



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA

Efecto antibacteriano *in vitro* de diferentes concentraciones del extracto alcohólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) sobre *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis*

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

Cirujano Dentista

AUTOR:

Torres Pacheco, Rozier (orcid.org/0000-0002-5475-0961)

ASESOR:

Dr. Ruiz Barrueto, Miguel Angel (orcid.org/0000-0002-3373-4671)

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Enfermedades Infecciosas y Transmisibles

LÍNEA DE RESPONSABILIDAD SOCIAL UNIVERSITARIA:

Promoción de la salud, nutrición y salud alimentaria

PIURA – PERÚ

(2023)

DEDICATORIA

A Dios por la vida y por conducirme en el camino del bien y permitirme siempre tomar buenas decisiones.

A mis padres porque me enseñaron a seguir adelante a pesar de las dificultades.

A los docentes que me alentaron para mejorar día a día académicamente y que contribuyeron grandemente en mi formación profesional.

AGRADECIMIENTO

A mi asesor Dr. Miguel Angel Ruíz Barrueto por su importante apoyo, orientación y por brindarme los conocimientos necesarios para la ejecución de esta investigación y gracias a su apoyo lograr las metas propuestas.

DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD DEL ASESOR



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA**

Declaratoria de Autenticidad del Asesor

Yo, RUIZ BARRUETO MIGUEL ANGEL, docente de la FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD de la escuela profesional de ESTOMATOLOGÍA de la UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO SAC - PIURA, asesor de Tesis titulada: "Efecto antibacteriano in vitro de diferentes concentraciones del extracto alcohólico de Eucalyptus globulus (eucalipto) sobre Fusobacterium nucleatum y Porphyromonas gingivalis.", cuyo autor es TORRES PACHECO ROZIER, constato que la investigación tiene un índice de similitud de 20.00%, verificable en el reporte de originalidad del programa Turnitin, el cual ha sido realizado sin filtros, ni exclusiones.

He revisado dicho reporte y concluyo que cada una de las coincidencias detectadas no constituyen plagio. A mi leal saber y entender la Tesis cumple con todas las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad César Vallejo.

En tal sentido, asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada, por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas vigentes de la Universidad César Vallejo.

PIURA, 14 de Diciembre del 2023

Apellidos y Nombres del Asesor:	Firma
MIGUEL ANGEL RUIZ BARRUETO DNI: 42814146 ORCID: 0000-0002-3373-4671	Firmado electrónicamente por: MARUIZB el 26-12- 2023 09:41:12

Código documento Trilce: TRI - 0696452



DECLARATORIA DE ORIGINALIDAD DEL AUTOR



Declaratoria de Originalidad del Autor

Yo, Torres Pacheco Rozier, egresado de la Facultad de Ciencias de la Salud y Escuela Profesional de Estomatología de la Universidad César Vallejo campus Piura, declaro bajo juramento que todos los datos e información que acompañan la tesis: "Efecto antibacteriano *in vitro* de diferentes concentraciones del extracto alcohólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) sobre *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis*", es de mi autoría, por lo tanto, declaro que la tesis:

1. No ha sido plagiado ni total, ni parcialmente.
2. He mencionado todas las fuentes empleadas, identificando correctamente toda cita textual o de paráfrasis proveniente de otras fuentes.
3. No ha sido publicado ni presentado anteriormente para la obtención de otro grado académico o título profesional.
4. Los datos presentados en los resultados no han sido falseados, ni duplicados, ni copiados.



En tal sentido asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada, por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas vigentes de la Universidad César Vallejo.

Piura, 04 de diciembre de 2023.

Torres Pacheco Rozier	
DNI: 43792484	Firma 
ORCID: 0000-0002-5475-0961	

Índice de contenidos

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD DEL ASESOR	iv
DECLARATORIA DE ORIGINALIDAD DEL AUTOR / AUTORES	v
Índice de contenidos	vi
Índice de tablas	vii
Índice de gráficos y figuras.....	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	5
III. METODOLOGÍA.....	17
3.1. Tipo y diseño de investigación.....	17
3.2. Variables y operacionalización	17
3.3. Población, muestra y muestreo	18
3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	19
3.5. Procedimientos	19
3.6. Método de análisis de datos	21
3.7. Aspectos éticos.....	22
IV. RESULTADOS	23
V. DISCUSIÓN.....	26
VI. CONCLUSIONES.....	31
VII. RECOMENDACIONES	32
REFERENCIAS.....	33
ANEXOS	47

Índice de tablas

Tabla 1. Comparación del efecto antibacteriano in vitro de diferentes concentraciones del extracto alcohólico de <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto) sobre <i>Fusobacterium nucleatum</i> y <i>Porphyromonas gingivalis</i> por el método de difusión en disco.	23
Tabla 2. Determinación in vitro de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto alcohólico de <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto) sobre <i>Fusobacterium nucleatum</i> y <i>Porphyromonas gingivalis</i> por el método de microdilución.	24
Tabla 3. Determinar in vitro la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto alcohólico de <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto) sobre <i>Fusobacterium nucleatum</i> y <i>Porphyromonas gingivalis</i>	25

Índice de gráficos y figuras

Gráfico 1. Gráfico de medias.....	61
Gráfico 2. Gráfico de dispersión.....	62

RESUMEN

Introducción: La placa dental y patógenos como *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis* propician el progreso de la enfermedad periodontal. La búsqueda de nuevos antimicrobianos eficientes y seguros ha llevado al uso de plantas medicinales entre las que destaca *Eucalyptus globulus*.

Objetivo: comparar el efecto antibacteriano *in vitro* de diferentes concentraciones del extracto alcohólico de *E. globulus* (eucalipto) sobre *F. nucleatum* y *P. gingivalis* con un control positivo clorhexidina 0,12%.

Metodología: Fue una investigación básica con diseño experimental. Se evaluó el efecto antibacteriano de diferentes concentraciones del extracto alcohólico de eucalipto sobre *F. nucleatum* y *P. gingivalis* mediante el método de discodifusión. El control positivo fue clorhexidina 0,12% y el control negativo fue DMSO 1%. La CMI y CMB se determinaron por el método de microdilución.

Resultados: Se reportó que, las concentraciones de 30, 40 y 50 mg/mL formaron halos de inhibición promedio de 24.99 ± 0.535 mm, 27.90 ± 0.872 mm y 32.10 ± 0.430 mm, respectivamente sobre *F. nucleatum*. Superando al control positivo que tuvo una inhibición promedio de $24,98 \pm 0,922$ mm. Respecto a *P. gingivalis*, los halos de inhibición fluctuaron entre $21,19 \pm 0,803$ mm (10 mg/mL) y 33.19 ± 0.724 mm (50 mg/mL). La CMI fue 10 mg/mL para ambas bacterias. Sin embargo, la CMB fue 30 mg/mL para *F. nucleatum* y de 10 mg/mL para *P. gingivalis*.

Conclusión: El extracto alcohólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) posee efecto antibacteriano *in vitro* sobre *F. nucleatum* y *P. gingivalis* que superan al control clorhexidina 0,12%.

Palabras clave: Fitoterapia, plantas medicinales, antibacteriano, medicina herbaria, bacteria, periodontitis.

ABSTRACT

Introduction: Dental plaque and pathogens such as *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis* promote the progression of periodontal disease. The search for new efficient and safe antimicrobials has led to the use of medicinal plants, among which *Eucalyptus globulus* stands out.

Objective: to compare the in vitro antibacterial effect of different concentrations of the alcoholic extract of *E. globulus* (eucalyptus) on *F. nucleatum* and *P. gingivalis* with a positive control chlorhexidine 0.12%.

Methodology: It was a basic research with experimental design. The antibacterial effect of different concentrations of the alcoholic extract of eucalyptus on *F. nucleatum* and *P. gingivalis* was evaluated using the discodiffusion method. The positive control was 0.12% chlorhexidine and the negative control was 1% DMSO. The MIC and MBC were determined by the microdilution method.

Results: It was reported that concentrations of 30, 40 and 50 mg/mL formed average inhibition zones of 24.99 ± 0.535 mm, 27.90 ± 0.872 mm and 32.10 ± 0.430 mm, respectively on *F. nucleatum*. Outperforming the positive control that had an average inhibition of 24.98 ± 0.922 mm. Regarding *P. gingivalis*, the inhibition zones fluctuated between 21.19 ± 0.803 mm (10 mg/mL) and 33.19 ± 0.724 mm (50 mg/mL). The MIC was 10 mg/mL for both bacteria. However, the MBC was 30 mg/mL for *F. nucleatum* and 10 mg/mL for *P. gingivalis*.

Conclusion: The alcoholic extract of *Eucalyptus globulus* (eucalyptus) has an in vitro antibacterial effect on *F. nucleatum* and *P. gingivalis* that surpasses the 0.12% chlorhexidine control.

Keywords: Phytotherapy, medicinal plants, antibacterial, herbal medicine, bacteria, periodontitis

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal es una afección inflamatoria que causa daño irreversible en los tejidos de sostén del diente. Se produce debido al desequilibrio en el microbioma oral, y afecta a aproximadamente del 20 al 50% de la población mundial. Esta condición se caracteriza por inflamación de los tejidos gingivales debido a la formación de placa dental subgingival, sangrado al sondaje, cambios en la consistencia y forma de las encías, afectando significativamente la capacidad y el estilo de vida de las personas que tienen esta condición.¹

De acuerdo con *Global Burden of Disease Study*, la enfermedad periodontal es la 11ª patología más común a nivel mundial. Se proyecta que en los próximos años esta enfermedad aumentará su prevalencia a nivel global, incrementando también el edentulismo, lo que tendrá un impacto significativo negativo en la calidad de vida y salud de las personas pues esta condición dificulta la alimentación ocasionando alteraciones nutricionales, afecta el habla, y provoca problemas estéticos, psicológicos y sociales para el individuo.^{2,3}

Los originales factores asociados al inicio y progreso de la enfermedad periodontal son las especies bacterianas *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* y *Porphyromonas gingivalis*. Estos microorganismos patógenos durante su colonización producen diversas toxinas y enzimas que desencadenan el proceso inflamatorio gingival al activar un método diferente del complemento, e inducir respuestas a los macrófagos que al liberan citocinas y lípidos que contribuyen a la reabsorción ósea. *P. gingivalis*, una bacteria de tipo Gram-negativo, se caracteriza por su forma de bastón y su capacidad anaerobia es capaz de formar colonias negras en agar sangre, *P. intermedia* son bacilos anaerobios gramnegativos conocidos como "bacterias pigmentadas negras", requieren hemina y menadiona para su crecimiento.^{4,5}

Para hacer frente a la enfermedad periodontal, el cirujano dentista puede prescribir el uso de antibióticos y/o antisépticos químicos como la clorhexidina. Como se sabe, el uso inadecuado de antibióticos o sustancias sintéticas para hacer frente a agentes infecciosos trae consigo otro problema mayor que es el incremento de la resistencia microbiana a los medicamentos de uso convencional. La resistencia es un mecanismo de supervivencia utilizado por los

microorganismos para hacer frente a los antimicrobianos. Este fenómeno se manifiesta mediante la disminución de la eficacia de los fármacos en inhibir o destruir a dichos microorganismos.

Lamentablemente, el problema de la resistencia está creciendo a un ritmo más rápido que el desarrollo de nuevos medicamentos y estrategias de prevención. Como resultado, estamos experimentando un aumento en el fracaso de los tratamientos de enfermedades infecciosas, así como en la morbilidad y los costos asociados. Por ello, diversas organizaciones como la OMS promueven la búsqueda de nuevas opciones de control microbiano eficaces y confiables para la población, sin los efectos adversos del desarrollo de cepas resistentes. Una de estas alternativas es el empleo de plantas medicinales o de sus productos.^{6,7}

Durante siglos, se han empleado las plantas como remedios medicinales, ejerciendo un papel primordial en la conservación del bienestar moderando de la salud para tratar diferentes patologías.^{8,9} La medicina alternativa incluye el uso de distintos componentes de las plantas que se han utilizado de manera rentable en el tratamiento de diversas enfermedades. Se ha comprobado que varias plantas medicinales poseen efectos secundarios mínimos y son más económicos en comparación con los medicamentos sintéticos.¹⁰

La Organización Mundial de la Salud (OMS) muestra que la medicina natural se encuentra dentro del ámbito de los sistemas de salud y reconoce su importancia como una parte fundamental y a menudo menospreciada en los servicios de bienestar en salud. En algunos países, la medicina alternativa se conoce comúnmente como medicina complementaria. Con base en la historia, la medicina tradicional se ha utilizado con el fin de preservar la salud, prevenir enfermedades y frenar diversas afecciones.¹¹

El Perú es el segundo país con mejor cobertura de flora en Latinoamérica. Cuenta con diversas especies de plantas medicinales de uso conocido por los pobladores, pero no aprovechadas de manera adecuada.¹² No obstante, durante los últimos años, se ha experimentado una significativa disminución del conocimiento tradicional sobre el empleo medicinal de las plantas. Además, la disponibilidad de especies terapéuticas se ha visto considerablemente reducida debido a la degradación de los entornos naturales.¹³

Al respecto, *Eucalyptus globulus*, vulgarmente conocido como eucalipto, perteneciente a la familia *Myrtaceae*. Ha sido largamente usado en el ámbito de la medicina alternativa debido a sus numerosas especies y su rápido crecimiento. Además, constituye una valiosa fuente de goma, taninos, polifenoles, terpenos, proteínas, aceites esenciales y colorantes, empleados para el tratamiento de distintas patologías, incluyendo la gripe, la disentería y los trastornos de la piel. Ha sido empleado en el tratamiento de infecciones del sistema respiratorio como es neumonía, el resfriado común, bronquitis, el dolor de garganta y actualmente contra el covid-19.^{14,15}

Diferentes partes de la planta de eucalipto se han utilizado como infusiones, macerados, y extractos.^{16,17} Un estudio demostró la capacidad antimicrobiana del del eucalipto, el componente de 1,8-cineol en una concentración de 55,2%, frente a ciertas cepas bacterianas gram negativas mediante la creación del halo de inhibición de 35mm.¹⁴

Vista la realidad problemática se plantea el siguiente problema de investigación; Cuál será el efecto antibacteriano *in vitro* de diferentes concentraciones del extracto alcohólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) sobre *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis*.

Esta investigación se justificó teóricamente pues se constituye en el primer estudio donde se evaluó el potencial antibacteriano del eucalipto de la región sierra de Piura en la localidad de Huarmaca sobre bacterias periodontopatógenas. Además, esta investigación presentó un enfoque teórico novedoso pues al comprobarse la afectividad antibacteriana del extracto de eucalipto generan las bases teóricas para futuras investigaciones aplicadas como la incorporación de los principios activos de esta planta en productos de higiene oral para uso humano. Así mismo, este estudio tiene relevancia social, pues si bien es una planta medicinal muy usada por gran parte de la población de la sierra, pues es de fácil acceso, su potencial uso odontológico es reciente, por lo que se requiere informar a la comunidad las concentraciones adecuadas para un uso seguro y sin riesgos toxicológicos. Por consiguiente, se revaloraría comercialmente a la planta, promoviendo su cultivo y creando posibilidades económicas para los agricultores. En el aporte práctico, más estudios al respecto permitirían la integración del

eucalipto en productos orales, brindando una opción natural segura para el cuidado bucal. Esto supondría una contribución importante en el ámbito de la salud oral y propiciaría nuevas investigaciones en este campo. Finalmente, la utilidad de este estudio se realizó para conseguir el título profesional de Cirujano Dentista.

En relación a eso y para contestar al problema que se planteó, se propone el objetivo general; comparar el efecto antibacteriano in vitro de diferentes concentraciones del extracto alcohólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) sobre *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis* con un control positivo clorhexidina 0,12% por el método de difusión en disco. El cual será respondido en los objetivos específicos; determinar in vitro la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto alcohólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) sobre *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis*; determinar in vitro la (CMB) concentración mínima bactericida del extracto alcohólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) sobre *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis*.

La hipótesis que se plantea es que a una concentración mayor del extracto alcohólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) se obtendrá un mayor efecto antibacteriano sobre *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis*.

II. MARCO TEÓRICO

Bernardo, *et al*¹⁸ (2022) en Brasil, verificaron la acción antimicrobiana y antibiopelícula y la citotoxicidad del extracto (HEScL) y las nanopartículas de plata (AgNPs-HEScL) de las hojas de *Syzygium cumini*. Fue una investigación de tipo *experimental in vitro*. Los análisis de antimicrobianos y antibiofilm se llevaron a cabo mediante métodos *in vitro*: difusión en agar y microdilución. Los ensayos se realizaron en sistemas de prueba por triplicado. Reportaron que las CMI de las células planctónicas oscilaron entre 31,2 y 250 (AgNPs-HEScL) y entre 1296,8 y 10375 µg/ml (HEScL) para *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus oralis*, *Actinomyces naeslundii* y *Veillonella dispar*. Concluyeron que los datos sugieren acción antimicrobiana y antibiofilm de HEScL, y más específicamente, AgNPs-HEScL dependiente de la dosis, el tiempo y la especie.

Raghunathan, *et al*¹⁹ (2022) en India, evaluaron la cualidad antimicrobiana *in vitro* de los extractos de neem, bael y canela en *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Campylobacter rectus* para compararla con el gold standard clorhexidina (0,2%). Fue un estudio de tipo *experimental in vitro*. Utilizando hojas de la panta neem y bael con cortezas de canela usando la técnica de maceración en frío para preparar los extractos etanólicos de los productos. La propiedad antimicrobiana de los productos de prueba a tres concentraciones diferentes (0,1 %, 0,2 % y 0,3 %) se verificó por medio del análisis de difusión en Agar. Se reportó que el extracto de las hojas de bael (0,3 %) mostró la zona de inhibición más amplia en comparación con el extracto de neem (0,3 %), el extracto de canela (0,3 %) y la clorhexidina (0,2 %), frente a *Porphyromonas gingivalis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans* y *Campylobacter rectus*. Concluyeron que las hojas de bael demostraron un efecto antimicrobiano significativo contra los patógenos orales probados.

Kommerein, *et al*²⁰ (2022) en Alemania, identificaron sustancias derivadas de plantas que inhiben principalmente el crecimiento de bacterias promotoras de enfermedades, comparando el efecto del extracto de raíz de *Rheum palmatum* contra *P. gingivalis* y la especie comensal *Streptococcus oralis*. Fue una investigación de tipo *experimental in vitro*. La capacidad antiplanctónica se

llevó a cabo en medición de la densidad óptica con la actividad metabólica. Se encontró que el extracto de raíz de *R. palmatum* inhibió significativamente el crecimiento de *P. gingivalis* que ya se encontraba reducido a una concentración de 3,9 mg/L, y la reducción significativa empezó a 15,625 mg/L de extracto de raíz de *R. palmatum*. Concluyendo que a bajas concentraciones del extracto de raíz de *R. palmatum* poseen una inhibición específica sobre *P. gingivalis*. Estos hallazgos brindan un enfoque prometedor para el desarrollo de un agente tópico potencial, el cual podría prevenir alteraciones en el microbiota bucal causadas por el crecimiento excesivo del patógeno *P. gingivalis*

Nakao, *et al*²¹ (2021) en Japón, Evaluaron la actividad antibacteriana de tres productos herbales (hoja de curry, clavo y canela) contra *Porphyromonas gingivalis*. Siendo un estudio experimental *in vitro*. Utilizando placas de 96 pocillos se usó la cepa ATCC 33277 para el desarrollo de crecimiento y formación de biopelículas de *P. gingivalis*. Se añadieron series de dilución doble de cada extracto de hierbas de hoja de curry, clavo y canela (2,5 µl) a la suspensión bacteriana (200 µl, 1×10^8 CFU/ml) en caldo BHI-HM. La turbidez de la suspensión bacteriana (OD620) durante el crecimiento se midió en diferentes momentos utilizando un lector de microplacas para la determinación de las CIM de cada cepa se determinó mediante métodos de microdilución. Reportaron que el extracto de hoja de curry (CLE) a concentraciones de 16 - 32 µg/mL muestra actividad selectiva ante *P. gingivalis* sin ninguna toxicidad *in vitro* para las células orales humanas. Concluyendo que la MIC de CLE contra *P. gingivalis* fue más alta que otras especies de bacterias orales. Las células de *P. gingivalis* se eliminaron por completo dentro de los 30 minutos posteriores al contacto con el extracto de CLE.

Ben, *et al*²² (2021) en Canadá, investigaron los efectos de un extracto fenólico preparado a partir de jugo de cereza ácida (*Prunus cerasus L*) sobre el crecimiento, la adherencia y la actividad proteasa de *P. gingivalis*. Fue una investigación de tipo experimental *in vitro*. Se cultivó esta bacteria en condiciones anaeróbicas a 37 °C en caldo Todd-Hewitt. Por medio de microdilución, mediante el estudio de fluorescencia para los efectos estudiados. Reportaron que el extracto de cereza ácida redujo el crecimiento de *P. gingivalis* en un 57,3%. Concluyendo que el extracto fenólico de cereza ácida emerge como un prometedor producto

natural para el tratamiento de la periodontitis. Su capacidad para atenuar las cualidades de virulencia de la bacteria *P. gingivalis*, así como reducir su facultad al dañar la barrera epitelial oral lo posiciona como una opción potencialmente efectiva en este contexto.

Attallah, *et al*²³ (2021) en Egipto, investigo la actividad antibacteriana y antibiopelícula de *Boswellia sacra* Flueck. extracto de oleorresina contra el patógeno periodontal, *P. gingivalis*, con la exploración en la concentración inhibitoria mínima (MIC) que podría usarse en el tratamiento de infecciones periodontales. Siendo una investigación de tipo experimental *in vitro*. Usando microscopia electrónica de barrido para examinar las biopelículas la citotoxicidad se midió mediante la viabilidad celular, por la prueba de difusión en agar. El extracto oleorresinao demostró capacidad antibacteriana en *P. gingivalis* aislada entre los valores de 500 y 1000 µg/mL. Reportaron que la producción de polisacáridos de los aislamientos de *P. gingivalis* analizados se redujo significativamente después del tratamiento con extracto. Concluyendo que el futuro se puede usar *Boswellia sacra* Flueck como extracto de oleorresina en el descubrimiento de nuevos fármacos antimicrobianos para esto se deben de realizar más estudios *in vitro*.

Shetty, *et al*²⁴ (2020) en Estados Unidos, verificaron la efectividad de *Allium sativum* (ajo) y *Psidium guajava* (guayaba) en *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*. Siendo una investigación de tipo experimental *in vitro*. Usando cultivos de agar sangre/kanamicina para aislar, y se usó un frasco anaeróbico oxid para cultivar *P. gingivalis*. y para el cultivo de *A. actinomycetemcomitans* se usó la técnica del vaso de vela. La (MIC) del extracto acuoso y etanólico de ajo, guayaba se dio por el procedimiento de macrodilución en caldo. Los extractos de guayaba se diluyeron en serie y las concentraciones a 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 16,6, 8,3, 4 y 2 mg/mL y 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 16,6, 8,3, 4 y 2 Se obtuvieron µL/mL para EGvE y AGvE. Reportaron que, a AGE, 25, 50 y 75 µL con una determinada zona de cohibición entre 16, 20 y 25 mm, para *P. gingivalis*. Reportaron que los compuestos mostraron capacidad en bacteriostática en a *Porphyromonas gingivalis* con CMI 16,6 µL/mL. La CMI 75 µL/mL en *Porphyromonas gingivalis*, mientras que EGvE manifestó capacidad de 75 µL/mL a *P. gingivalis*.

Concluyendo en que el extracto de *A. sativum* y *P. guajava* demostraron capacidad antibacteriana significativo. Se encontró que *A. sativum* era más efectivo contra *P. gingivalis*, mientras que *P. guajava* mostró más eficiencia contra *A. actinomycetemcomitans*.

Mendes, *et al*²⁵ (2020) en Brasil, evaluaron la capacidad antibacteriana del extracto crudo de diclorometano de *S. officinalis* y las subfracciones SODD1 y SODD2, además de y sustratos limpios de viridiflorol, salvigenina y manool, salvigenina sobre bacterias periodontopatógenos. Fue un estudio experimental *in vitro*. Incluyó cinco pruebas antimicrobianas para evaluar la actividad de diferentes compuestos: la determinación de la (MIC) y (MBC), la evaluación de la capacidad antibiofilm, la creación de la curva Time-kill (para determinar el movimiento bacteriano) el valor del índice de concentración inhibidora fraccional. Estas pruebas se realizaron en seis aislamientos bacterianos clínicos y de 3 cepas de bacterias relacionadas con la patología periodontal. Reportaron los valores de MIC superiores a 400 µg/mL correspondieron a la ausencia de acción antibacteriana, ya que esta fue la concentración más alta que se empleó en los ensayos. SOD proporcionó el valor MIC más bajo, 50 µg/mL, contra *A. actinomycetemcomitans*. Concluyeron que todos los extractos de *S. officinalis* mostraron capacidad antibacteriana contra los peiorodntopatógenos.

Veloso, *et al*²⁶ (2020) en Brasil, evaluaron la capacidad *in vitro* de unos extractos crudos que se obtuvieron de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero), *Mallow sylvestris* L. (Mallow), *Tamarindus indica* L. (tamarindo), *Caesalpinia ferrea* Mart. (Jucá), *Cinnamomum cassia* B. (Canela), *Punica granatum* L. (Granada), *Aeolanthus suaveolens* (Als.) Spreng. (Macassá) y *Syzygium aromaticum* L. (clavo) en microorganismos bucales como, *P. intermedia*, *F.nucleatum*, *P. gingivalis*, y *P. micra*. Siendo una investigación experimental de tipo *in vitro*. Se utilizó el procedimiento en difusión por agar para la prueba de microdilución (MIC). Se empleó la resazurina. Reportaron que los casos en los que se observó una zona de inhibición, su tamaño osciló entre 1,6 y 10,3 mm. Destaca que el extracto de Granada fue el único que logró inhibir el crecimiento de todos los microorganismos evaluados. Los valores de la (MIC) para este extracto variaron entre 50 y 400

µg/mL. Concluyeron que los extractos exhiben actividad antimicrobiana contra los microorganismos evaluados.

Bankur, *et al*²⁷ (2019) en India, verificaron la cualidad antimicrobiana de diversas condensaciones del extracto de hoja de eucalipto sobre bacterias patógenas periodontales. Siendo una investigación experimental de tipo *in vitro*. Se utilizaron las condensaciones de 10%, 50% y 100% del extracto. Siendo el control negativo clorhexidina al 0,2% y el negativo se utilizó dimetilformamida. Las bacterias evaluadas fueron *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*. La capacidad antimicrobiana fue determinada mediante la prueba de difusión en disco. Reportaron que la capacidad del 100% del extracto de *E. globulus* se formó zonas de inhibición de $5,38 \pm 0,32$ mm y $4,82 \pm 0,11$ mm contra *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* respectivamente. Concluyendo que la capacidad máxima de inhibición contra *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* se obtuvo con el 100% de concentración del extracto de *Eucalyptus globulus*.

Raghavan, *et al*²⁸ (2018) en India, verificó la capacidad de un extracto de hoja de *Mentha piperita* (menta negra) contra microorganismos patógenos bucales. Siendo una investigación experimental de tipo *in vitro*. Se usó un extracto de hojas de menta negra, mediante el método de agua fría. Con 3 cepas microbianas, *Streptococcus mutans*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Candida albicans*, para el control positivo se usó clorhexidina al 0,2%. Reportando que la capacidad máxima de inhibición en extractos de *M. piperita* y clorhexidina al 0,2 % se observó con *S. mutans* ($20,16 \pm 0,36$ y $32,64 \pm 1,34$), seguida de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ($18,34 \pm 1,09$ y $28,45 \pm 0,22$) y *Cándida. albicans* ($15,83 \pm 1,37$ y $27,66 \pm 1,85$). Concluyendo que el extracto de *M. piperita* demostró capacidad antibacteriana contra las bacterias orales causantes de enfermedades orales mayores.

Jayanti, *et al*²⁹ (2018) en India, verificaron la actividad antibacteriana de un extracto de *Ocimum sanctum* (tulsi) en *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Fue un estudio de tipo experimental *in vitro*. Este extracto de tulsi fue preparado por la prueba de extracción en frío con etanol, obteniéndose diversas concentraciones al 2%, 4%, 6% y 8% mediante dilución con dimetilformamida usado como control negativo. El control positivo fue

clorhexidina al 0,2%. Se midieron las áreas de inhibición para ambas bacterias, *A. actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis*. Reportaron que las capacidades más altas del extracto al 8% tiene la mayor área de inhibición frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* ($40,10 \pm 0,90$ mm y $33,79 \pm 1,82$ mm, respectivamente). La dimetilformamida exhibió zonas de inhibición de $13,55 \pm 1,92$ mm y $10,21 \pm 2,16$ mm frente a ambos. Concluyeron en que al 8% la concentración de extracto de *O. sanctum* (tulsi) demostró la mayor capacidad antibacteriana hacia *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*.

Gamboa, *et al*³⁰ (2018) en Colombia evaluaron la capacidad antibacteriana de los extractos y fragmentaciones conseguidas de *Piper marginatum* Jacq e *Ilex guayusa* Loes sobre *P. intermedia*, *F. nucleatum* y *P. gingivalis*. Fue una investigación experimental de tipo *in vitro*. La capacidad antibacteriana, así como de las fracciones obtenidas de ambas plantas, se lograron por la prueba de difusión en pozo. Se encontró que desde 1mg/mL la (MIC) *presentó* halos inhibidores de los extractos totales de *P. marginatum* Jacq estaban entre 12,3 y 30 mm, siendo el mayor halo de inhibición de los dos extractos vegetales fue contra *P. gingivalis*. Concluyendo que los extractos y fracciones de etanol total de *Piper marginatum* Jacq e *Ilex guayusa* Loes demostraron una capacidad antibacteriana en *P. gingivalis* AT 33277, *P. intermedia* y *F. nucleatum*.

La enfermedad periodontal se evidencia por la gradual destrucción de los tejidos blandos y duros los cuales conforman el complejo periodontal. Este proceso es mediado por la interacción entre comunidades microbianas disbióticas y respuestas inmunitarias anormales dentro de los tejidos gingivales y periodontales. Conforme el microbiota oral se vuelve disbiótica, los presuntos patógenos se multiplican, y las respuestas inflamatorias resultan en la degradación del tejido, estableciendo un ciclo constante de retroalimentación positiva que involucra la proteólisis, inflamación y el enriquecimiento de patógenos periodontales. Un estudio epidemiológico, mostró que la prevalencia más alta de periodontitis crónica se encontró en la población de edad avanzada, con un 82%, seguida de adultos con un 73% y adolescentes con un 59%, los pacientes buscan atención odontológica cuando la enfermedad ha alcanzado un nivel avanzado, ya que sus etapas iniciales suelen ser asintomáticas.^{31,32}

El término microbiota oral se utiliza para referirse a la comunidad de microorganismos presentes en la cavidad bucal del ser humano. El científico holandés Antony van Leeuwenhoek quien realizó la primera identificación de la microbiota, utilizando un microscopio que él mismo construyó, considerado como el padre de la microbiología, pionero en el descubrimiento tanto de los protistas como de las bacterias. En 1674, al observar su propia placa dental, informó sobre la presencia de pequeños organismos vivos que se desplazaban. Joshua Lederberg, introdujo el término "microbioma" para referirse a la comunidad ecológica de microorganismos simbióticos, comensales y patógenos que comparten nuestro espacio corporal. En la cavidad bucal, se encuentran alrededor de 700 especies microbianas que conforman el ecosistema oral que interactúan tanto metabólicamente como físicamente, dan lugar a la formación de comunidades de biopelículas complejas, donde los gradientes fisicoquímicos crean nichos distintos para microorganismos con diversas necesidades metabólicas.^{31,33}

Un equilibrio adecuado entre la microbiota residente y la respuesta inmunitaria del organismo es crucial para mantener un estado de homeostasis, al alterarse da lugar al desarrollo de enfermedades orales, siendo la enfermedad periodontal una de las más significativas. En 1897 cuando James Leon Williams descubrió por primera vez el biofilm bacteriano. A partir de entonces, se han identificado varios patógenos periodontales relevantes como *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. denticola*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* y *T. forsythia*.^{34,35}

A. actinomycetemcomitans es un anaerobio facultativo gramnegativo no móvil de la familia Pasteurellaceae, contribuye a la inflamación, destrucción y resorción ósea del tejido gingival, al manifestar factores de virulencia como toxina de distensión citoletal (Cdt), leucotoxina A (LtxA) y colagenasa. La leucotoxina (LtxA) afecta a las diversas poblaciones de glóbulos blancos con diferentes capacidades de inducir muerte, activa la capacidad de desgranulación de los glóbulos blancos provocan liberación de enzimas de los lisosomas, estructuras similares a redes y metaloproteinasas de matriz (MMP) e induce la muerte celular en linfocitos.³⁶

En los monocitos la toxina activa el complejo de inflamación, incluida la cisteína proteínasa caspasa-1, que induce una activación y secreción de las enzimas citocinas proinflamativas IL-1 β e IL-18. Al igual que; *Porphyromonas gingivalis* es

una bacteria Gram-negativa, anaerobia, en forma de bastón; atribuye la patogénesis de la periodontitis, disbiosis microbiana oral, actúa como un agente crítico al alterar la homeostasis inmune del huésped. Los lipopolisacáridos, las proteasas, las fimbrias y algunos otros factores de virulencia se encuentran entre las estrategias explotadas por *P. gingivalis* para promover la colonización bacteriana y facilitar el crecimiento de la comunidad microbiana circundante. Los factores de virulencia promueven la coagregación con otras bacterias y la formación de biofilm.³⁷

Fusobacterium nucleatum (Fn) es un comensal oral Gram-negativo, prevalente en varias enfermedades humanas. Se desconoce cómo este comensal común se convierte en un patógeno desenfrenado. segrega adhesina (FadA) con propiedades amiloides a través de un autotransportador similar a Fap2 para mejorar su virulencia, tiene comportamiento importante de organización de biopelículas y en las interacciones con las células huésped a través de la expresión de numerosas adhesinas, la adhesina fusobacteriana mejor caracterizada es RadD, que puede unirse a la adhesina SpaP de *Streptococcus mutans*, para mediar en la coagregación de estas dos bacterias y la organización avanzada de biopelículas.^{38,39}

De modo similar la especie *Prevotella*, se asocia comúnmente con infecciones humanas como la caries dental y la periodontitis, posee factores de virulencia tales como adhesinas, hemolisinas, exopolisacáridos de sistemas de secreción, LPS, proteasas, moléculas quorum sensing y resistencia a los antibióticos para convertirse en un patógeno bien adaptado capaz de causar una infección y proliferación exitosas en el tejido huésped.⁴⁰

P. intermedia exhibe un sistema de secreción Tipo IX que desencadena la liberación de proteasas, hemolisinas y otros factores de virulencia en las proteínas de su membrana externa, esta actividad provoca una alteración en las respuestas de las células del huésped. La acción de estas enzimas, conocidas como cisteína, serina y proteinasas, desempeña un papel crucial en la destrucción del tejido periodontal al escindir los péptidos celulares, lo que resulta en la degradación de la matriz de colágeno presente en el periodonto. Además, *P. intermedia* utiliza

aglutininas y hemoglobinas para producir hemolisinas, lo cual afecta la funcionalidad de los glóbulos rojos y conlleva a la liberación de hemoglobina.⁴¹

El lipopolisacárido bacteriano (LPS) es un factor de virulencia crucial que se encuentra en la membrana externa que se encuentra en esta bacteria. Su presencia activa tanto a los macrófagos mononucleares, lo que desencadena la liberación de diversos mediadores proinflamatorios. En particular, el LPS induce una producción mayor de óxido nítrico (NO) y citoquinas proinflamatorias específicas en los macrófagos. Se ha observado que el LPS de *P. intermedia* inhibe la osteogénesis y, además, provoca la liberación de mediadores osteolíticos por parte de los osteoblastos murinos.⁴²

El último informe del Foro Económico Mundial 2019 en Davos, Suiza, resalta la importancia de tomar medidas para enfrentar la "rápida y masiva propagación de enfermedades infecciosas", considerada una de las amenazas superiores para la salud humana. (RAM) están asociadas con un alto riesgo de fracaso en el tratamiento y la recurrencia de infecciones. Por lo tanto, son factores significativos que conllevan al crecimiento de las tasas de enfermedad y muerte, lo que da como resultado un gran incremento en los servicios de atención médica. Las patologías causadas por microorganismos resistentes a los antibióticos son las culpables de aproximadamente 700,000 decesos anuales se estima que esta cifra aumentará a más de 10 millones de decesos hacia el año 2050.^{43,44}

Por lo tanto, la búsqueda de nuevos antibióticos se vuelve especialmente crucial. Los productos naturales continúan siendo una fuente importante de nuevos compuestos medicinales, los metabolitos secundarios identificados en los fitofármacos tienen propiedades antibacterianas que resultan útiles en la prevención de (RAM).^{44,45}

A nivel mundial, la resistencia a los antibióticos (AR), particularmente en microorganismos gram negativas, está extendiéndose de manera rápida y generalizada, a través de dos vías principales: la mutación en su material genético y la adquisición de partes genéticas móviles, como son los plásmidos. Estos son moléculas con forma circular de ADN que se replican de forma libre al cromosoma bacteriano y pueden transferirse horizontalmente entre bacterias mediante procesos como la conjugación. Ejecutan una función vital en la evolución

del (AR), ya que facilitan la propagación de genes de resistencia entre los patógenos clínicos más preocupantes.^{46,47}

La resistencia antimicrobiana (RAM) implica la facultad de los microorganismos de combatir los efectos de los antibióticos. puede ser innata en las bacterias o adquirida durante el proceso de infección, acorde con la Organización de las Naciones Unidas (ONU) representa una gran amenaza para la salud global, porque compromete capacidades humanas como el desarrollo global. Varios gobiernos, en colaboración con la (OMS) y la (ONU), están trabajando juntos en la lucha contra el desarrollo de (RAM), reconociendo la urgencia de esta tarea.⁴³

Entre las pruebas principales de evaluación preliminar de la capacidad antimicrobiana se encuentra en el método de difusión en disco y en pozo agar, los cuales permiten determinar de manera cuantitativa el efecto antimicrobiano sobre los microorganismos de interés. La respuesta se expresa por medio de la medida del diámetro de los halos de inhibición. Estas pruebas de susceptibilidad microbiana son herramientas esenciales en la investigación, los resultados pueden variar debido a una amplia variedad de factores implicados en su desarrollo. Desde la selección de las plantas y el tipo de extracción, hasta la elección de los bioensayos adecuados y los detalles técnicos como la cantidad de inóculo y la técnica utilizada para determinar la actividad antimicrobiana, todos estos aspectos pueden tener un impacto significativo en los resultados obtenidos.⁴⁸

Se buscó determinar la (CMI) concentración mínima inhibitoria de la sustancia antibacteriana que exterminó el 99,9% a más de microbianos estudiados luego de un día en incubación a 37°C, para establecer la (CMB) concentración más baja de la sustancia antimicrobiana ($\mu\text{g}/\text{mL}$) que tiene la cualidad de inhibir la prolongación de agentes microbianos en condiciones normales luego de un día de incubación a 37°C.⁴⁹

Conforme pasan los años, las plantas naturales se usan ampliamente en recetas para tratar trastornos y dolencias en los sistemas de medicina alternativa, basados en hierbas alrededor del mundo. En todas las civilizaciones y en cada continente, podemos encontrar evidencia. En la actualidad, a pesar de los notables avances en farmacología, el uso terapéutico de las plantas continúa siendo una práctica

muy relevante en diversos países, sobre todo en aquellos lugares que se encuentran en vías de progresión. Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), cerca del 80% de habitantes en países en pleno desarrollo recurre a la medicina complementaria, destacándose en particular el uso de la medicina herbal como parte fundamental de la atención primaria de salud.^{50,51}

En la actualidad, la medicina natural está experimentando un notable aumento de su popularidad, especialmente en países con altos niveles de afiliación. No obstante, en países de escasos recursos, puede representar solo esta opción de tratamiento disponible. Desde la capacidad científica, las investigaciones con fitoquímicos están abriendo nuevas vías de investigación que ayudan al descubrimiento de compuestos que poseen actividades beneficiosas para el tratamiento de diversas patologías. Estos hallazgos sirven como estructura para la creación de nuevos compuestos con potencial terapéutico.^{51,52}

La diversidad de plantas en el Perú se debe a una combinación única de múltiples factores, lo que nos brinda una amplia diversidad de climas. Con un total de 84 de las 107 eco-regiones existentes en el mundo, nuestro país ofrece el escenario ideal para el desarrollo de alrededor de 4000 especies de plantas autóctonas. Entre ellas, destacan 1400 especies con propiedades medicinales. A través del Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Medicina Tradicional (INMETRA) viene realizando esfuerzos por vincular la medicina natural con la tradicional, promueve el uso responsable de las plantas medicinales en la atención inicial de salud.⁵³

El género *Eucalyptus*, originario de Australia, ha demostrado una gran capacidad de adaptación a diferentes condiciones climáticas y tipos de suelo. Esta adaptabilidad se debe a su amplia y diversa composición genética, lo cual explica su exitosa introducción en varios países. Se estima que en Perú existen diferentes especies de eucalipto, siendo el *Eucalyptus globulus* el más reconocido. En términos taxonómicos, pertenece a la clase *Magnoliopsida*, superorden *Rosanae*, orden *Myrtales* y familia *Myrtaceae*, presenta variedad de usos y aplicaciones. Por ejemplo, los extractos obtenidos de estos árboles se utilizan en forma de antiséptico, en la industria de perfumes, en productos cosméticos y como agente

saborizante, lo que demuestra que los cultivos de esta planta pueden ofrecer nuevas fuentes de investigación.^{54,55}

El eucalipto es rico en metabolitos secundarios, los cuales pueden ser utilizados tanto en forma pura como cruda, según la necesidad. Se extraen de todas las partes la planta. Siendo utilizados desde tiempos antiguos como insecticidas y conservantes. En estas dos décadas últimas, se ha visto un incremento en el estudio de los productos de origen vegetal desde una perspectiva química, poniendo énfasis en los metabolitos secundarios que están implicados en el control biológico de patógenos. Estos compuestos confieren características importantes a los extractos, como propiedades antimicrobianas, antivirales, antifúngicas; estas permiten su utilización en las nuevas investigaciones. Además, son menos tóxicos y se degradan fácilmente.^{56,57}

Un extracto es una mezcla de los componentes activos de una planta en un medio específico que actúa como disolvente. Pudiendo obtenerse utilizando la planta entera o partes específicas que contengan una mayor concentración de sus componentes activos. Glicólicos. se obtienen utilizando el propilenglicol o la glicerina como medio de extracción de los principios activos a lo largo de varias horas o días. Hidroalcohólico o tintura. se caracteriza por utilizar alcohol etílico de diversas concentraciones como líquido para extraer los componentes. Oleoso. se obtiene al dejar macerar la planta o una parte específica de ella en un aceite vegetal. Este proceso permite que el extracto resultante contenga los componentes liposolubles.^{58,59}

Los bioensayos de susceptibilidad antimicrobiana son pruebas estandarizadas *in vitro* que desempeñan una función muy esencial en la búsqueda de actividades biológicas de nuevos compuestos naturales.⁶⁰

III. METODOLOGÍA

3.1. Tipo y diseño de investigación

3.1.1. Tipo de investigación

Es una investigación de tipo básica la cual se orienta en conseguir un nuevo conocimiento de modo sistemático, con la capacidad de incrementar el conocimiento de una realidad cementada.^{61,62}

3.1.2. Diseño de investigación

Pertenece a una investigación de diseño experimental porque puede controlar distintos grados de la variable independiente, la cual va a originar un cambio en la variable dependiente, mediante un procedimiento *in vitro* que consiste en aislar órganos, tejidos o células vegetales de forma estéril, utilizando un medio químico específico y manteniéndolos en condiciones controladas de incubación.⁶¹⁻⁶³

3.2. Variables y operacionalización (Anexo 1)

Variable Independiente: Extracto alcohólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto).

Definición conceptual: Sustancia que se obtendrá a partir de la materia prima por un proceso a través de un solvente, continuo de la eliminación del mismo por un proceso físico.^{64,65}

Definición operacional: Cantidad de (mg) del extracto alcohólico total seco de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) diluido en DMSO al 1%.

Indicadores: 10 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml.

Escala de medición: De razón.

Variable dependiente: Efecto antibacteriano *in vitro* sobre *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis*.

Definición conceptual: Es la facultad que posee un agente en inhibir de forma permanente (bactericida) o temporal (bacteriostático) su propagación.^{66,67}

Definición operacional: Creación o ausencia de halo de inhibición de UFC sobre *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis*. Tras exposición de concentraciones de Extracto alcohólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto).

Indicadores: Sin efecto, efecto bacteriostático, efecto bactericida.

Escala de medición: De razón.

3.3. Población, muestra y muestreo

3.3.1 Población: Cepas bacterianas de *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis*.

- **Criterios de inclusión:** Crecimientos y halos de inhibición que formados sean uniformes y sin presencia de contaminación externa microbiana.

Los pocillos sin muestra de contaminación microbiana para determinar las (CMI y CMB).

Placas Petri en buen estado con un buen sembrado.

Las hojas seleccionadas se encontrarán en condiciones adecuadas sin rasgos de patologías microbianas.

La cepa bacteriana debidamente certificada

- **Criterios de Exclusión:** Las hojas que se recolectaron en mal estado con rasgos de daño microbiana.

3.3.2 Muestra: 5 ml de suspensión de las bacterias *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis* a la concentración de 1.5×10^8 UFC/ ml. (Anexo 2)

3.3.3 Muestreo: Cálculo de las unidades de ensayos, repeticiones y de duplicados de estudio.

3.3.4 Unidad de análisis: Una placa Petri sembrada con discos de inhibición de las sustancias a evaluar y una microplaca con pocillos.

3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos (Anexo 2-3)

El método general fue la experimentación. La confiabilidad de los datos se garantizó con la utilización de técnicas estandarizadas por el *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI).⁶⁸ El inóculo bacteriano se obtuvo por turbidimetría con una absorbancia de 0,008 equivalente a una concentración de $1,5 \times 10^8$ (estándar 0.5 de McFarland). El efecto antibacteriano *in vitro* fue evaluado mediante los métodos de difusión en disco y la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) mediante microdilución. Los halos de inhibición fueron medidos con un vernier digital (Ubermann®). La medición de la CMI y CMB se realizó mediante microscopía y la comprobación se realizó mediante siembra en placa del pocillo correspondiente a la concentración donde no se observó crecimiento bacteriano. Los datos fueron registrados en una ficha. Además, el investigador se calibró en la medición de halos de inhibición con un experto microbiólogo.

3.5. Procedimientos

Recolección de hojas e identificación de *Eucalyptus globulus* (eucalipto)

Para la investigación se colectaron hojas de eucalipto en la zona de Huarmaca latitud oeste y 5° 30'54" de Latitud Sur, a una distancia de 146 Km.⁶⁹ Las hojas seleccionadas fueron las de mejor calidad (considerando aquellas que no muestren daño mecánico ni rugosidad de ningún tipo y con pigmentación uniforme). La identificación taxonómica de un espécimen de *E. globulus* se realizó en la Universidad Nacional de Piura (Anexo 9). El material vegetal recolectado para la experimentación fue trasladado en bolsas de papel craft® al laboratorio del Instituto de Investigación en Ciencia y Tecnología de la Universidad César Vallejo, campus Trujillo.

Obtención del extracto alcohólico de hojas de *E. glóbulos*

Para la obtención del extracto, se escogieron las hojas de forma individual, desojando las ramas y seleccionando solo aquellas que cumplieran con las características de calidad indicadas anteriormente. Luego se procedió a lavar el material vegetal con agua corriente y se secó con papel absorbente de primer uso. Posterior a ello se realizó la desinfección de cada una de las hojas

con una torunda de algodón embebida en alcohol al 70%. Luego se procedió al secado del material vegetal en estufa microbiológica (Memmert®) a 40 °C por 4 horas. Obtenido el material foliar seco se procedió a realizar la molienda y pulverización en seco con ayuda de una licuadora (Oster®). Todo el material vegetal molido fue pesado en la balanza gramera para la obtención del rendimiento total. Luego se pesaron 100 g del material pulverizado el cuál fue empaquetado en papel de filtro para la obtención del extracto en el equipo Soxhlet. Se incorporó el solvente etanol absoluto y el sistema se puso en funcionamiento durante 120 minutos después de los cuales se obtuvo el extracto total. La reducción del solvente y el secado del extracto se realizó rotavapor (Isolab®) y se colocó en refrigeración en un frasco de vidrio ámbar hasta el momento de su utilización.⁷⁰

Preparación de las concentraciones del extracto de *E. globulus*

Partiendo del extracto seco de *E. globulus* se realizaron diluciones en DMSO 1% obteniéndose concentraciones de 10; 20; 30; 40 y 50 mg/mL. Cada concentración fue preparada en un vial estéril cerrado herméticamente y protegidas de la luz y mantenidas en refrigeración hasta su uso.^{70,71}

Obtención de cepas, reactivación y estandarización del inóculo de *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*.

Las cepas estándar de *F. nucleatum* ATCC 25586 y *P. gingivalis* ATCC 33277 fueron adquiridas de la empresa GenLab del Perú S.A.C en estado de liofilización.⁷² La reactivación de cepas se realizó en caldo Mueller Hinton (Millipore) 48 horas antes de la evaluación.⁷³ Después de la reactivación de la cepa se procedió a sembrar por agotamiento en estría en una placa con agar sangre para el crecimiento de colonias 24 horas después. A partir de las UFC se preparó el inóculo de ambas bacterias y su estandarización se efectuó turbidimétricamente (Kyntel® modelo KV-1200) al momento de la evaluación microbiológica. La concentración estándar fue de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL con una absorbancia de 0,08 a una longitud de onda de 625 nm (equivalen al estándar de 0,5 del nefelómetro de McFarland).⁷⁴

Evaluación del efecto antibacteriano y determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB).

El efecto antibacteriano *in vitro* fue evaluado por el método de difusión en disco. Para ello, a partir del inóculo preparado y estandarizado de ambas bacterias se realizó la inoculación de las placas de 100 mm. Las placas Petri contenían agar sangre al 5%. La inoculación se realizó por dispersión en superficie con hisopo de algodón estéril. Después de la siembra se esperó aproximadamente 15 minutos para que el exceso de humedad se disipara antes de aplicar los discos con las concentraciones del extracto evaluado y de los controles. Después de la colocación de los discos, las placas fueron invertidas y colocadas en un recipiente de anaerobiosis e incubadas a $36,5 \pm 1$ °C durante 24 horas en estufa microbiológica (Memmert®). Después de la incubación se realizó la medición manual de los halos de imbibición formados con ayuda de un vernier digital (Ubermann®). Los diámetros medidos se registraron en la ficha de recolección de datos, según concentración y según bacteria de manera individual.

Para la determinación de la CMI y de la CMB se utilizó el método de microdilución. Se utilizó una microplaca estéril de 96 pocillos con tapa que fueron rotulados de acuerdo a las concentraciones del extracto y los controles. A cada pocillo se le agregó 50 µL de las concentraciones de los extractos y 50 µL del inóculo bacteriano estandarizado. Las microplacas fueron inoculadas a $36,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por el periodo de entre 18-20 horas. El último volumen de cada pocillo fue de 100 µL. Para la determinación de la CMB, luego de la incubación y con ayuda de una micropipeta se tomaron 50 µL de solución de cada uno de los pocillos donde no se observó crecimiento bacteriano y se colocó en la superficie de placas con agar Mueller Hilton (Millipore®) y se incubaron en iguales consideraciones microbiológicas. La ausencia de UFC se reportó como CMB^{70,71}

3.6. Método de análisis de datos

Los datos recolectados y registrado en la ficha se digitalizaron y tabularon en Microsoft Excel 2019. El análisis estadístico se realizó en SPSS v. 27. Para

establecer el tipo de análisis a realizar se procedió a aplicar una prueba de normalidad. Ante la distribución normal de los datos se procedió a realizar un análisis de varianza (ANOVA) de las medias de los diámetros de los halos de inhibición, además para contrastar los efectos antibacterianos de las concentraciones del extracto y del control positivo se realizó el análisis *post hoc* de Tukey con un nivel de confianza del 95%.⁷⁵

3.7. Aspectos éticos

El manejo y uso de las cepas bacterias se llevó a cabo mediante las normas establecidas por el CONICYT.⁷⁶ Así como la norma técnica de salud: "Gestión integral y manejo de residuos sólidos en establecimientos de salud, servicios médicos de apoyo y centros de investigación" para residuos denominados biológicos.⁷⁷ El riesgo biológico de los residuos generados fue eliminado mediante esterilización a calor húmedo en autoclave, de esta manera se protege la seguridad del investigador y de todas las personas que entren en contacto con dichos residuos. Además, se respetó el reglamento de uso y el manual de operaciones del laboratorio de investigación de la Universidad César Vallejo.⁷⁸

IV. RESULTADOS

Tabla 1. Comparación del efecto antibacteriano *in vitro* de diferentes concentraciones del extracto alcohólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) sobre *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis* por el método de difusión en disco.

Bacteria	Concentraciones		Halo de inhibición en mm		Sig.*
	(I) %	(J) mg/mL	Media \pm D.E**	(I-J)	
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	CHX*** 0,12	10	21.65 \pm 0.382	3,3270*	0,000
		20	23.41 \pm 0.408	1,5660*	0,000
		30	24.99 \pm 0.535	-0,0150	1,000
		40	27.90 \pm 0.872	-2,9210*	0,000
		50	32.10 \pm 0.430	-7,1270*	0,000
		CHX	24,98 \pm 0,922	0,0000*	1.000
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	CHX 0,12	10	21.19 \pm 0.803	-3,1610*	0,000
		20	27.52 \pm 0.599	-9,4920*	0,000
		30	29.24 \pm 0.309	-11,2180*	0,000
		40	30.72 \pm 0.374	-12,6980*	0,000
		50	33.19 \pm 0.724	-15,1680*	0,000
		CHX	18,03 \pm 0,626	0,0000*	1.000

Fuente: Ficha de recolección de datos

*p=Significancia Prueba de Tukey

**D. E= Desviación estándar

*** CHX = Clorhexidina 0,12% (Control +)

La tabla 1 muestra comparaciones múltiples de la prueba *Post hoc* (Tukey), aparecen las comparaciones entre el control positivo clorhexidina 0,12% y las concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50 mg/mL del extracto alcohólico de *E. globulus* (eucalipto) sobre *F. nucleatum* y *P. gingivalis*. Se observa que para *F. nucleatum*, la concentración de 30 mg/mL no tuvo diferencia significativa ($p > 0,05$) respecto del control clorhexidina 0,12%. Es decir, ambos efectos son estadísticamente iguales. En el caso de *P. gingivalis*, se evidencia que existe diferencia significativa ($p < 0,05$) entre todas las concentraciones del extracto y el control. Es decir, todos los efectos reportados son estadísticamente distintos.

Tabla 2. Determinación in vitro de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto alcohólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) sobre *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis* por el método de microdilución.

BACTERIA	CMI
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	10 mg/mL
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	10 mg/mL

Fuente: Ficha de recolección de datos

La tabla 2, muestra la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto alcohólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) que en la concentración de 10 mg/ml tiene la capacidad de inhibir el crecimiento tanto para la bacteria *Fusobacterium nucleatum* como para *Porphyromonas gingivalis*.

Tabla 3. Determinar in vitro la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto alcohólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) sobre *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis*.

BACTERIA	CMB
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	30 mg/mL
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	10 mg/mL

Fuente: Ficha de recolección de datos

La tabla 3, muestra la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto alcohólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) para la bacteria *Fusobacterium nucleatum* a una concentración 30mg/ml inhibe total el crecimiento, y para *Porphyromonas gingivalis* con una concentración del 10mg/ml inhibe la totalidad en crecimiento del microorganismo.

V. DISCUSIÓN

Se evaluó el efecto antibacteriano *in vitro* de las concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50 mg/mL del extracto alcohólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) sobre *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis*. La sustancia control utilizada fue clorhexidina 0,12%. En relación a *F. nucleatum* se reportaron halos de inhibición de 21.65 ± 0.382 (10 mg/mL), 23.41 ± 0.408 (20 mg/mL), 24.99 ± 0.535 (30 mg/mL), 27.90 ± 0.872 (40 mg/mL), 32.10 ± 0.430 (50 mg/mL) y el control de 24.98 ± 0.922 (CHX 0,12%). Con respecto *P. gingivalis* las zonas de inhibición comunicadas fueron de 21.19 ± 0.803 (10 mg/mL), 27.52 ± 0.599 (20 mg/mL), 29.24 ± 0.309 (30 mg/mL), 30.72 ± 0.374 (40 mg/mL), 33.19 ± 0.724 (50 mg/mL) y del control 18.03 ± 0.626 (CHX 0,12%).

Estos resultados fueron similares a los encontrados por Raghunathan, et al ²¹ quienes evaluaron diferentes concentraciones de los extractos etanólicos de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) y *Azadirachta indica* (neem) que en sus máximas concentraciones (0.3%) reportaron halos de inhibición de 30 mm y 27 mm para *Porphyromonas gingivalis* respectivamente, valores muy cercanos a los halos reportados en las concentraciones de 20 mg/mL (27.52 ± 0.599 mm), 30 mg/mL (29.24 ± 0.309 mm), 40 mg/mL (30.72 ± 0.374 mm) y 50 mg/mL (33.19 ± 0.724 mm). Esta semejanza en los efectos antibacterianos se puede deber a que tanto el eucalipto como la canela, son plantas que pertenecen a la misma clase taxonómica.⁷⁹ Así mismo, el eucalipto y el neem comparten la misma familia.⁸⁰ Se ha comunicado que estas tres plantas en su caracterización fitoquímica presentan los metabolitos flavonoides, que son responsables del potencial antimicrobiano de estas plantas.⁸¹ Teniendo la capacidad de formar complejos extracelulares y descomponer las capas de lípidos y proteínas de las membranas celulares bacterianas. Este daño conduce a cambios en la permeabilidad de la membrana celular, permitiendo que componentes intracelulares críticos como ácidos nucleicos y nucleótidos se liberen, lo que resulta en la inhibición de la función de la membrana citoplasmática. Este proceso, a su vez, afecta el metabolismo bacteriano e impide su crecimiento induciendo su muerte.⁸²

En ese sentido Shetty et al²⁴ evaluó distintas concentraciones del extracto etanólico de la planta *Psidium guajava* (guayaba) sobre *P. gingivalis*, comunicaron

que en su concentración más alta (75 $\mu\text{L/mL}$) formó halos de inhibición de $15,4+0,54$ mm que difieren al estudio reportado que en su mínima concentración de (10 mg/mL), 21.19 ± 0.803 mm, se debe a que el autor trabajó en ($\mu\text{L/mL}$) y la presente investigación en (mg/mL). *P. guajava* (guayaba) y *Eucalyptus globulus*, presentando acción antimicrobiana, ya que ambas plantas comparten metabolitos como flavonoides, terpenos y taninos y pertenecen a la misma familia Myrtaceae.⁸³ La efectividad antimicrobiana de los terpenos se atribuye a por lo menos cinco modos de acción, entre los que se incluye el deterioro de la estructura y función de la membrana, la inhibición de la biosíntesis y función de los ácidos nucleicos, la interferencia en procesos metabólicos esenciales, la inducción de la coagulación de los componentes citoplásmicos y la interrupción de la comunicación celular normal.⁸⁴

Por su parte Jayanti et al²⁹ evaluaron la actividad antimicrobiana del extracto de etanol de *Ocimum sanctum* (Tulsi) que ha su más alta concentración (8%) reportaron halos de inhibición de $33,79 \pm 1,82$ mm para *Porphyromonas gingivalis* siendo muy cercanos a los reportados en el presente estudio (20 mg/mL), 27.52 ± 0.599 mm, (30 mg/mL), 29.24 ± 0.309 mm, (40 mg/mL) 30.72 ± 0.374 , (50 mg/mL) 33.19 ± 0.724 mm; esto podría deberse a que ambas plantas comparten la misma clase y en su composición fitoquímica, ambas contienen el metabolito 1,8-cineol⁸⁵ y eugenol.⁸⁶ Este último compuesto es capaz de inhibir la formación de biopelículas de bacterias gram negativas.⁸⁷ En el caso del 1,8 cineol son capaces de modificar la permeabilidad de las células bacterianas y aumentar la fluidez de la membrana, provocando un cambio en la topología de las proteínas de la membrana y deteniendo el proceso respiratorio celular.⁸⁸

Al respecto, Gamboa et al³⁰ quien evaluó diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Piper marginatum* determinaron que la actividad antimicrobiana de la concentración de 4 mg/mL sobre *Porphyromonas gingivalis* generó halos de inhibición de 30,0 mm; semejantes a los comunicados en esta investigación a la concentración de 40 mg/mL (30.72 ± 0.374 mm). Esto guardaría relación con que la planta estudiada en su composición fitoquímica contiene metabolitos del tipo flavonoides y taninos, conocidos universalmente por poseer propiedades antibacterianas.⁸³ De igual manera, el extracto de *Piper marginatum* en su

concentración de 4 mg/mL sobre *Fusobacterium nucleatum* generó halos de inhibición de 14.3 mm. Estos resultados difirieron con los reportado en el presente estudio, que a la concentración más baja (10 mg/mL) generó halos de inhibición de 21.65 ± 0.382 mm sobre la misma bacteria. Esta distinción clara se fundamentaría en las diferentes concentraciones evaluadas, además que ambos extractos fueron obtenidos a partir de material vegetal procesado de manera distinta. En nuestro estudio se usó material seco mientras que en la investigación de Gamboa et al³⁰ utilizaron material vegetal fresco, y teóricamente se ha demostrado que la concentración de principios activos tipo aceites esenciales como el 1.8-cineol puede diferir si se obtienen a partir de material seco o fresco, además que se ha reportado que este aceite esencial se encuentra en mayor concentración en *E. globulus*.^{89 90}

En el mismo sentido Parashuramaiah et al⁹¹ evaluaron el potencial antibacteriano de diferentes concentraciones de *Azadirachta indica* (Neem). Informaron que a la concentración de 15% se obtuvieron halos de inhibición de 25.00 mm sobre *Fusobacterium nucleatum*. Resultados similares a los de este estudio a las concentraciones de 30 mg/mL (24.99 ± 0.535 mm) y 40 mg/mL (27.90 ± 0.872 mm). Esta similitud en la capacidad inhibitoria de los extractos de ambas plantas se fundamentaría en que ambos vegetales pertenecen a la misma clase y familia taxonómica⁸⁰, lo cual asegura que presenten similar composición fitoquímica, destacando la presencia de polifenoles, terpenos y taninos, metabolitos secundarios con conocida actividad antimicrobiana.⁸³ El mecanismo de acción de estas sustancias incluye la afectación de la membrana, del citoplasma y del desarrollo de las estructuras móviles (flagelos) y de agregación bacteriana, lo que en consecuencia impediría el proceso de *quorum sensing*, considerado un factor de virulencia y vitalidad determinante en los periodontopatógenos.⁹²

Por otra parte, Nakao et al²¹ notificaron que la CMI del extracto etanólico de *Murraya koenigii* (Curry), *Cinnamomum zeylanicum* (Canela) y *Syzygium aromaticum* (Clavo de olor) fue de 16 µg/mL en el caso de las dos primeras plantas y de 64 µg/mL para el clavo de olor, contra *Porphyromonas gingivalis*. Estos resultados fueron cercanos a los obtenidos en esta investigación con el extracto alcohólico de *E. globulus* sobre *P. gingivalis* cuya CMI fue de 10 mg/mL. De igual

manera, Ben et al²² comunicaron que la CMI del extracto fenólico de *Prunus cerasus L* (cereza ácida), contra *Porphyromonas gingivalis* fue 2 mg/mL. Como se puede apreciar todas las plantas estudiadas obtuvieron CMI cercanas, esto probablemente se deba a las características de los vegetales que comparten la misma clase taxonómica *Magnoliopsida*. Las plantas que pertenecen a esta clase son ricas en metabolitos secundarios de tipo flavonoides, cuya naturaleza química es fenólica, y los compuestos fenólicos son potentes antibacterianos.^{9,94}

Al respecto, Pesantes, et al⁹⁵ determinaron la CMI del extracto etanólico de *Plantago major* (Llantén) sobre *Porphyromonas gingivalis* la cual se obtuvo con la concentración de 50%. Al igual que en los casos anteriores, en los estudios de tamizaje fitoquímico se ha reportado que tanto el eucalipto como el llantén son ricos en diversos compuestos fenólicos.⁸² Pues la eficacia antimicrobiana de los extractos vegetales radica en la acción de sus constituyentes, principalmente los compuestos fenólicos y taninos⁸⁴, que actúan de manera sinérgica para formar un complejo activo en la inhibición de microorganismos, dependiente de la concentración. Estas sustancias afectan la síntesis proteica bacteriana al formar complejos irreversibles con las proteínas ricas en prolina (PRP), conduciendo a la muerte del microorganismo.⁹⁶

De igual manera, Attallah, et al²³ y Mendes et al²⁵ identificaron la CMI de las plantas *boswellia sacra flueck* y *Salvia officinalis* (salvia) contra *Porphyromonas gingivalis*, respectivamente. En el primer caso informaron una CMI de 2 mg/mL y en el segundo una CMI de 4 mg/mL. De modo similar, Veloso et al²⁶ determinaron que la CMI de los extractos hidroalcohólicos de *Rosmarinus officinalis* (romero), *Cinnamomum verum* (canela), *Syzygium aromaticum* (clavo), *Punica granatum* (granada) y *Tamarindus indica* (Tamarindo) contra *Porphyromonas gingivalis* fue 70 µg/mL. Así mismo reportaron que la CMB contra *Fusobacterium nucleatum* fue de 400 µg/mL. De igual forma, Hernawati et al⁸² comunicaron que la CMI y la CMB de *Punica granatum* (granada roja) sobre *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* fue 6,25 %. Como se ha mencionado anteriormente, la capacidad antimicrobiana de los extractos de plantas medicinales radica principalmente en el tipo y cantidad de principios activos con potencial antibacteriano. En el caso de estas plantas al pertenecer a la misma clase y

división taxonómica, compartirían similares principios activos. Los tamizajes fitoquímicos informan la presencia abundante de flavonoides,⁸² terpenos y terpenoides, polifenoles,⁸⁴ mentol y timol biomoléculas reconocidas como antimicrobianas debido a su capacidad para desconfigurar la bicapa lipídica, generando desestabilización celular y posterior muerte del microorganismo.^{97,98,99}

VI. CONCLUSIONES

1. Casi todas las concentraciones del extracto alcohólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) excepto la de 30mg/mL tuvieron efecto antibacteriano diferente ($p < 0,05$) del control clorhexidina 0,12% sobre *Fusobacterium nucleatum*. El efecto antibacteriano de la clorhexidina 0,12% sobre *Porphyromonas gingivalis* tuvo diferencia significativa ($p < 0,05$) con todas las concentraciones del extracto alcohólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto).
2. La concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto alcohólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) sobre *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis* fue de 10 mg/mL a través del método de microdilución.
3. La concentración mínima bactericida (CMB) del extracto alcohólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) sobre *Fusobacterium nucleatum* fue de 30 mg/mL y *Porphyromonas gingivalis* fue de 10 mg/mL.

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios en extractos acuoso y aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) para comprobar la efectividad antibacteriana sobre bacterias periodontopatógenas.
2. Realizar la caracterización fitoquímica de los extractos de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) para determinar cuál de sus componentes es responsable de la actividad inhibitoria sobre periodontopatógenos.
3. Realizar la caracterización fitoquímica de los extractos de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) para determinar cuál de sus componentes es responsable de la actividad bactericida sobre periodontopatógenos.

REFERENCIAS

1. Yataco D, Gomez W, Carrasco M, Orejuela F. Asociación de la enfermedad periodontal con factores de riesgo en adolescentes de 15 años de una institución educativa. Rev Estomatol Hered [Internet]. 2021 [Citado 4 May 2023];31(3):178–85. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/reh/v31n3/1019-4355-reh-31-03-178.pdf>.
2. Nazir M, Al-Ansari A, Al-Khalifa K, Alhareky M, Gaffar B, Almas K. Global prevalence of periodontal disease and lack of its surveillance. Sci World J [Internet]. 2020 [Citado 29 Abr 2023]; 2020:2146160. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2020/2146160/>.
3. Maia L, Costa S de M, Martelli D, Caldeira A. Edentulismo total em idosos: ¿envelhecimento ou desigualdade social? Rev Bioét [Internet]. 2020 [Citado 29 Abr 2023] ;28(1):173–81. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/bioet/a/nc8TS5ckwXLPy5Zj6M3d8hm/?lang=es&format=pdf>.
4. Haque M, Yerex K, Kelekis-Cholakis A, Duan K. Advances in novel therapeutic approaches for periodontal diseases. BMC Oral Health [Internet]. 2022 [Citado 23 Abr 2023]; 22(1):492. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s12903-022-02530-6>
5. Liébana J. Microbiología oral. 2da ed. Madrid: McGRAW-HILL.INTERAMERICANA;2002. p.58.
6. Bisso-Andrade A. Resistencia a los antimicrobianos. Rev Soc Peru Med Interna (línea) [Internet]. 2018 [Citado 24 May 2023];31(2):50–9. Disponible en: <https://revistamedicinainterna.net/index.php/spmi/article/view/32>.
7. García A, Lapeña A, Sánchez P. La resistencia a los fármacos antimicrobianos desde la perspectiva “one health”. Ecodes.org [Internet]. 2022 [Citado 5 May 2023]. Disponible en: https://ecodes.org/images/quehacemos/05.Cultura_Sostenibilidad/SALud_medi_oambiente/2022_Observatorio_Cambio_Climatico_y_Salud.pdf.
8. Zhang L, Zhuang H, Zhang Y, Wang L, Zhang Y, Geng Y, et al. Plants for health: An ethnobotanical 25-year repeat survey of traditional medicine sold in a major marketplace in North-west Yunnan, China. J Ethnopharmacol [Internet]. 2018

- [Citado 25 Abr 2023]; 224:119–25. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29800743/>.
9. Rahman I, Afzal A, Iqbal Z, Ijaz F, Ali N, Shah M, et al. Historical perspectives of ethnobotany. *Clin Dermatol* [Internet]. 2019 [Citado 25 Abr 2023];37(4):382–8. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31345328/>.
 10. Rauf A, Akram M, Semwal P, Mujawah A, Muhammad N, Riaz Z, et al. Antispasmodic potential of medicinal plants: A comprehensive review. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2021 [Citado 4 May 2023];2021:4889719. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2021/4889719/>.
 11. Tácuna A, Moncada-Mapelli E, Lens-Sardón L, Huaccho-Rojas J, Gamarra-Castillo F, Salazar-Granara A. Estrategias de la Organización Mundial de la Salud en Medicina Tradicional y Reconocimiento de Sistemas de Medicina Tradicional. *Rev Cuerpo Med HNAAA* [Internet]. 2020 [Citado 4 May 2023];13(1):101–2. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2227-47312020000100018.
 12. Cuenta de Bosques del Perú Julio. Documento metodológico. Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR). Instituto Nacional de Estadística e Informática. Gob.pe [Internet]. 2021 [Citado 23 Abr 2023]. Disponible en: https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1760/libro.pdf.
 13. Tello G, Flores Pimentel M, Gómez Galarza V. Uso de las plantas medicinales del distrito de Quero, Jauja, región Junín, Perú. *Ecol Apl* [Internet]. 2019 [Citado 4 May 2023];18(1):11. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-22162019000100002.
 14. Ostad E, Moghimipour E, Fakoor M. Evaluation of antimicrobial activity of eucalyptus camaldulensis essential oil against the growth of drug-resistant bacteria. *Jundishapur J Nat Pharm Prod* [Internet]. 2018 [Citado 5 May 2023];13(4). Disponible en: <https://brieflands.com/articles/jjnpp-65050.html>.
 15. Villarreal H, Cruz D, Legua J. El eucalipto utilizado como alternativa de tratamiento para afecciones respiratorias en la población de Barranca. *Rev Vive*

- [Internet]. 2022 [Citado 5 May 2023];5(13):98–109. Disponible en: <http://www.scielo.org.bo/pdf/vrs/v5n13/a8-98-109.pdf>.
16. Uriol E, Espinoza V. Actividad antimicrobiana de extractos hidroalcohólicos de frutos de “aguaymanto” (*Physalis peruviana* L.) y de hojas de “eucalipto” (*Eucalyptus globulus* Labill.) frente a *Staphylococcus aureus*. *Arnaldoa* [Internet]. 2021 [Citado 5 May 2023];28(1):115–24. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S2413-32992021000100115&script=sci_abstract&tlng=en.
 17. Monagas M, Brendler T, Brinckmann J, Dentali S, Gafner S, Giancaspro G, et al. Understanding plant to extract ratios in botanical extracts. *Front Pharmacol* [Internet]. 2022 [Citado 5 May 2023]; 13:981978. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2022.981978>.
 18. Bernardo W, Boriollo M, Tonon C, da Silva J, Oliveira M, de Moraes F, et al. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Syzygium cumini* leaves and their potential effects on odontogenic pathogens and biofilms. *Front Microbiol* [Internet]. 2022 [Citado 06 May 2023]; 13:995521. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36246249/>.
 19. Raghunathan D, Chaly P, Sivaswamy S. Antimicrobial activity of Bael, cinnamon and neem extracts against common oral microorganisms – an in-vitro comparative study. *J Pharm Negat Results* [Internet]. 2022 [Citado 02 May 2023];1962–72. Disponible en: <https://www.pnrjournal.com/index.php/home/article/view/3531>.
 20. Kommerein N, Vierengel N, Groß J, Opatz T, Al-Nawas B, Müller-Heupt K. Antiplanktonic and Antibiofilm Activity of *Rheum palmatum* against *Streptococcus oralis* and *Porphyromonas gingivalis*. *Microorganisms* [Internet]. 2022 [Citado 23 May 2023];10(5):965. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35630409/>.
 21. Nakao R, Ikeda T, Furukawa S, Morinaga Y. Curry leaf triggers cell death of *P. gingivalis* with membrane blebbing. *Pathogens* [Internet]. 2021 [Citado 06 May 2023];10(10):1286. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34684236/>.
 22. Ben A, Pellerin G, Vaillancourt K, Grenier D. Effects of a tart cherry (*Prunus cerasus* L.) phenolic extract on *Porphyromonas gingivalis* and its ability to impair

- the oral epithelial barrier. PLoS One [Internet]. 2021 [Citado 24 May 2023];16(1): e0246194. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33497417/>.
23. Attallah M, Negm A, Elekhawy E, Altwaijry N, Elmongy EI, El A, et al. Antibacterial Activity of *Boswellia sacra* Flueck. Oleoresin Extract against *Porphyromonas gingivalis* Periodontal Pathogen. Antibiotics (Basel) [Internet]. 2021 [Citado 28 May 2023];10(7):859. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34356781/>.
24. Shetty S, Shetty RM, Rahman B, Vannala V, Desai V, Shetty SR. Efficacy of *Psidium guajava* and *Allium sativum* Extracts as Antimicrobial Agents against Periodontal Pathogens. J Pharm Bioallied Sci [Internet]. 2020 [Citado 06 May 2023]; S589-S594. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7595448/>.
25. Mendes F, Garcia M, Moraes T, Casemiro A, Alcântara B, Ambrósio R, et al. Antibacterial activity of *salvia officinalis* L. against periodontopathogens: An in vitro study. Anaerobe [Internet]. 2020 [Citado 23 May 2023];63(102194):102194. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996420300500>.
26. Veloso J, Abrão F, Martins G, Bronzato D, Gomes A, Higino S, et al. Potential antibacterial and anti-halitosis activity of medicinal plants against oral bacteria. Arch Oral Biol [Internet]. 2020 [Citado 23 May 2023];110(104585):104585. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003996919306223>.
27. Bankur PK, Mathew M, Almalki SA, Jalaluddin M, Jayanti I, Durgaraju M. An in vitro evaluation of antibacterial efficacy of various concentration of *Eucalyptus globulus* leaf extract on periodontal pathogens. J Contemp Dent Pract [Internet]. 2019 [Citado 25 Abr 2023];20(9):1041–4. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31797826/>.
28. Raghavan R, Devi MPS, Varghese M, Joseph A, Madhavan SS, Sreedevi PV. Effectiveness of *Mentha piperita* Leaf Extracts against Oral Pathogens: An in vitro Study. J Contemp Dent Pract [Internet]. 2018 [Citado 02 May 2023];19(9):1042–6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30287701/>.
29. Jayanti I, Jalaluddin M, Avijeeta A, Ramanna PK, Rai PM, Nair RA. In vitro Antimicrobial Activity of *Ocimum sanctum* (Tulsi) Extract on *Aggregatibacter*

- actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis. J Contemp Dent Pract [Internet]. 2018 [Citado 02 May 2023];19(4):415–9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29728546/>.
30. Gamboa F, Muñoz C, Numpaque G, Sequeda G, Gutierrez J, Tellez N. Antimicrobial Activity of Piper marginatum Jacq and Ilex guayusa Loes on Microorganisms Associated with Periodontal Disease. Int J Microbiol [Internet]. 2018 [Citado 24 May 2023]; 2018:4147383. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30356383/>.
 31. Sedghi L, Bacino M, Kapila Y. Periodontal disease: The good, the bad, and the unknown. Front Cell Infect Microbiol [Internet]. 2021 [Citado 23 May 2023];11:766944. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2021.766944>.
 32. Nazir M, Al-Ansari A, Al-Khalifa K, Alhareky M, Gaffar B, Almas K. Global prevalence of periodontal disease and lack of its surveillance. ScientificWorldJournal [Internet]. 2020 [Citado 23 May 2023]; 2020:2146160. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32549797/>.
 33. Deo P, Deshmukh R. Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. J Oral Maxillofac Pathol [Internet]. 2019 [Citado 23 MA 2023];23(1):122–8. Disponible en: http://dx.doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_304_18.
 34. Xu W, Zhou W, Wang H, Liang S. Roles of Porphyromonas gingivalis and its virulence factors in periodontitis. Adv Protein Chem Struct Biol [Internet]. 2020 [Citado 24 May 2023]; 120:45–84. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.12.001>.
 35. Lamont R, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2018 [Citado 24 May 2023];16(12):745–59. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-018-0089-x>.
 36. Ozuna H, Snider I, Belibasakis GN, Oscarsson J, Johansson A, Uriarte S. Aggregatibacter actinomycetemcomitans and Filifactor alocis: Two exotoxin-producing oral pathogens. Front Oral Health [Internet]. 2022 [Citado 24 May 2023]; 3:981343. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/froh.2022.98134>.
 37. Belibasakis G, Maula T, Bao K, Lindholm M, Bostanci N, Oscarsson J, et al. Virulence and pathogenicity properties of Aggregatibacter

- actinomycetemcomitans. Pathogens [Internet]. 2019 [Citado 24 May 2023];8(4):222. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens8040222>
38. Meng Q, Gao Q, Mehrazarin S, Tangwanichgapong K, Wang Y, Huang Y, et al. Fusobacterium nucleatum secretes amyloid-like FadA to enhance pathogenicity. EMBO Rep [Internet]. 2021 [Citado 24 May 2023] ;22(7): e52891. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15252/embr.202152891>.
39. Brennan C, Garrett W. Fusobacterium nucleatum - symbiont, opportunist and oncobacterium. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2019 [Citado 24 May 2023] ;17(3):156–66. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-018-0129-6>.
40. Sharma G, Garg N, Hasan S, Shirodkar S. Prevotella: An insight into its characteristics and associated virulence factors. Microb Pathog [Internet]. 2022 [Citado 24 May 2023];169(105673):105673. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401022002868>.
41. Rahimvand L, Niakan M, Naderi NJ. The antibacterial effect of aquatic and methanolic extract of Myrtus communis on Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis and Prevotella intermedia. Iran J Microbiol [Internet]. 2018 [Citado 24 May 2023] ;10(4):254–7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30483378/>.
42. Choe S-H, Choi E-Y, Hyeon J-Y, Keum BR, Choi IS, Kim S-J. Telmisartan, an angiotensin II receptor blocker, attenuates Prevotella intermedia lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and interleukin-1 β in murine macrophages. Int Immunopharmacol [Internet]. 2019 [Citado 24 May 2023] ;75(105750):105750. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576919312299>.
43. Giono S, Santos J, Morfín M, Torres F, Alcántar M. Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. Gac Med Mex [Internet]. 2020 [Citado 24 May 2023];156(2):172–80. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0016-38132020000200172
44. Huemer M, Mairpady S, Brugger S, Zinkernagel A. Antibiotic resistance and Persistence-Implications for human health and treatment perspectives. EMBO Rep [Internet]. 2020 [Citado 24 May 2023] ;21(12): e51034. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15252/embr.202051034>

45. Dilbato T, Deressa F, Legesse D, Shumi E, Choramo A, Tolosa T. Antimicrobial activity of selected ethnoveterinary medicinal plants of southern region, Ethiopia. *Infect Drug Resist* [Internet]. 2022 [Citado 24 May 2023]; 15:6225–35. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2147/IDR.S366063>.
46. San A. Evolution of Plasmid-mediated antibiotic resistance in the clinical context. *Trends Microbiol* [Internet]. 2018 [Citado 24 May 2023] ;26(12):978–85. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2018.06.007>.
47. Graf F, Palm M, Warringer J, Farewell A. Inhibiting conjugation as a tool in the fight against antibiotic resistance. *Drug Dev Res* [Internet]. 2019 [Citado 24 May 2023];80(1):19–23. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/ddr.21457>.
48. Cerna E, Alejandro G, Ochoa Y, Aguirre L, Landeros J, Hernández O. Evaluación in vitro de principios activos de origen botánico para el control de hongos fitopatógenos. *Sci Fungorum* [Internet]. 2019 [Citado 24 May 2023]; 49: e1245. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2594-1321201900010030.
49. Picazo J, Cantón R, Elías J, Sánchez G, Luisa M, Luis GL, et al. Procedimientos en Microbiología Clínica [Internet]. www.seimc.org. [Citado 20 Jun 2023]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>.
50. Chaachouay N, Douira A, Zidane L. Herbal medicine used in the treatment of human diseases in the RIF, northern morocco. *Arab J Sci Eng* [Internet]. 2022 [Citado 23 May 2023]; 47(1):131–53. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33842189/>.
51. Birjees M, Ahmad M, Zafar M, Nawaz S, Jehanzeb S, Ullah F, et al. Traditional knowledge of wild medicinal plants used by the inhabitants of Garam Chashma valley, district Chitral, Pakistan. *Sheng Tai Xue Bao* [Internet]. 2022 [Citado 23 May 2023]; 42(2):19–33. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1872203220302377>.
52. Vega J. La medicina tradicional herbolaria como base de la medicina científica. *Rev Cubana Plant Med* [Internet]. 2020 [Citado 23 May 2023];

2020;25(2):e1032.

Disponible

en:

<https://revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/1032>

53. Salas C, Espinoza G, Chucari G. Situación de la enseñanza de la medicina tradicional y complementaria en las facultades de medicina. *Rev Peru Med Integr* [Internet]. 2022 [Citado 23 May 2023]; 7(2):102-107. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.26722/rpmi.2022.72.229>
54. Línea de base de especies forestales (pinus sp y eucalyptus sp.) Con fines de bioseguridad. Ministerio del Ambiente. Dirección General de Diversidad Biológica [Internet]. 2019 [Citado 10 May 2023] Disponible en: http://extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://bioseguridad.mina.m.gov.pe/wp-content/uploads/2020/07/LB_-Forestales.pdf.
55. Hassine D, Rahmani R, Souchard J, Abderrabba M, Bouajila J. *Eucalyptus brevifolia* F. Muell and *Eucalyptus stricklandii* Maiden leaves extracts: HPLC-DAD, GC-MS analysis and in vitro biological activities, combined with the principal component analysis. *S Afr J Bot* [Internet]. 2022 [Citado 10 May 2023]; 147:826–39. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629922001144>.
56. Usaal T, Muhammad F, Mariam Z, Uzma Y, Maham M, Abu H, et al. Antibacterial activity, phytochemical analysis and ft-ir analysis of salix nigra plant extract against gram positive and gram-negative bacteria. *Fresenius Environ Bull* [Internet]. 2022 [Citado 02 May 2023]; 31(8): 7535-7542. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/362489847>.
57. Vélez R, D' Armas RH, Jaramillo-Jaramillo C, Vélez E. Metabolitos secundarios, actividad antimicrobiana y letalidad de las hojas de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y *Melissa officinalis* (toronjil). *Facsalud* [Internet]. 2018 [Citado 24 May 2023]; 2(2): 31-9. Disponible en: <https://ojs.unemi.edu.ec/index.php/facsalud-unemi/article/view/727>
58. Ghasemian A, Eslami M, Hasanvand F, Bozorgi H, Al-Abodi H. *Eucalyptus camaldulensis* properties for use in the eradication of infections. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2019 [Citado 24 May 2023]; 65:234–7. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147957119300761>.
59. Stankov S, Fidan H, Stefanova G, Kostova I, Damyanova S, Dimitrova-Dyulgerova I, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential

- oil from aerial part (leaves and fruit) of *eucalyptus gomphocephala* DC. J Essent Oil-Bear Plants [Internet]. 2020 [Citado 24 May 2023];23(2):204–12. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/0972060x.2020.1727365>.
60. Čmíková N, Galovičová L, Schwarzová M, Vukic M, Vukovic N, Kowalczewski P, et al. Chemical composition and biological activities of *Eucalyptus globulus* essential oil. Plants [Internet]. 2023 [Citado 24 May 2023];12(5). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/plants12051076>.
61. Tipos de investigación científica. institutoclaret.cl [Internet]. 2020 [Citado 12 May 2023]. Disponible en: <https://institutoclaret.cl/wp-content/uploads/2020/03/3%C2%B0-Taller-de-investigaci%C3%B3n-semana-30-marzo.pdf>
62. Sánchez H, Reyes C, Mejía K. Manual de términos en investigación científica, tecnológica y humanística. Universidad Ricardo Palma. 2018 [citado el 26 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.urp.edu.pe/pdf/id/13350/n/libro-manual-de-terminos-en-investigacion.pdf>.
63. Fernández E, Zorrilla C, García A, Amasifuen C, Conservación *in vitro*. Instituto Nacional de Innovación Agraria-INIA Dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología. Manual de conservación *in vitro* en el Banco de Germoplasma del INIA. 2019. Gob.pe. [Citado 2 de Jun 2023]. Disponible en: https://www.inia.gob.pe/wp-content/uploads/2019/12/conservacion_in_vitro_compressed.pdf.
64. Secretaría de agricultura y desarrollo rural. Manuales prácticos para la elaboración de bioinsumos 10. Elaboración de extractos vegetales. Gob.mx [Internet]. 2022 [Citado 14 May 2023]. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/737322/10_Extractos_vegetales.pdf.
65. Ganesan D, et al. Antioxidant activity of phenolic compounds from extracts of *Eucalyptus globulus* and *Melaleuca styphelioides* and their protective role on D-glucose-induced hyperglycemic stress and oxalate stress in NRK-49F cells. Nat Prod Res [Internet]. 2018 [Citado 14 May 2023]; 32(11):1274–80. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2017.1343324>.

66. Bisso A. Fundamentos básicos de la terapia antimicrobiana. *spmi* [Internet]. 2019 [Citado 14 May 2023];31(1):10-3. Disponible en: <https://revistamedicinainterna.net/index.php/spmi/article/view/41>.
67. Li A, He Y, Zhang S, Shi Y. Antibacterial activity and action mechanism of flavonoids against phytopathogenic bacteria. *Pestic Biochem Physiol* [Internet]. 2022 [Citado 14 May 2023];188(105221):105221. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36464329/>.
68. Lucia M, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 30 th. ed. Pensilvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.
69. Resolución de alcaldía municipalidad distrital de Huarmaca. Huancabamba región Piura. [Internet]. 2020 [Citado 20 Jun 2023]; Disponible en: <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/2180113/RESOL-ALC-102-2020.pdf>.
70. Abubakar AR, Haque M. Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *J Pharm Bioallied Sci* [Internet]. 2020 [Citado 20 Jun 2021]; 12(1):1-10. Disponible en: https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19.
71. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
72. Gen Lab del Perú SAC [Internet]. Universidad Perú. [Citado 20 Jun 2023]; Disponible en: <https://www.universidadperu.com/empresas/gen-lab-peru.php>
73. Domínguez G, Miranda A, Martínez A, Huerta M, Castillo E. Evaluation of methods to reactivate preserved ruminal inoculum, assessed through in vitro fermentation kinetics and forage digestibility. *Rev Mex Cienc Pecu* [Internet]. 2019 [Citado 20 Jun 2023]; 10(2):315–34. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.22319/rmcp.v10i2.4483>.
74. Humphries R, Kircher S, Ferrell A, Krause KM, Malherbe R, Hsiung A, et al. The Continued Value of Disk Diffusion for Assessing Antimicrobial Susceptibility in Clinical Laboratories: Report from the Clinical and Laboratory Standards Institute Methods Development and Standardization Working Group. *J Clin Microbiol*

- [Internet]. 2018 [Citado 20 Jun 2021]; 56(8): e00437-18. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/JCM.00437-18>.
75. Steel RG, Torrie FJ. Bioestadística: Principios y Procedimientos. 2da Ed. (1ra en español) Edit. McGraw-Hill. México. 1988. 622p.
76. Manual de Normas de Bioseguridad y Riesgos Asociados – Fondecyt – CONICYT. [Internet]. 2018 [Citado 20 Jun 2021]; Disponible en: <https://www.conicyt.cl/fondecyt/files/2018/06/Manual- Bioseguridad- junio 2018.pdf>.
77. Ministerio de Salud. Norma Técnica de Salud "Gestión Integral y Manejo de Residuos Sólidos en Establecimientos de Salud, Servicios Médicos de Apoyo y Centros de Investigación". [Internet]. Gob.pe. [Citado 20 Jun 2023]; Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/normas-legales/223593-1295-2018-minsa>.
78. Protocolo de seguridad en laboratorios. Laboratorio médico y afines de la universidad César Vallejo S.A.C. [Internet]. 2021 [Citado 24 May 2023]; Disponible en: <https://www.ucv.edu.pe/wp-content/uploads/2020/01/28.MV1-PROTOCOLO-DE-SEGURIDAD-EN-LABORATORIO-MEDICO-Y-AFINES-DE-LA-UNIVERSIDAD-CESAR-VALLEJO-S.A.C.-2021-V3.pdf>.
79. Neyra C, et al. Efecto hipoglicémico de la canela *Cinnamomum verum* J. Presl en ratas inducidas a hiperglicemia con estreptozocina. Medicina Naturista [Internet]. 2021 [Citado 18 Nov 2023]; Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/7747855.pdf>.
80. Rodríguez E, Camilo T. Árbol de Neem (*Azadirachta indica*) en Colombia: Una alternativa para el desarrollo agroambiental del sector Agrícola. Ciencias Agropecuarias [Internet]. 2021 [Citado 18 Nov 2023]; 7(2): 93. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/8658135.pdf>.
81. Wylie M, Merrell D. El potencial antimicrobiano del árbol de neem *Azadirachta indica*. Frente Farmacol [Internet]. 2022 [Citado 18 Nov 2023]; 13. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35712721/>.
82. Hernawati S, Soesilawati P. The In Vitro Inhibitory Effects of Red Pomegranate (*Punica granatum* Linn) Extract on *Fusobacterium Nucleatum*'s and *Porphyromonas Gingivalis*'s Growth. Sys rev pharm [Internet]. 2020. [Citado 18 Nov]; 11(6):954-959. Disponible en: <https://www.sysrevpharm.org/abstract/the->

[in-vitro-inhibitory-effects-of-red-pomegranate-punica-granatum-linn-extract-on-fusobacterium-nucleatum-and-porphyrin-66162.html#cite.](#)

83. Bermúdez M, Granados F, Molina A. Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Psidium guajava* y *Cymbopogon citratus*. *Agron Mesoam* [Internet]. 2019 [Citado 10 Nov 2023]; 147–63. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15517/am.v30i1.33758>
84. Gallegos-Flores P, Bañuelos-Valenzuela R, Delgadillo-Ruiz L, Meza-López C, Echavarría-Cháirez F. Actividad antibacteriana de cinco compuestos terpenoides: carvacrol, limoneno, linalool, α -terpineno y timol. *Trop Subtrop Agroecosyst* [Internet]. 2019 [Citado 18 Nov 2023]; 22(2): 241-248. Disponible en: <https://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/2838>
85. Saharkhiz M, Kamyab A, Kazerani N, Zomorodian K, Pakshir K, Rahimi M. Chemical compositions and antimicrobial activities of *Ocimum sanctum* L. essential oils at different harvest stages. *Jundishapur J Microbiol* [Internet]. 2017 [Citado 18 Nov 2023]; 8(1): e13720. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5812/jjm.13720>
86. Paidi RK, Jana M, Raha S, McKay M, Sheinin M, Mishra RK, et al. Eugenol, a Component of Holy Basil (Tulsi) and Common Spice Clove, Inhibits the Interaction Between SARS-CoV-2 Spike S1 and ACE2 to Induce Therapeutic Responses. *J Neuroimmune Pharmacol* [Internet]. 2021 [Citado 10 Nov 2023]; 16(4):743-755. Disponible en: <http://doi.org/10.1007/s11481-021-10028-1>
87. Pries R, Jeschke S, Leichtle A, Bruchhage K-L. Modes of action of 1,8-Cineol in infections and inflammation. *Metabolites* [Internet]. 2023 [Citado 10 Nov 2023]; 13(6):751. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2218-1989/13/6/751>.
88. Merghni A, Belmamoun A, Urcan A, Bobiș O, Lassoued M. 1,8-cineol (eucalyptol) disrupts membrane integrity and induces oxidative stress in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antioxidants (Basel)* [Internet]. 2023 [Citado 20 Nov 2023]; 12(7):1388. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-3921/12/7/1388>.
89. Silva T, Sardeiro T, de Paula J, de Oliveira J, da Cunha L, dos Santos A, et al. Influence of drying on the chemical composition and bioactivity of *Piper aduncum* (Piperaceae) essential oil against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Res Soc*

- Dev [Internet]. 2021 [Citado 10 Nov 2023]; 10(8):e46810817397. Disponible en: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/17397>
90. Nguyen H, Miyamoto A, Nguyen H, Pham H, Hoang H, Tong N, et al. Short communication: Antibacterial effects of essential oils from *Cinnamomum cassia* bark and *Eucalyptus globulus* leaves-The involvements of major constituents. PLoS One [Internet]. 2023 [Citado 10 Nov 2023]; 18(7): e0288787. Disponible en: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0288787>
91. Parashuramaiah S, Chanu T. Effect of Neem Leaf and Neem Twig Extract on *Prevotella Intermedia* and *Fusobacterium Nucleatum*: An Ex Vivo Study. IOSR J Med Dent Sci [Internet]. 2019 [Citado 18 Nov 2023]; Disponible en: <https://www.iosrjournals.org/iosr-jdms/papers/Vol18-issue9/Series-7/J1809074552.pdf>
92. Gallegos P, Delgadillo L, Bañuelos R, Echavarría F, Valladares B, Meza C. Inhibition of bacterial mobility by terpenoid compounds and plant essential oils. Tropical and Subtropical Agroecosystems. Internet]. 2022 [Citado 18 Nov 2023]; #035. Disponible en: <https://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/download/3914/1772>.
93. Torres-Aguirre G, Muñoz-Bernal O, Álvarez-Parrilla E, Núñez-Gastélum J, Wall-Medrano A, Sáyago-Ayerdi S, et al. Optimización de la extracción e identificación de compuestos polifenólicos en anís (*Pimpinella anisum*), clavo (*Syzygium aromaticum*) y cilantro (*Coriandrum sativum*) mediante HPLC acoplado a espectrometría de masas. Tip Rev Espec Cienc Quím Biol [Internet]. 2018 [Citado 18 Nov 2023]; 21(2): e201824. Disponible en: <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.2.4>.
94. Balkrishan A, Tanwar S, Prajapati UB. Medicinal and nutritional aspect of genus *Prunus* l. with phytoetymology. Int j Unani Integr Medicine [Internet]. 2021 [Citado 19 Nov 2023]; 5(2): 24-27. Disponible en: <https://doi.org/10.33545/2616454X.2021.v5.i2a.165>
95. Pesantes S, Calla R, Requen M, Alvino M, Millones P. Composición química y efecto antibacteriano del extracto de *Plantago major* sobre patógenos periodontales. Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr [Internet]. 2020 [Citado 11 Nov 2023]; 20. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/pboci.2020.100>

96. Galiana M, Lozina L, Ortega S, Gualdoni G, Montiel N, Lugo C. Perfil fitoquímico y actividad antimicrobiana de extractos de *Mangifera indica* frente a *Enterococcus faecalis*. Canalabierto. [Internet]. 2021 [Citado 18 Nov 2023]; 44; 4-13. Disponible en: <https://www.canalabierto.cl/storage/articles/October2021/zkYIKuPVUYv9rA5ef6SU.pdf>.
97. Miran M, Amirshahrokhi K, Ajani Y, Zadali R, Rutter MW, Enayati A, et al. Taxonomical investigation, chemical composition, traditional use in medicine, and pharmacological activities of *Boswellia sacra* flueck. *Evid Based Complement Alternat Med* [Internet]. 2022 [Citado 18 Nov 2023]; 2022:1–14. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2022/8779676>
98. Cuevas-Morales C, Zavala-Ocampo L, San Miguel-Chávez R, González-Trujano M, Basurto-Peña F, Muñoz-Ocotero V, et al. Evaluación farmacológica de la actividad antinociceptiva y análisis fitoquímico de los extractos activos de *Salvia purpurea* Cav. *Bot sci* [Internet]. 2022 [Citado 18 Nov 2023]; 100(2): 383-396. Disponible en: <https://doi.org/10.17129/botsci.3013>.
99. Villar K, Ruiz G, Fuertes C. Biopelículas a base de quitosano y aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Muña) con propiedades antioxidante y antimicrobiana. *Rev Soc Quím Perú* [Internet]. 2021 [Citado 18 Nov 2023]; 87(4):309–20. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.37761/rsqp.v87i4.357>

ANEXOS

Anexo 1. Tabla de operacionalización de variables

VARIABLES DE ESTUDIO	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIÓN	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
Extracto alcohólico de <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto)	Definición conceptual: Sustancia que se obtendrá a partir de la materia prima por un proceso a través de un solvente, continuo de la eliminación del mismo por un proceso físico. ^{64,65}	Cantidad de (mg) del extracto alcohólico total seco de <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto) diluido en DMSO al 1%.		10mg/ml 20mg/ml 30mg/ml 40mg/ml 50ng/ml	De Razón
Efecto antibacteriano <i>in vitro</i> sobre <i>Fusobacterium nucleatum</i> y <i>Porphyromonas gingivalis</i>	Es la facultad que posee un agente en inhibir de forma permanente (bactericida) o temporal (bacteriostático) su propagación. ^{66,67}	Creación o ausencia de halo de inhibición de UFC sobre <i>Fusobacterium nucleatum</i> y <i>Porphyromonas gingivalis</i> Tras exposición de concentraciones de Extracto alcohólico de <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto)		Diámetro Halos de inhibición Efecto bactericida Efecto Bacteriostático	De Razón

Anexo 2. Instrumento de recolección de datos

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Proyecto de Tesis: Efecto antibacteriano in vitro de diferentes concentraciones del extracto alcohólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) sobre *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis*

Autor: Torres Pacheco, Rozier

Asesor Especialista: Dr. Miguel Angel Ruiz Barrueto

EFFECTO ANTIBACTERIANO POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO

Nº	Diámetro de halos de inhibición según concentración de extracto de eucalipto en mg/mL sobre <i>Fusobacterium nucleatum</i>					
	10	20	30	40	50	CHX 0,12%
1	21,78	23,34	24,58	27,89	32,73	23,83
2	21,57	23,85	25,72	29,19	31,94	26,06
3	21,45	23,48	24,82	26,66	32,55	25,38
4	22,31	22,98	24,46	27,82	31,42	25,31
5	21,79	23,56	25,81	27,52	31,94	24,62
6	21,16	23,47	25,64	28,31	31,62	26,13
7	21,13	24,02	24,63	26,58	32,12	25,45
8	22,04	22,64	24,47	29,08	32,09	25,39
9	21,38	23,14	25,05	28,26	32,65	24,17
10	21,89	23,63	24,74	27,67	31,98	23,43

No	Diámetro de halos de inhibición según concentración de extracto de eucalipto en mg/mL sobre <i>Porphyromonas gingivalis</i>					
	10	20	30	40	50	CHX 0,12%
1	20,19	28,16	29,76	30,85	34,63	18,32
2	21,17	27,83	29,47	30,17	32,26	16,76
3	22,39	27,61	29,68	30,71	33,03	18,25
4	20,03	26,45	29,12	30,09	33,41	18,33
5	22,32	27,48	29,15	30,79	32,69	19,15
6	21,54	27,36	29,19	30,63	32,87	17,54
7	21,65	26,57	29,17	30,65	32,55	17,62
8	20,87	27,55	28,98	31,16	33,06	18,13
9	20,66	28,06	28,75	31,25	34,15	18,17
10	21,05	28,11	29,17	30,94	33,29	17,99

Piura, 10 de setiembre de 2023.

Dr. Miguel Angel Ruiz Barrueto
Biólogo Microbiólogo
CBP n.º 8256



Anexo 3. Cálculo del tamaño de la muestra

Al ser una investigación experimental se calculó el número de repeticiones para cada ensayo aplicando la siguiente fórmula estadística que es aplicable para determinar el número mínimo de observaciones:

$$n = \frac{W - W^2 \cdot (Z_{\beta} + 1,4 \cdot Z_{\alpha})^2}{W^2}$$

$$n = (0,8 - (0,8)^2 \cdot (0,842 + 1,4 (1,96)^2) / (0,8)^2$$

$$n = (0,8 - (0,64) (0,842 + 1,4 (3,842))) / 0,64$$

$$n = 9$$

Donde,

n = Número mínimo de muestras, observaciones o réplicas que deben efectuarse en el estudio.

Z α = Valor correspondiente al nivel de confianza asignado.

Z β = Valor correspondiente al poder estadístico o potencia asignada a la prueba.

W = Rendimiento mínimo esperado, eficiencia mínima esperada o diferencia mínima observable.

Así, Z α = 1.96; Z β = 0.842; W = 0.80 (80%)

Reemplazando la ecuación propuesta se obtiene que el número mínimo de repeticiones es 9 para cada ensayo. Entonces multiplicando 9 x el número de ensayos que es 12 se obtiene un total de 108 unidades de ensayo por cada bacteria evaluada.

Anexo 4. Validez y confiabilidad del instrumento de recolección de datos

CALIBRACIÓN EXAMINADOR – EXPERTO

Resumen de procesamiento de casos							
		N			%		
Casos	Válido	50			100,0		
	Excluido ^a	0			,0		
	Total	50			100,0		
a. La eliminación por lista se basa en todas las variables del procedimiento.							
Matriz de correlaciones entre elementos							
		Medición de halos de inhibición en mm examinador			Medición de halos de inhibición en mm experto		
Medición de halos de inhibición en mm examinador		1,000			0,961		
Medición de halos de inhibición en mm experto		0,961			1,000		
Estadísticas de elemento de resumen							
	Media	Mínimo	Máximo	Rango	Máximo / Mínimo	Varianza	N de elementos
Varianzas de elemento	54,836	48,594	61,078	12,484	1,257	77,922	2
Correlaciones entre elementos	0,961	0,961	0,961	0,000	1,000	0,000	2
Coeficiente de correlación intraclase							
	Correlación intraclase ^b	95% de intervalo de confianza		Prueba F con valor verdadero 0			
		Límite inferior	Límite superior	Valor	gl1	gl2	Sig
Medidas únicas	0,954 ^a	0,921	0,974	42,833	49	49	0,000
Medidas promedio	0,977^c	0,959	0,987	42,833	49	49	0,000
Modelo de dos factores de efectos mixtos donde los efectos de personas son aleatorios y los efectos de medidas son fijos.							
a. El estimador es el mismo, esté presente o no el efecto de interacción.							
b. Coeficientes de correlaciones entre clases del tipo C que utilizan una definición de coherencia. La varianza de medida intermedia se excluye de la varianza del denominador.							
c. Esta estimación se calcula suponiendo que el efecto de interacción está ausente, porque de lo contrario no se puede estimar.							

Se aplicó el coeficiente de intraclase obteniendo un coeficiente de **0.97**, lo cual se interpreta como una concordancia muy alta.

**FORMATO DE REGISTRO DE CONFIABILIDAD DE
LOS EVALUADORES**ÁREA DE
INVESTIGACIÓN**I. DATOS INFORMATIVOS**

1.1. ESTUDIANTE:	TORRES PACHECO ROZIER
1.2. TÍTULO DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:	Efecto antibacteriano <i>in vitro</i> de diferentes concentraciones del extracto alcohólico de <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto) sobre <i>Fusobacterium nucleatum</i> y <i>Porphyromonas gingivalis</i>
1.3. ESCUELA PROFESIONAL:	ESTOMATOLOGÍA
1.4. TIPO DE INSTRUMENTO (adjuntar):	Calibración medición de halos de inhibición
1.5. COEFICIENTE DE CONFIABILIDAD EMPLEADO:	INDICE DE KAPPA () COEFICIENTE INTERCLASE () COEFICIENTE INTRACLASE (X)
1.6. FECHA DE APLICACIÓN:	28/06/2023
1.7. MUESTRA APLICADA:	Cincuenta halos de inhibición.

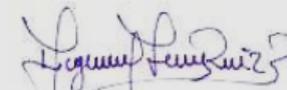
II. CONFIABILIDAD

ÍNDICE DE CONFIABILIDAD ALCANZADO:	ICC: 0.977 (Concordancia muy alta)
------------------------------------	------------------------------------

III. DESCRIPCIÓN BREVE DEL PROCESO (Ítemes iniciales, ítemes mejorados, eliminados, etc.)

Se aplicó un test de recuento de UFC/mL en placa mediante fotografías. Doble ciego. Se adjunta el test de evaluación.


Estudiante: Roziér Torres Pacheco
DNI N°: 43792484


Analista: Dr. Miguel Angel Ruiz Barrueto



PRUEBA PILOTO

Tabla 1. Halos de inhibición formados por el extracto total de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) sobre *Porphyromonas gingivalis*.

	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	PROMEDIO	CONTROL +	CONTROL -
PLACA 1	29.76	28.16	34.63	30.85	20.03	0
PLACA 2	27.83	32.26	30.17	30.09	16.76	0
PLACA 3	27.48	29.17	30.71	29.12	22.39	0
PLACA 4	25.57	33.03	28.98	29.19	18.25	0
PLACA 5	27.36	30.63	29.47	29.15	18.33	0
PROMEDIO	27.60	30.65	30.79	29.68	19.15	0

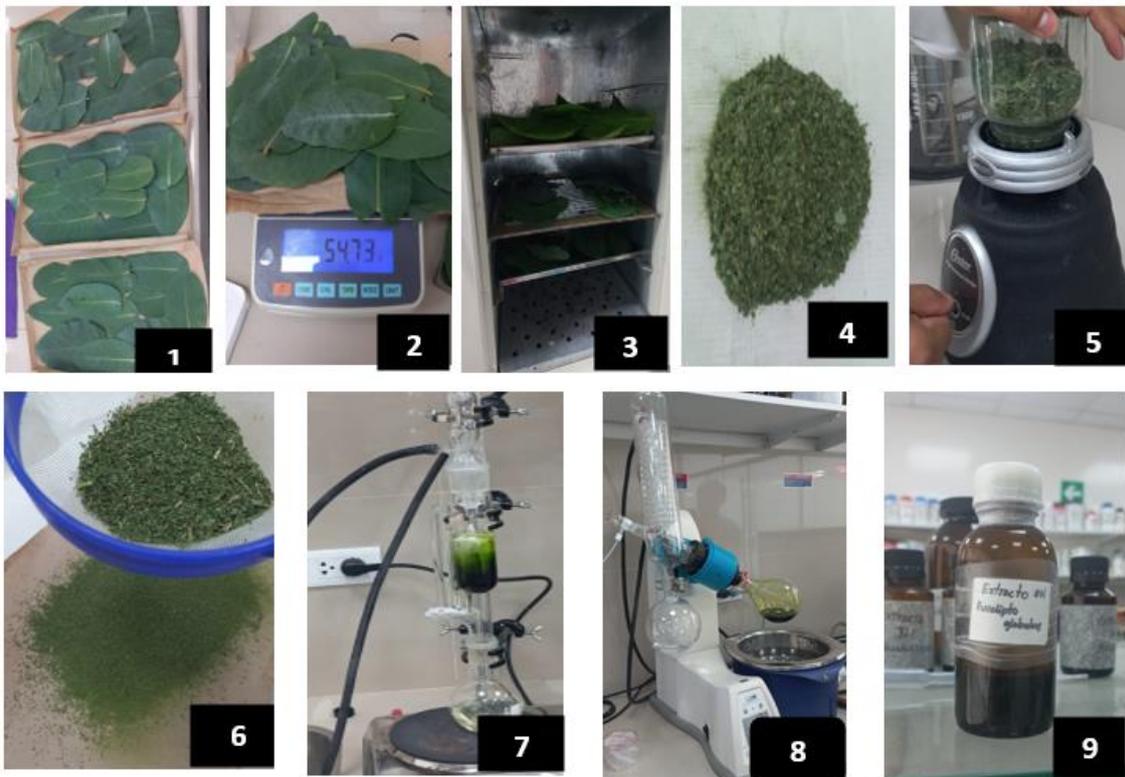
GALERÍA FOTOGRÁFICA

MATERIALES, EQUIPOS E INSUMOS



1	balanza analítica	5	soxhlet
2	tryptic soy agar	6	Alcohol etílico absoluto
3	licuadora Oster	7	placas Petri
4	autoclave	8	rotavapor

OBTENCION DEL EXTRACTO



1	Selección de la hoja	6	Proceso de colado
2	Pesado de la hoja	7	Proceso de filtrado
3	Secado de la hoja en estufa	8	Filtrado en rotavapor
4	Triturado	9	Extracto
5	Refinado en la licuadora		

Anexo 6. Análisis estadístico de datos

Concentración extracto alcohólico *Eucalyptus globulus*/ Control+

Resumen de procesamiento de casos							
Concentración extracto alcohólico <i>Eucalyptus globulus</i> / Control+		Casos					
		Válido		Perdidos		Total	
		N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Diámetro de halo de inhibición <i>Fusobacterium nucleatum</i>	10 mg/mL	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
	20 mg/mL	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
	30 mg/mL	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
	40 mg/mL	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
	50 mg/mL	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
	CHX 0,12%	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
Diámetro de halo de inhibición <i>Porphyromonas gingivalis</i>	10 mg/mL	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
	20 mg/mL	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
	30 mg/mL	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
	40 mg/mL	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
	50 mg/mL	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
	CHX 0,12%	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%

Descriptivos					
	Concentración extracto alcohólico <i>Eucalyptus globulus</i> / Control+		Estadístico	Error estándar	
Diámetro de halo de inhibición <i>Fusobacterium nucleatum</i>	10 mg/mL	Media		21,6500	,12072
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	21,3769	
			Límite superior	21,9231	
		Media recortada al 5%		21,6422	
		Mediana		21,6750	
		Varianza		,146	
		Desviación estándar		,38175	
		Mínimo		21,13	
		Máximo		22,31	
		Rango		1,18	
		Rango intercuartil		,60	
		Asimetría		,198	,687
		Curtosis		-,695	1,334
	20 mg/mL	Media		23,4110	,12913
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	23,1189	
			Límite superior	23,7031	
		Media recortada al 5%		23,4200	
		Mediana		23,4750	
		Varianza		,167	
		Desviación estándar		,40834	
Mínimo		22,64			
Máximo		24,02			
Rango		1,38			
Rango intercuartil		,58			
Asimetría		-,477	,687		
Curtosis		,142	1,334		
30 mg/mL	Media		24,9920	,16904	
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	24,6096		
		Límite superior	25,3744		
	Media recortada al 5%		24,9761		

		Mediana	24,7800	
		Varianza	,286	
		Desviación estándar	,53456	
		Mínimo	24,46	
		Máximo	25,81	
		Rango	1,35	
		Rango intercuartil	1,11	
		Asimetría	,704	,687
		Curtosis	-1,372	1,334
	40 mg/mL	Media	27,8980	,27564
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	27,2745
			Límite superior	28,5215
		Media recortada al 5%	27,8994	
		Mediana	27,8550	
		Varianza	,760	
		Desviación estándar	,87165	
		Mínimo	26,58	
		Máximo	29,19	
		Rango	2,61	
		Rango intercuartil	1,20	
		Asimetría	-,069	,687
		Curtosis	-,493	1,334
	50 mg/mL	Media	32,1040	,13584
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	31,7967
			Límite superior	32,4113
		Media recortada al 5%	32,1072	
		Mediana	32,0350	
		Varianza	,185	
		Desviación estándar	,42955	
		Mínimo	31,42	
		Máximo	32,73	
		Rango	1,31	
		Rango intercuartil	,71	
		Asimetría	,092	,687
		Curtosis	-,766	1,334
	CHX 0,12%	Media	24,9770	,29169
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	24,3172
			Límite superior	25,6368
		Media recortada al 5%	24,9989	
		Mediana	25,3450	
		Varianza	,851	
		Desviación estándar	,92240	
		Mínimo	23,43	
		Máximo	26,13	
		Rango	2,70	
		Rango intercuartil	1,52	
		Asimetría	-,478	,687
		Curtosis	-,975	1,334
Diámetro de halo de	10 mg/mL	Media	21,1870	,25385
			Límite inferior	20,6127

inhibición Porphyromonas gingivalis		95% de intervalo de confianza para la media	Límite superior	21,7613		
		Media recortada al 5%			21,1844	
		Mediana			21,1100	
		Varianza			,644	
		Desviación estándar			,80276	
		Mínimo			20,03	
		Máximo			22,39	
		Rango			2,36	
		Rango intercuartil			1,27	
		Asimetría			,166	,687
		Curtosis			-,833	1,334
		20 mg/mL	Media			27,5180
	95% de intervalo de confianza para la media		Límite inferior	27,0895		
			Límite superior	27,9465		
	Media recortada al 5%			27,5417		
	Mediana			27,5800		
	Varianza			,359		
	Desviación estándar			,59898		
	Mínimo			26,45		
	Máximo			28,16		
	Rango			1,71		
	Rango intercuartil			,91		
	Asimetría			-,912	,687	
	Curtosis			-,104	1,334	
	30 mg/mL	Media			29,2440	,09771
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	29,0230		
			Límite superior	29,4650		
		Media recortada al 5%			29,2428	
		Mediana			29,1700	
		Varianza			,095	
		Desviación estándar			,30898	
		Mínimo			28,75	
		Máximo			29,76	
		Rango			1,01	
		Rango intercuartil			,44	
		Asimetría			,420	,687
	Curtosis			-,162	1,334	
	40 mg/mL	Media			30,7240	,11818
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	30,4567		
			Límite superior	30,9913		
		Media recortada al 5%			30,7300	
		Mediana			30,7500	
Varianza			,140			
Desviación estándar			,37373			
Mínimo			30,09			
Máximo			31,25			
Rango			1,16			
Rango intercuartil			,48			
Asimetría			-,493	,687		
Curtosis			-,188	1,334		

	50 mg/mL	Media		33,1940	,22908
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	32,6758	
			Límite superior	33,7122	
		Media recortada al 5%		33,1661	
		Mediana		33,0450	
		Varianza		,525	
		Desviación estándar		,72440	
		Mínimo		32,26	
		Máximo		34,63	
		Rango		2,37	
		Rango intercuartil		,94	
		Asimetría		,948	,687
		Curtosis		,495	1,334
	CHX 0,12%	Media		18,0260	,19802
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	17,5780	
			Límite superior	18,4740	
		Media recortada al 5%		18,0339	
		Mediana		18,1500	
		Varianza		,392	
		Desviación estándar		,62619	
Mínimo			16,76		
Máximo			19,15		
Rango			2,39		
Rango intercuartil		,72			
Asimetría		-,408	,687		
Curtosis		1,718	1,334		

Pruebas de normalidad

	Concentración extracto alcohólico Eucalyptus globulus/ Control+	Kolmogorov-Smirnov ^a		
		Estadístico	gl	Sig.
Diámetro de halo de inhibición Fusobacterium nucleatum	10 mg/mL	,133	10	,200*
	20 mg/mL	,157	10	,200*
	30 mg/mL	,226	10	,158
	40 mg/mL	,132	10	,200*
	50 mg/mL	,185	10	,200*
	CHX 0,12%	,241	10	,104
Diámetro de halo de inhibición Porphyromonas gingivalis	10 mg/mL	,121	10	,200*
	20 mg/mL	,196	10	,200*
	30 mg/mL	,269	10	,038
	40 mg/mL	,201	10	,200*
	50 mg/mL	,183	10	,200*
	CHX 0,12%	,214	10	,200*

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Descriptivos									
		N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
Diámetro de halo de inhibición <i>Fusobacterium nucleatum</i>	10 mg/mL	10	21,6500	,38175	,12072	21,3769	21,9231	21,13	22,31
	20 mg/mL	10	23,4110	,40834	,12913	23,1189	23,7031	22,64	24,02
	30 mg/mL	10	24,9920	,53456	,16904	24,6096	25,3744	24,46	25,81
	40 mg/mL	10	27,8980	,87165	,27564	27,2745	28,5215	26,58	29,19
	50 mg/mL	10	32,1040	,42955	,13584	31,7967	32,4113	31,42	32,73
	CHX 0,12%	10	24,9770	,92240	,29169	24,3172	25,6368	23,43	26,13
Total		60	25,8387	3,45791	,44641	24,9454	26,7319	21,13	32,73
Diámetro de halo de inhibición <i>Porphyromonas gingivalis</i>	10 mg/mL	10	21,1870	,80276	,25385	20,6127	21,7613	20,03	22,39
	20 mg/mL	10	27,5180	,59898	,18941	27,0895	27,9465	26,45	28,16
	30 mg/mL	10	29,2440	,30898	,09771	29,0230	29,4650	28,75	29,76
	40 mg/mL	10	30,7240	,37373	,11818	30,4567	30,9913	30,09	31,25
	50 mg/mL	10	33,1940	,72440	,22908	32,6758	33,7122	32,26	34,63
	CHX 0,12%	10	18,0260	,62619	,19802	17,5780	18,4740	16,76	19,15
Total		60	26,6488	5,41594	,69919	25,2497	28,0479	16,76	34,63

Prueba de homogeneidad de varianzas

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Diámetro de halo de inhibición <i>Fusobacterium nucleatum</i>	Se basa en la media	3,321	5	54	,011
	Se basa en la mediana	1,832	5	54	,122
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	1,832	5	32,188	,134
	Se basa en la media recortada	3,232	5	54	,013
Diámetro de halo de inhibición <i>Porphyromonas gingivalis</i>	Se basa en la media	1,695	5	54	,151
	Se basa en la mediana	1,484	5	54	,210
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	1,484	5	43,195	,215
	Se basa en la media recortada	1,643	5	54	,164

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Diámetro de halo de inhibición <i>Fusobacterium nucleatum</i>	Entre grupos	683,931	5	136,786	342,917	0,000
	Dentro de grupos	21,540	54	0,399		
	Total	705,471	59			
Diámetro de halo de inhibición <i>Porphyromonas gingivalis</i>	Entre grupos	1711,214	5	342,243	952,785	0,000
	Dentro de grupos	19,397	54	0,359		
	Total	1730,611	59			

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

HSD Tukey							
Variable dependiente	(I) Concentración extracto alcohólico Eucalyptus globulus/ Control+	(J) Concentración extracto alcohólico Eucalyptus globulus/ Control+	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Diámetro de halo de inhibición <i>Fusobacterium nucleatum</i>	10 mg/mL	20 mg/mL	-1,76100*	,28245	,000	-2,5955	-,9265
		30 mg/mL	-3,34200*	,28245	,000	-4,1765	-2,5075
		40 mg/mL	-6,24800*	,28245	,000	-7,0825	-5,4135
		50 mg/mL	-10,45400*	,28245	,000	-11,2885	-9,6195
		CHX 0,12%	-3,32700*	,28245	,000	-4,1615	-2,4925
	20 mg/mL	10 mg/mL	1,76100*	,28245	,000	,9265	2,5955
		30 mg/mL	-1,58100*	,28245	,000	-2,4155	-,7465
		40 mg/mL	-4,48700*	,28245	,000	-5,3215	-3,6525
		50 mg/mL	-8,69300*	,28245	,000	-9,5275	-7,8585
		CHX 0,12%	-1,56600*	,28245	,000	-2,4005	-,7315
	30 mg/mL	10 mg/mL	3,34200*	,28245	,000	2,5075	4,1765

		20 mg/mL	1,58100*	,28245	,000	,7465	2,4155
		40 mg/mL	-2,90600*	,28245	,000	-3,7405	-2,0715
		50 mg/mL	-7,11200*	,28245	,000	-7,9465	-6,2775
		CHX 0,12%	,01500	,28245	1,000	-,8195	,8495
	40 mg/mL	10 mg/mL	6,24800*	,28245	,000	5,4135	7,0825
		20 mg/mL	4,48700*	,28245	,000	3,6525	5,3215
		30 mg/mL	2,90600*	,28245	,000	2,0715	3,7405
		50 mg/mL	-4,20600*	,28245	,000	-5,0405	-3,3715
	50 mg/mL	10 mg/mL	10,45400*	,28245	,000	9,6195	11,2885
		20 mg/mL	8,69300*	,28245	,000	7,8585	9,5275
		30 mg/mL	7,11200*	,28245	,000	6,2775	7,9465
		40 mg/mL	4,20600*	,28245	,000	3,3715	5,0405
	CHX 0,12%	10 mg/mL	7,12700*	,28245	,000	6,2925	7,9615
		20 mg/mL	3,32700*	,28245	,000	2,4925	4,1615
		30 mg/mL	1,56600*	,28245	,000	,7315	2,4005
		40 mg/mL	-,01500	,28245	1,000	-,8495	,8195
Diámetro de halo de inhibición Porphyromonas gingivalis	10 mg/mL	20 mg/mL	-6,33100*	,26803	,000	-7,1229	-5,5391
		30 mg/mL	-8,05700*	,26803	,000	-8,8489	-7,2651
		40 mg/mL	-9,53700*	,26803	,000	-10,3289	-8,7451
		50 mg/mL	-12,00700*	,26803	,000	-12,7989	-11,2151
		CHX 0,12%	3,16100*	,26803	,000	2,3691	3,9529
	20 mg/mL	10 mg/mL	6,33100*	,26803	,000	5,5391	7,1229
		30 mg/mL	-1,72600*	,26803	,000	-2,5179	-,9341
		40 mg/mL	-3,20600*	,26803	,000	-3,9979	-2,4141
		50 mg/mL	-5,67600*	,26803	,000	-6,4679	-4,8841
		CHX 0,12%	9,49200*	,26803	,000	8,7001	10,2839
	30 mg/mL	10 mg/mL	8,05700*	,26803	,000	7,2651	8,8489
		20 mg/mL	1,72600*	,26803	,000	,9341	2,5179
		40 mg/mL	-1,48000*	,26803	,000	-2,2719	-,6881
		50 mg/mL	-3,95000*	,26803	,000	-4,7419	-3,1581
		CHX 0,12%	11,21800*	,26803	,000	10,4261	12,0099
	40 mg/mL	10 mg/mL	9,53700*	,26803	,000	8,7451	10,3289
20 mg/mL		3,20600*	,26803	,000	2,4141	3,9979	
30 mg/mL		1,48000*	,26803	,000	,6881	2,2719	
50 mg/mL		-2,47000*	,26803	,000	-3,2619	-1,6781	
CHX 0,12%		12,69800*	,26803	,000	11,9061	13,4899	
50 mg/mL	10 mg/mL	12,00700*	,26803	,000	11,2151	12,7989	
	20 mg/mL	5,67600*	,26803	,000	4,8841	6,4679	
	30 mg/mL	3,95000*	,26803	,000	3,1581	4,7419	
	40 mg/mL	2,47000*	,26803	,000	1,6781	3,2619	
	CHX 0,12%	15,16800*	,26803	,000	14,3761	15,9599	
CHX 0,12%	10 mg/mL	-3,16100*	,26803	,000	-3,9529	-2,3691	
	20 mg/mL	-9,49200*	,26803	,000	-10,2839	-8,7001	
	30 mg/mL	-11,21800*	,26803	,000	-12,0099	-10,4261	
	40 mg/mL	-12,69800*	,26803	,000	-13,4899	-11,9061	
	50 mg/mL	-15,16800*	,26803	,000	-15,9599	-14,3761	

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Subconjuntos homogéneos

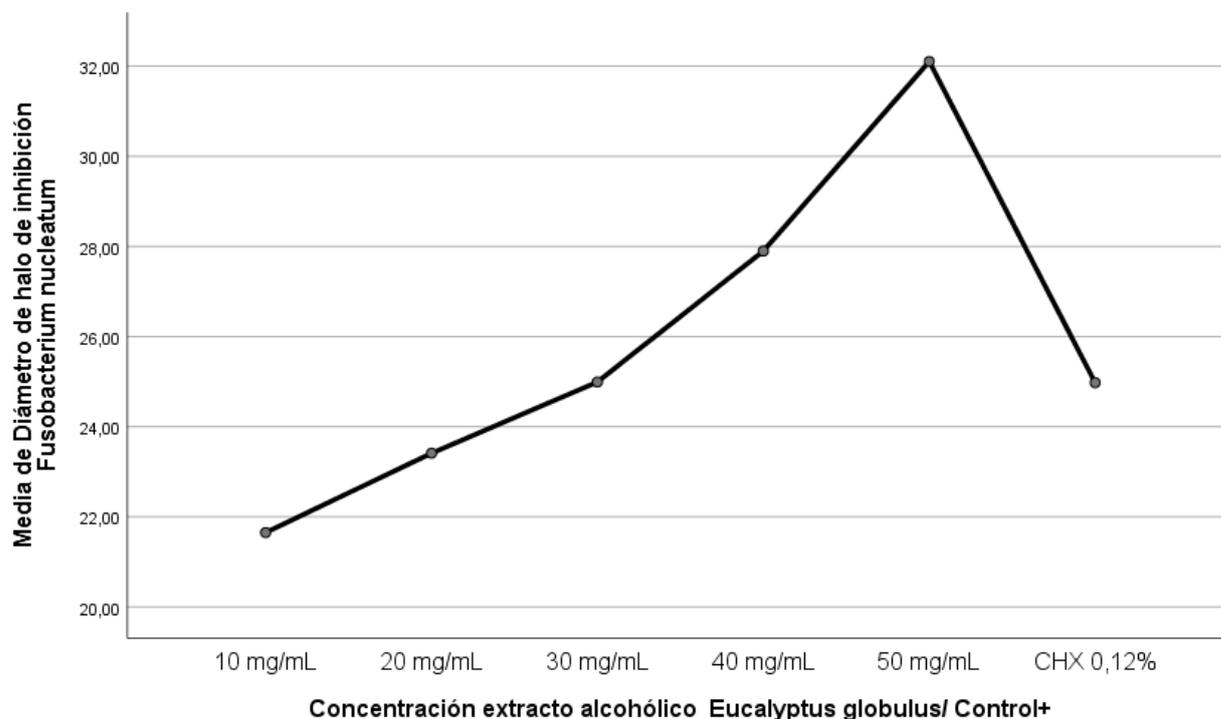
Diámetro de halo de inhibición Fusobacterium nucleatum						
HSD Tukey ^a						
Concentración extracto alcohólico Eucalyptus globulus/ Control+	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
10 mg/mL	10	21,6500				
20 mg/mL	10		23,4110			

CHX 0,12%	10			24,9770			
30 mg/mL	10			24,9920			
40 mg/mL	10					27,8980	
50 mg/mL	10						32,1040
Sig.		1,000	1,000	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 = 10,000.							
Diámetro de halo de inhibición Porphyromonas gingivalis							
HSD Tukey ^a							
Concentración extracto alcohólico Eucalyptus globulus/ Control+	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
CHX 0,12%	10	18,0260					
10 mg/mL	10		21,1870				
20 mg/mL	10			27,5180			
30 mg/mL	10				29,2440		
40 mg/mL	10					30,7240	
50 mg/mL	10						33,1940
Sig.		1,000	1,000	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 = 10,000.							

Diámetro de halo de inhibición Porphyromonas gingivalis

Gráficos de medias

Gráfico 1. Gráfico de medias



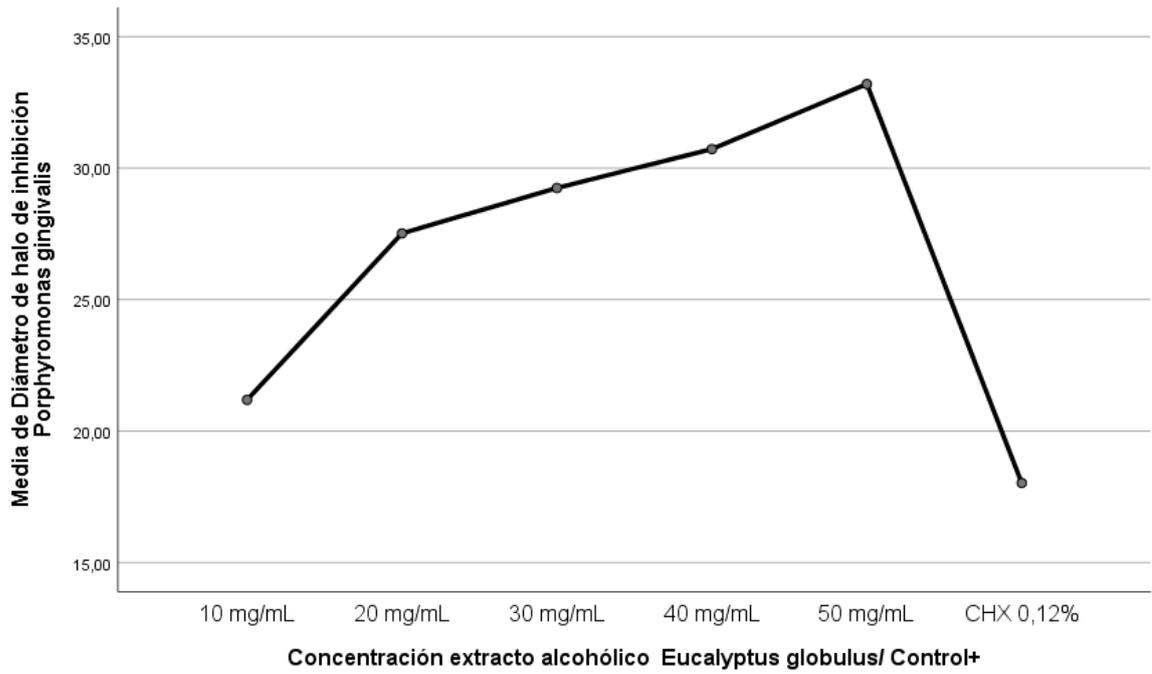
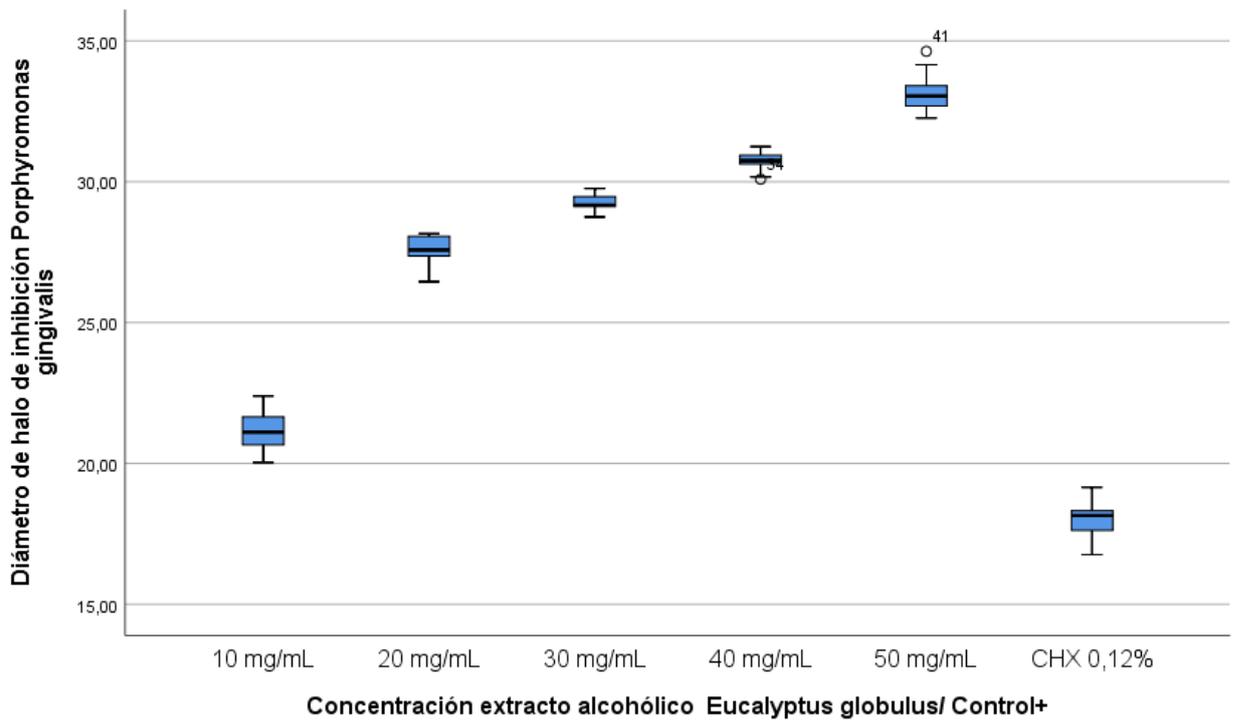


Gráfico 2. Gráfico de dispersión



Anexo 8. Evidencia fotográfica de ejecución de investigación



1	Preparación para el secado del extracto	7	Peso de 50 mg del extracto
2	Secado del extracto	8	Inoculación del solvente
3	Pesado del agar	9	Peso del extracto de 10 a 20 mg
4	Preparación del agar	10	Dilución del extracto con el solvente
5	Rotulado	11	Concentraciones finales del extracto.
6	Pesado del extracto seco.		

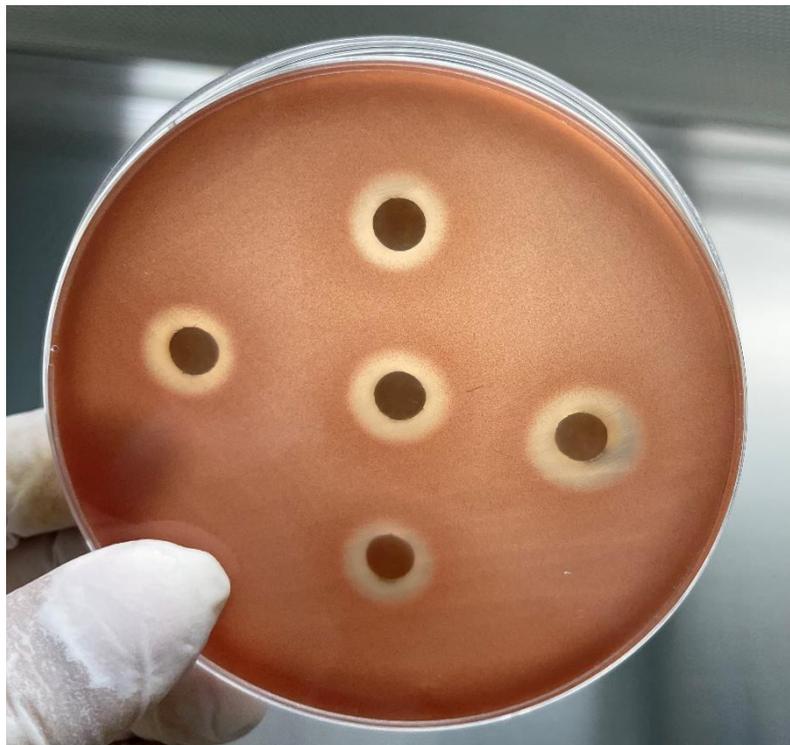


12	Elaboración de discos.	18	Rotulado Microplaca de 96 pasillos
13	Extracción de sangre.	19	Inoculación de las bacterias.
14	Mesclado de del agar con la sangre	20	Inoculación de extracto.
15	Preparación de las placas Petri	21	Microplaca completa
16	Sembrado de bacterias	22	Incubado a 37 c en la estufa
17	Colocación de disco con el extracto	23	

FOTOGRAFÍAS DE RESULTADOS



Medición de halos de inhibición con vernier digital.



Halos de inhibición de cinco concentraciones de extracto en agar sangre.

Anexo 8. Certificación de la planta

RESULTADOS DE DETERMINACIÓN TAXONÓMICA DEMUESTRA

Lugar de colecta: **Distrito de Huarmaca, provincia de Huancabamba**

Mayo del 2023

Colector: **Roziar Torres Pacheco**

Orden: Myrtales

Familia: Myrtaceae

Especie: *Eucalyptus globulus* Labill 1800.

Descripción:

El género es uno de los árboles más conocidos de la flora australiana ya que por su rápido crecimiento se ha extendido por todo el mundo para su aprovechamiento industrial. Prefiere suelos ligeramente ácidos y zonas frescas y húmedas. No resiste el frío intenso y es un poco sensible a las sequías prolongadas. Resiste temperaturas de hasta $-8\text{ }^{\circ}\text{C}^{\text{d}}$ Se ha cultivado intensamente para eliminar la humedad en zonas pantanosas. Florece en septiembre - octubre.

Es natural de Australia y de Tasmania, donde se pueden encontrar más de 300 especies del género *Eucalyptus*. Por la rapidez de crecimiento, se puede encontrar cultivado en muchas regiones del mundo para la producción de madera, fabricación de pulpa de papel y obtención de aceite esencial. Ha sido especialmente utilizado para sanear zonas pantanosas al eliminar la humedad de las mismas con la consiguiente erradicación de sus plagas de insectos, principalmente mosquitos, y de las enfermedades que transmiten. Su uso ha supuesto una gran ayuda para el control del paludismo en muchas zonas de Asia, América del Sur y el sur de Europa.

Por otra parte, esta capacidad de absorción del agua, convierte a los eucaliptos en especies muy agresivas para el medio ambiente al transformar los ecosistemas por desecación de la tierra donde se plantan.



Blgo M Sc Humberto Rivera Calle

Cátedra de Botánica de la Universidad Nacional De Piura