [citado 8 de noviembre de 2023];9(1):52-5.

27. Martha Lucia Ruiz Benitez, Cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC): fundamentos y teoría. Universidad Simón Bolívar. [Internet]. Agosto 2020.

28. Sánchez Galllegos, Efecto de quercitina y la rutina frente al daño oxidativo inducido en eritrocitos con distintos contenidos de colesterol, [Internet]. tesis pregrado, Universidad de Salamanca 2009.

29. República L. Ministerio de Salud: Más del 90% de peruanos tiene caries dental [Internet]. La República.pe. 2019 [citado el 16 de octubre de 2023].

30. Guevara G José María, Guevara G Juan Carlos, Guevara D José María, Béjar Vilma, Huamán Ana, Valencia Esther. Evaluación del cocimiento de diferentes biovariedades de *Caesalpinia spinosa* (tara) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* sensibles y resistentes a oxacilina. An. Fac. med. [Internet]. 2014 Abr [citado 2024 Mar 21]; 75(2): 177-180.

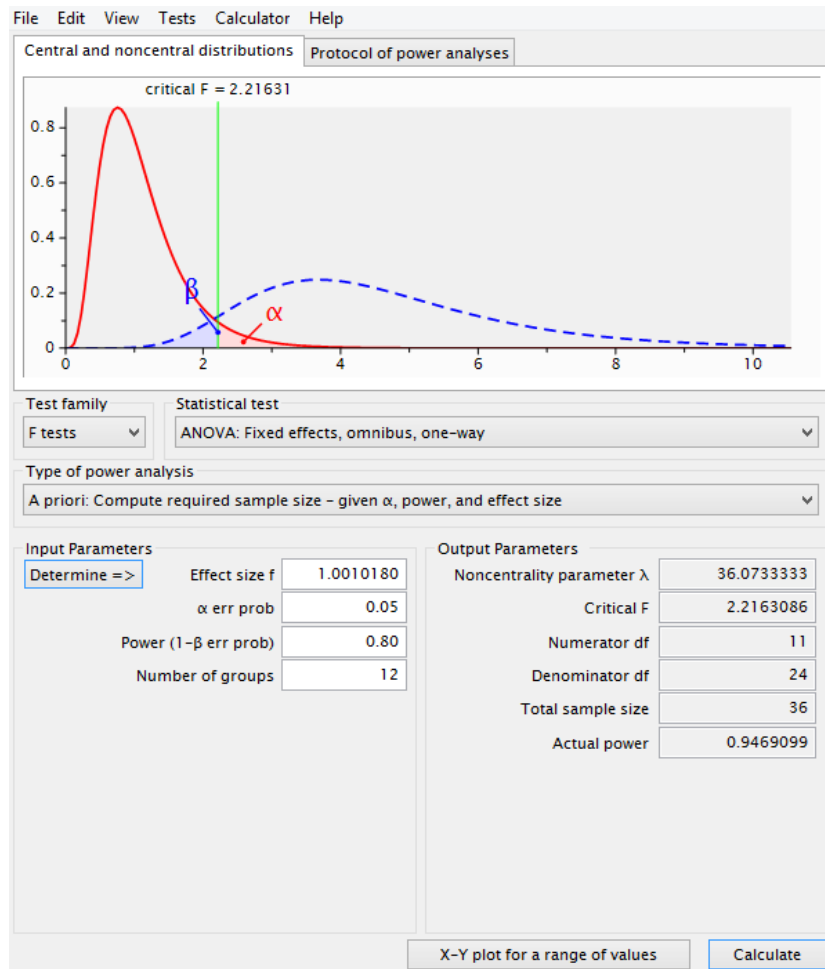
31. Alex Montenegro Chipana1, Donald Ramos Perfecto, Actividad antibacteriana de *Caesalpinia spinosa* (tara) sobre *Porphyromonas gingivalis*, Odontol. Sanmarquina

2016; 19(1): 7-11.

32. Recines S. Eficacia antibacteriana in vitro del extracto de la *Caesalpinia Spinosa* "Tara" en comparación con la Clindamicina frente a la *Porphyromona Gingivalis*. Hospital materno infantil Carlos Showing Ferrari, [Internet]. Huánuco 2018. 143 pp.
33. Benites Gómez, Christian Hernando, Efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de *caesalpinia spinosa* ("tara") sobre cepa de *candida albicans* ATCC 90028, [Internet]. tesis pregrado, UPAO,2016.
34. Añanca E. Efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso de vainas de *Caesalpinia spinosa* (tara) en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. UNJBG. [Internet]. Tacna.2009.
35. Díaz-Suyo JA, Proaño-de Casalino D. Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacteriumnucleatum* Rev Estomatol Herediana., [Internet]. Oxapampa-Perú, 2011;21(3):125-130.
36. Quiroz B, Marines L. Efecto antibacteriano in vitro de un enjuague bucal a diferentes concentraciones a base de extracto etanólico de *stevia rebaudiana* sobre el crecimiento de *streptococcus mutans* ATCC 25175. Univ Nac Trujillo.

VII. ANEXOS. -

ANEXO 1:



ANEXO 2: ANALISIS TAXONÓMICO



HERBARIO TAKANA (TKA)

Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann
Facultad de Ciencias
Ciudad Universitaria - Av. Miraflores s/n, Tacna - Perú

TKA
HERBARIO TAKANA
Facultad de Ciencias

"Año del Bicentenario, de la consolidación de nuestra Independencia, y de la conmemoración de las heroicas batallas de Junín y Ayacucho"

Constancia N° 001 – TKA- 2024

EL DIRECTOR DEL HERBARIO TAKANA (TKA) DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (hojas y fruto) colectada por **Cristell DarianValerie Esquivel Luque**, identificado con DNI N° 72220583, bachiller de la Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de odontología de la Universidad Privada de Tacna, cuya determinación taxonómica servirá para su proyecto de Tesis: "Efecto antibacteriano de un enjuague bucal experimental a base de extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (Tara) frente a *Fusobacterium nucleatum* ATCC® 25586™ y *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33271™ . Estudio in vitro", ha sido estudiada y clasificada como: *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION MAGNOLIOPHYTA

CLASE MAGNOLIOPSIDA

SUBORDEN ROSIDAE

ORDEN FABALES

FAMILIA FABACEAE

GENERO *Caesalpinia*

ESPECIE *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze

Nombre vulgar: "Tara"

Determinado por: Bach. Cs. Biol. Javier Máximo Ignacio Apaza

Se expide la presente Constancia a solicitud de la parte interesada para los fines que hubiera lugar.

Tacna, 16 de enero del 2024



D. PABLO JUAN FRANCO LEON
Director del Herbario (TKA)

cc: Herbario TKA

ANEXO 3: FICHAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

BACTERIA: PORPHYROMONA GINGIVALIS	EXTRACTO ETANOLICO – CAESALPINIA SPINOSA					GRUPO CONTROL	
	CONCENTRACION	25%	50%	75%	100%	Clorhexidina al 0.12%	-
	VOLUMEN (uL)	30 uL	30 uL	30 uL	30 uL	30 uL	-
DISO 1	HALOS mm						-
DISO 2	HALOS mm						
DISO 3	HALOS mm						
DISO 4	HALOS mm						
DISO 5	HALOS mm						
DISO 6	HALOS mm						
DISO 7	HALOS mm						
DISO 8	HALOS mm						
DISCO 9	HALOS mm						
PROMEDIO FINAL							-

BACTERIA: PORPHYROMONA GINGIVALIS	EXTRACTO ETANOLICO – CAESALPINIA SPINOSA					GRUPO CONTROL	
	CONCENTRACION	25%	50%	75%	100%	Clorhexidina al 0.12%	-
	VOLUMEN (uL)	30 uL	30 uL	30 uL	30 uL	30 uL	-
DISO 1	HALOS mm	22,41	26,76	33,20	36,51	38,97	-
DISO 2	HALOS mm	21,30	27,23	32,59	35,89	39,11	
DISO 3	HALOS mm	22,77	27,23	31,81	34,17	38,54	
DISO 4	HALOS mm	19,69	24,96	30,97	33,77	34,87	
DISO 5	HALOS mm	23,14	26,62	31,22	35,70	32,12	
DISO 6	HALOS mm	22,11	27,23	30,81	34,20	34,53	
DISO 7	HALOS mm	20,69	29,08	33,07	38,92	39,75	
DISO 8	HALOS mm	22,62	30,92	28,20	38,23	37,96	
DISCO 9	HALOS mm	20,51	29,47	30,06	29,31	31,42,	
PROMEDIO FINAL		195,24	249,50	281,92	316,64	327,27	-

ANEXO 4: FICHAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

BACTERIA: FUSOBACTERIUM NUCLEATUM	EXTRACTO ETANOLICO – CAESALPINIA SPINOSA					GRUPO CONTROL	
	CONCENTRACION	25%	50%	75%	100%	Clorhexidina al 0.12%	-
	VOLUMEN (uL)	30 uL	30 uL	30 uL	30 uL	30 uL	-
DISO 1	HALOS mm						-
DISO 2	HALOS mm						
DISO 3	HALOS mm						
DISO 4	HALOS mm						
DISO 5	HALOS mm						
DISO 6	HALOS mm						
DISO 7	HALOS mm						
DISO 8	HALOS mm						
DISCO 9	HALOS mm						
PROMEDIO FINAL							-

BACTERIA: FUSOBACTERIUM NUCLEATUM	EXTRACTO ETANOLICO – CAESALPINIA SPINOSA					GRUPO CONTROL	
	CONCENTRACION	25%	50%	75%	100%	Clorhexidina al 0.12%	-
	VOLUMEN (uL)	30 uL	30 uL	30 uL	30 uL	30 uL	-
DISO 1	HALOS mm	<6	<6	13,18	14,64	13,21	-
DISO 2	HALOS mm	<6	<6	12,98	14,71	14,99	
DISO 3	HALOS mm	<6	<6	13,03	14,84	15,05	
DISO 4	HALOS mm	<6	<6	12,84	15,15	14,63	
DISO 5	HALOS mm	<6	<6	12,89	14,56	14,22	
DISO 6	HALOS mm	<6	<6	13,29	14,27	14,14	
DISO 7	HALOS mm	<6	<6	13,69	14,18	13,90	
DISO 8	HALOS mm	<6	<6	13,60	14,38	14,26	
DISCO 9	HALOS mm	<6	<6	13,30	14,88	14,75	
PROMEDIO FINAL		<6	<6	119,80	131,61	129,16	-

ANEXO 5:

CUADRO DE CONCENTRACIONES Y VOLUMENES PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB)

BACTERIA: PORPHYROMONAS GINGIVALIS						
MICROPLACA	CONCENTRACIÓN (mg/mL)	VOLUMEN (μL)	PORCENTAJE (%)	10% DEL VOLUMEN TOTAL DE BACTERIAS (μL)	CALDO BHI (μL)	VOLUMEN TOTAL (μL)
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
+						
-						

BACTERIA: PORPHYROMONAS GINGIVALIS						
MICROPLACA	CONCENTRACIÓN (mg/mL)	VOLUMEN (μL)	PORCENTAJE (%)	10% DEL VOLUMEN TOTAL DE BACTERIAS (μL)	CALDO BHI (μL)	VOLUMEN TOTAL (μL)
1	4,4325	22,44	75	30	275,5	300
2	4,5966666	23,28	94,5	30	246,7	300
3	4,7608332	24,12	88,5	30	245,8	300
4	4,9249998	24,96	83,3	30	245,04	300
5	5,0891664	25,8	86,1	30	244,2	300
6	5,253333	26,64	88,8	30	243,3	300
7	5,41744996	27,48	91,6	30	242,5	300
8	5,5816165	28,32	94,4	30	241,6	300
9	5,7457831	29,16	97,2	30	240,8	300
10	5,91	30	100	30	240	300
+	-	-	-	30	270	300
-	-	-	-	-	300	300

ANEXO 6:

**CUADRO DE CONCENTRACIONES Y VOLUMENES PARA DETERMINAR LA
CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y CONCENTRACIÓN
MÍNIMA BACTERICIDA (CMB)**

BACTERIA: FUSOBACTERIUM NUCLEATUM						
MICROPLACA	CONCENTRACIÓN (mg/mL)	VOLUMEN (μL)	PORCENTAJE (%)	10% DEL VOLUMEN TOTAL DE BACTERIAS (μL)	CALDO BHI (μL)	VOLUMEN TOTAL (μL)
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
+						
-						

BACTERIA: FUSOBACTERIUM NUCLEATUM						
MICROPLACA	CONCENTRACIÓN (mg/m L)	VOLUMEN (μL)	PORCENTAJE (%)	10% DEL VOLUMEN TOTAL DE BACTERIAS (μL)	CALDO BHI (μL)	VOLUMEN TOTAL (μL)
1	0,2955	5,87	5	30	264,1	300
2	0,4268333	8,48	7,22	30	261,5	300
3	0,5591666	11,1	9,44	30	258,9	300
4	0,6894999	13,8	11,6	30	256,2	300
5	0,8208332	16,5	14,3	30	252,5	300
6	0,95211665	19,2	16,1	30	250,8	300
7	1,0834998	21,9	18,3	30	248,1	300
8	1,2148331	24,6	20,5	30	245,4	300
9	1,3461661	27,3	22,7	30	240,7	300
10	1,4775	30	25	30	240	300
+	-	-	-	30	270	300
-	-	-	-	-	300	300

ANEXO 7: RESULTADOS DE LABORATORIO



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
 FACULTAD DE CIENCIAS
 LABORATORIO DE CROMATOGRAFIA Y ESPECTROMETRIA – Pabellón de Control de Calidad
 AV. De la Cultura 733 CUSCO-PERÚ Contacto 973868855

RESULTADOS

Cusco 11 de Diciembre 2023⁻⁵³

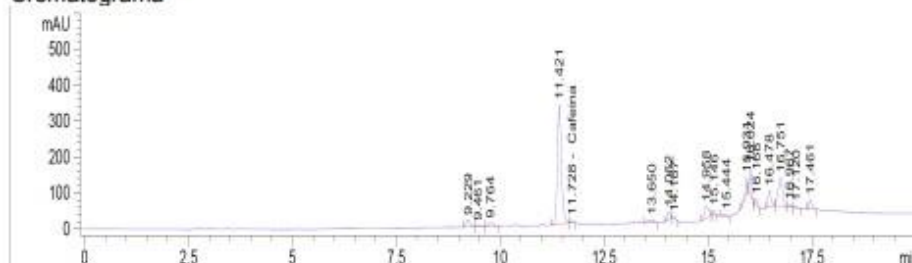
Solicitante : Valerie Esquivel Luque
 Tipo de Análisis : Compuestos Fenolicos y Marcha fitoquímica
 Método : Cromatografía Líquida HPLC y Reacciones a la gota
 Tipo de Muestras : Extracto etanolico de Tara
 Cantidad de Muestra : 1 Tubo falcons conteniendo 15 mL aproximadamente
 Almacenamiento : 4 °C.


Extracto etanolico de Tara	TR min	Repeticiones			Promedio
		1	2	3	Acido Clorogenico mg/100 gr
Acido Clorogenico	11.456	66.56	66.99	67.12	66.89
Rutina	15.764	3.10	3.06	2.95	3.04
Quercetina	18.920	0.26	0.26	0.27	0.26
Total Fenolicos		109.69	109.83	108.62	109.38

TR = Tiempo de retencion en minutos (cromatograma)

Nota: Se ha identificado el acido Clorogenico, Rutina y Quercetina mediante la comparación de los espectros UV de las señales de la muestra con la base de datos de espectros UV, la determinación se realizó mediante una curva de calibración del estándar de Ácido Clorogenico, el contenido total de los otros compuestos fenolicos se reporta como los equivalentes en miligramos de Ácido Clorogenico presentes en 100 mililitros de muestra.

Cromatograma




 Químico, Jorge Chiquenaira Pari
 Analista del Laboratorio de Cromatografía y
 Espectrometría – UNSAAC.
 CQP - 914



RESULTADOS


Condiciones de Análisis por HPLC

Cromatógrafo:	Agilent serie 1200
Software:	Chemstation V03.02
Columna:	Zorbax Eclipse XDB-C18, 4.6 x 150mm, 5µm
Pre Columna:	Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6d x 12.5 mm x 5µm
Flujo de Columna:	0.6 ml/min.
Solvente A:	H ₃ PO ₄ 0.1%
Solvente B:	Acetonitrilo
Sistema de Análisis:	Inicio 5 % de B, 10 min 20% de B, a 14 min 40% de B, a 18 min 50% de B, de 18 a 20 min 100% de B
Detección DAD:	285, 330, 370 nm
Temperatura del Horno:	40.0°C
Tiempo de Análisis:	20 min.
Volumen de Inyección:	1.0 µl

Referencia Consultada

1. Ivanescu, B., Vlase, L., Corciova, A., & Lazar, M. I. (2010). HPLC-DAD-MS study of polyphenols from *Artemisia absinthium*, *A. annua*, and *A. vulgaris*. *Chemistry of Natural Compounds*, 46(3), 468-470.
2. Justesen, U., Knuthsen, P., & Leth, T. (1998). Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 799(1), 101-110. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)01061-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01061-3)
3. Sakakibara H, Honda Y, Nakagawa S, Ashida H, Kanazawa K. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *J Agric Food Chem*. 2003 Jan 29;51(3):571-81.
4. Vrchotová, N & Sera, Božena & Triska, Jan. (2007). The stilbene and catechin content of the spring sprouts of *Reynoutria* species. *ACTA Chromatographica*. 19.
5. Wang, L.H., and Li, W.H., 2007. General method for determining flavonoids in medicinal plants and raw cosmetics using HPLC with a photodiode array detector, *Pharm. Chem. J.*, 41, 225–231




Químico Jorge Chequenaira Pari
Analista del Laboratorio de Cromatografía y
Espectrometría – UNSAAC.
CQP - 914



RESULTADOS

Marcha Fitoquímica

Ensayo	Prueba	Extracto etanolico de semillas de Tara
Compuestos Fenólicos	FeCl ₃	+++
Flavonoides	Shinoda	+++
Alcaloides	Dragendorff	-
Triterpenos y Esteroides	Liebermann Burchard	+
Saponinas	Espuma	-
Taninos	Gelatina	+++
Quinonas	Bontrager	-

Abundante = +++, Poco = ++, Muy Poco = +, Ausente = -


Nota:

El ensayo fitoquímico realizado al extracto consistió en reacciones de coloración y/o precipitación, en el que se evaluó la presencia o ausencia de metabolitos secundarios

Referencia

- Lock de Ugaz O. 1994. "Investigación Fitoquímica Métodos en el estudio en los productos naturales" Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima.




Químico. Jorge Choquenaira Pari
Analista del Laboratorio de Cromatografía y
Espectrometría - UNSAAC.
CQP - 914

ANEXO 8: GALERÍA DE FOTOGRAFÍAS DEL ESTUDIO



Acopio de las vainas de la *C. spinosa* (*Tara*) de la ciudad de Tacna, trasladada en papel kraft y almacenada en un cuarto oscuro.



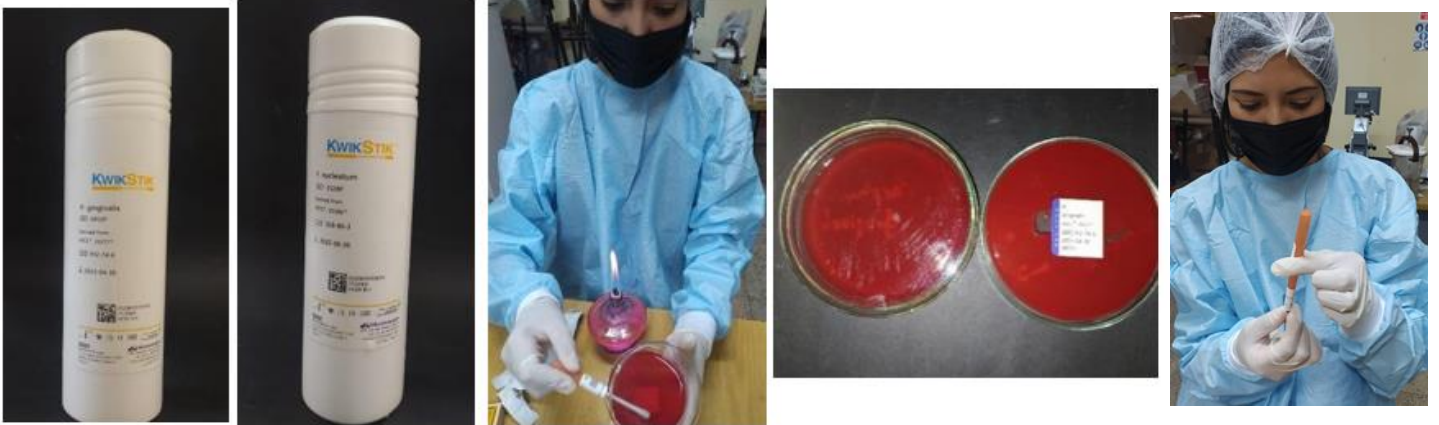
Las vainas de la *C. spinosa* (*Tara*) se situaron sobre un papel kraft y serán sujetas a secado en estufa a una T° de 40 °C. por 48h. Seguidamente, se escogieron las vainas para ser pulverizadas en una licuadora(Oster). Posteriormente el resultado se destinó en frasco de vidrio color ámbar.



Procesamiento del extracto etanólico de la *C. spinosa* (Tara)



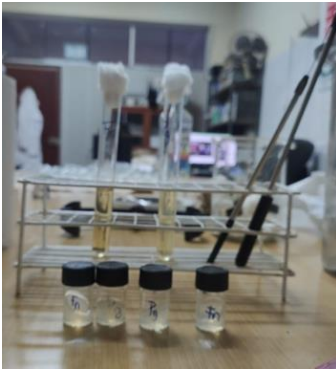
Medios de cultivo utilizados



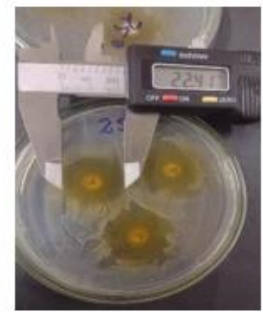
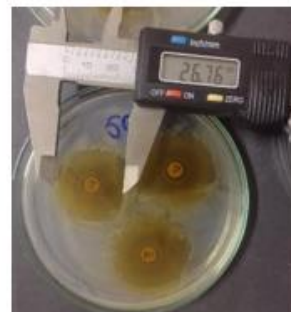
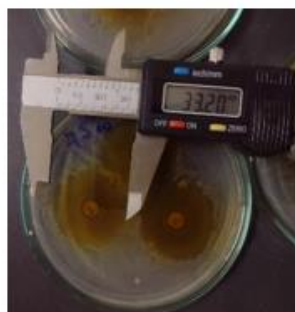
Activación de las cepas bacterianas de *Pg ATCC 3327* y *Fn ATCC 25586*



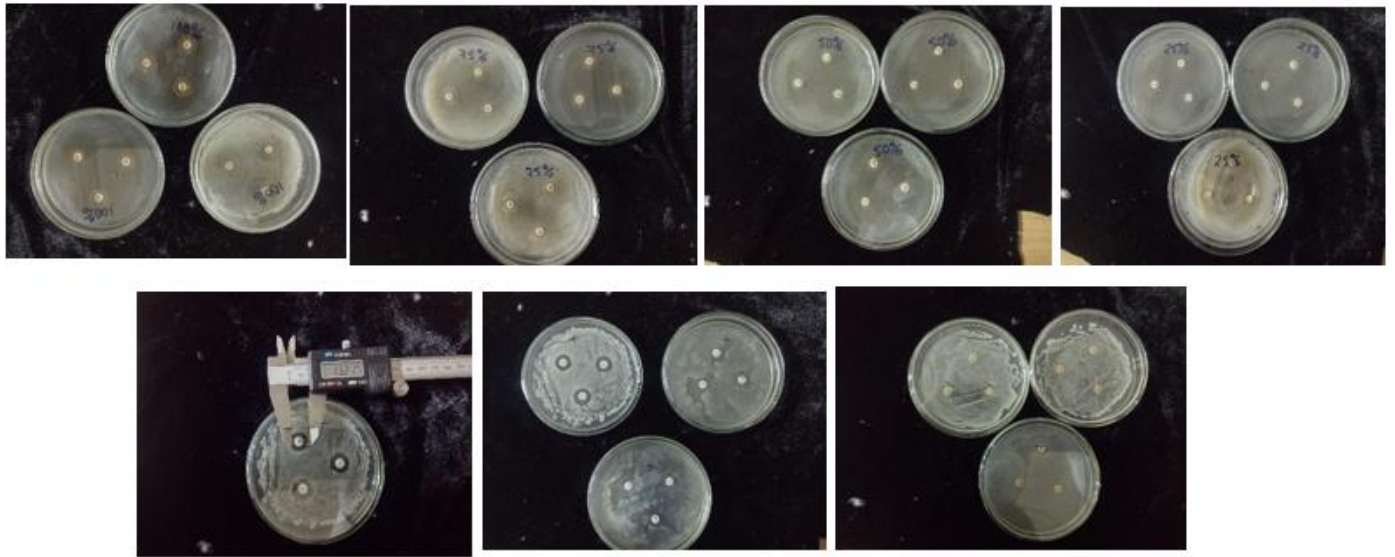
Cultivo por Anaerobiosis y uso de la jarra de anaerobiosis



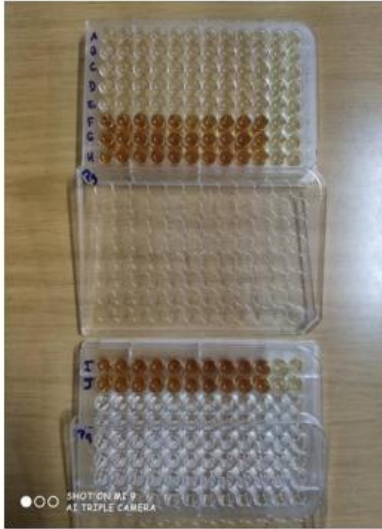
Inoculación de las cepas de *Pg ATCC 3327* y *Fn ATCC 25586* durante 24 h y después en anaerobiosis hasta que la turbidez coincida con la escala de Mc Farland.



Halos representativos de la sensibilidad de *Pg (ATCC 3327)* frente al EE de *C. spinosa (Tara)*.

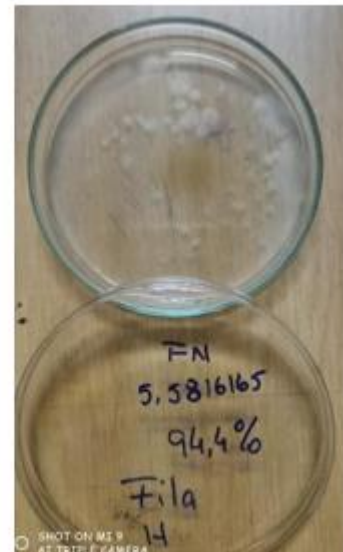
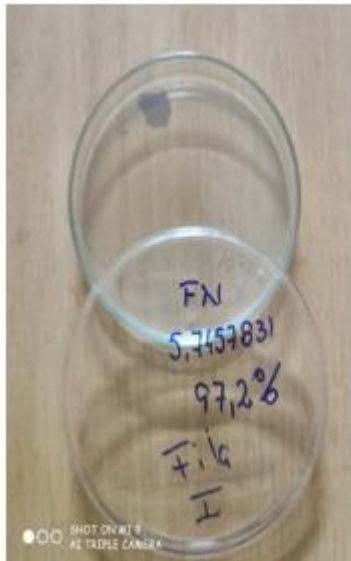


Halos representativos de la sensibilidad de *Fn* (ATCC 25586) frente al EE de *C. spinosa* (Tara).



Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de la *C. spinosa* (*Tara*) frente a cepas bacterianas de

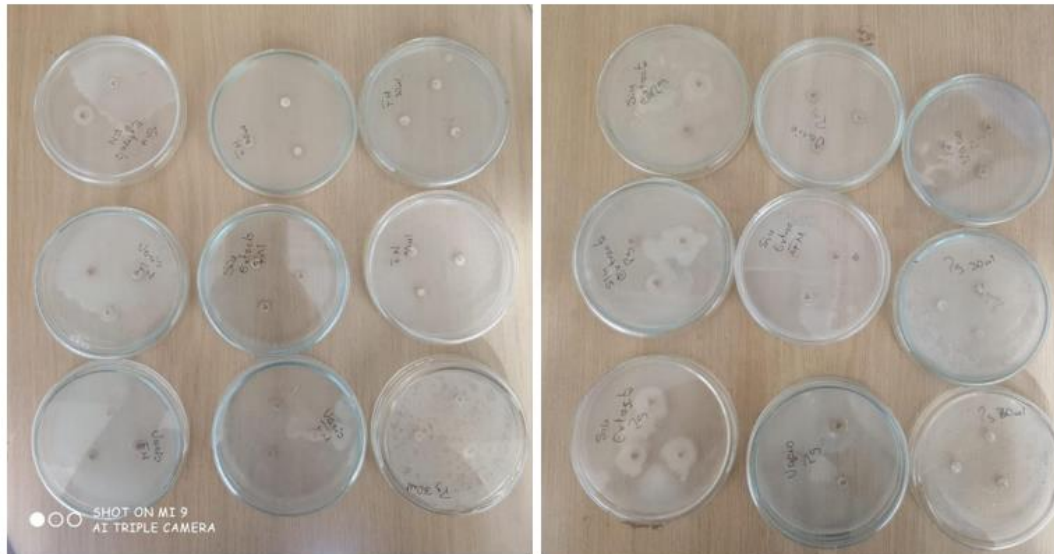
Pg ATCC 3327 y *Fn* ATCC 25586



Unidades formadoras de colonias representativas de la prueba de CMB



Enjuague a base del EE de la *C. spinosa* (*Tara*) elaborado a partir del CMB



Efecto inhibitorio del enjuague a base del EE de la *C. spinosa* (*Tara*).