

UNIVERSIDAD NACIONAL "HERMILIO VALDIZAN"

FACULTAD DE MEDICINA
E.A.P. DE ODONTOLOGIA



TESIS

"EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO
ETANOLICO DEL PIPER ADUNCUM (MATICO) FRENTE
A CEPAS DE PORPHYROMONAS GINGIVALIS
(ESTUDIO IN VITRO) LIMA - 2014"

TESISTA:

ESPEJO EVARISTO, BEATRIZ JAQUELIN
RUIZ ANGULO, GISELLE MADELLYN

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
CIRUJANO DENTISTA

HUÁNUCO – PERÚ
2015

**“EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DEL PIPER ADUNCUM
(Matico) FRENTE A CEPAS DE PORPHYROMONAS GINGIVALIS (ESTUDIO IN
VITRO) LIMA-2014”**

TESISTAS:

Bach. Beatriz Jaquelin ESPEJO EVARISTO

Bach. Giselle Madellin RUIZ ANGULO

DEDICATORIA:

A Dios quien supo guiarme por el buen camino.

Para la persona que me enseñó a ser quien soy, mi madre, por su confianza y apoyo en el trayecto de mi vida, corrigiendo mis faltas y celebrando mis triunfos. A mi padre por los ejemplos de perseverancia que me ha infundado siempre.

Beatriz Jaquelin Espejo Evaristo.

A Dios y a la Virgen porque ha estado conmigo guiándome en cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar, a mis padres, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento. Es y gracias a ellos que hoy puede cumplir con mis metas trazadas.

Giselle Madellin Ruiz Angulo

AGRADECIMIENTO

Al equipo de investigación Wabash College con la representación del Parasitólogo Jorge Manuel Cárdenas Callirgos, por su permanente orientación científica, amistad y su incondicional apoyo en la elaboración de este trabajo.

A la Lic. . Gonzales de la Cruz Mercedes, directora del Instituto de Etnobiología de la Universidad Privada Ricardo Palma- Lima: por su valiosa colaboración en el reconocimiento e información de la planta *Piper aduncum*.

A la Mg. Bertha Jurado Texeira, Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Mayor de San Marcos, por su desinteresada colaboración en la obtención del extracto del *Piper aduncum*.

Al personal del Laboratorio de Microbiología de la Universidad Científica del Sur-Lima, a cargo del microbiólogo Elfer Valdivia Paz-Soldán por su constante apoyo en la realización del presente trabajo.

Al estadista de la Universidad Ricardo Palma-Lima Iannacone Oliver, José Alberto por su valiosa colaboración y orientación durante la ejecución del proyecto

A todos mis profesores y amigos de la Escuela de Odontología de la Universidad Nacional Hermilio Valdizán que de una u otra manera me brindaron su apoyo e hicieron posible la realización de esta tesis.

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico del *Piper aduncum* (matico) frente a cepas de *Porphyromonas gingivalis* in vitro; es un estudio de tipo experimental, prospectivo, longitudinal, comparativo; para lo cual se utilizaron 20 cultivos de *Porphyromona gingivalis*.

En todas las muestras se midió el halo de inhibición según los objetivos marcados y finalmente se compararon dichas medidas. Se procesó las hojas secas para obtener el extracto etanólico, a partir de la masa de extracto seco de *Piper aduncum* se prepararon concentraciones de 0.5%, 0.25% y 0.062% las que fueron preservadas en frascos color ámbar estéril y conservado en refrigeración.

Los **resultados** demostraron que, el promedio del diámetro de los halos de inhibición sobre la *Porphyromona gingivalis* a las 72 horas del extracto de *Piper aduncum* al 0.5% fue de 8,65 mm, para el de 0.25% fue de 6,25 mm y en menor diámetro para el de 0.062 % es de 4,8mm y a las 96 horas para el de extracto de *Piper aduncum* al 0.5% fue de 16.25 mm, para el de 0.25% fue de 10.95 mm y en menor diámetro para el de 0.062 % es de 7.35 mm

Conclusión: El extracto etanólico de *Piper aduncum* (matico) tiene efecto antibacteriano sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis* y en las diferentes concentraciones de 0.5%, 0.25% y 0.062% %, independientemente, muestran un efecto inhibitorio.

Palabras claves: *Piper aduncum*, *Porphyromona gingivalis*, antibacteriano

SUMMARY

Objectiv of study was to determinate the antibacterial effect of ethanol extract - Piper aduncum (matico) against strains of Porphyromonas gingivalis in vitro; it is an study experimental, prospective, longitudinal, comparative; for which were used 20 cultures Porphyromonas gingivalis.

In all samples the zone of inhibition was measured according to the objectives and finally the measures were compared. Dried leaves are processed to obtain the ethanol extract, from the mass of dry extract of Piper aduncum concentrations of 0.5 %, 0.25% and 0.062 % which were preserved in amber sterile vials and stored under refrigeration were prepared.

The results demonstrated that the mean zone diameter of Porphyromonas gingivalis inihibicon about 72 hours Piper aduncum extract was 0.5% of 8.65 mm, to 0.12 % was 6.25 mm and for smaller diameter is 0.062 % of 4.8mm and 96 hours for the extract of Piper aduncum was 0.5% of 16.25 mm, 0.12 % to 10.95 mm and was of a lesser diameter for 0.062 % is 7.35 mm

Conclusion: The ethanol extract of Piper aduncum (matico) have antibacterial effect on strains of Porphyromonas gingivalis and in different concentrations of 0.5 %, 0.25% and 0.062 %. Regardless show a greater inhibitory effect of chlorhexidine 0.12%

Key words: Piper aduncum, Porphyromonas gingivalis, anti-bacterial.

INDICE

RESUMEN.....	5
SUMMARY.....	6
INDICE.....	7
INTRODUCCIÓN.....	10

CAPÍTULO I

I. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Identificación y planteamiento del problema.....	11
1.2 Formulación del problema.....	12
1.3 Objetivos.....	13
1.3.1 Objetivo General.....	13
1.3.2 Objetivos Específicos... ..	13
1.4 Justificación.....	14
1.5 Limitaciones.....	15

CAPITULO II

II. MARCO TEORICO

2.1 Antecedentes.....	16
2.2 Bases teórico científicas.....	23

<i>PorphyromonaGingivalis</i>	25
Patologías frecuentes ocasionadas por <i>Porphyromona Gingivalis</i> ...	39
Su relación con la periodntitis.....	39
<i>Porphyromona Gingivalis</i> y halitosis.....	44
<i>Porphyromona Gingivalis</i> asociada a la periimplantitis.....	45
<i>Porphyromona Gingivalis</i> y su relación con enfermedades cardiovasculares	46
<i>Porphyromona Gingivalis</i> asociada al cáncer	46
<i>Piper Aduncum</i>	48
Usos y aplicaciones en la Odontología.	62
2.3 Definición de términos básicos.....	63
2.4 Hipótesis.....	64
2.5 Variables.....	64
2.6 Operacionalización de variables.....	65

CAPITULO III

III. MARCO METODOLÓGICO

3.1 Nivel y tipo de investigación.....	66
----------------------------------------	----

3.2 Diseño de la Investigación	66
3.3 Población y muestra.....	68
3.4 Selección de muestra.....	68
3.5 Fuentes, técnica e instrumento de recolección de datos.....	68
3.6 Procesamiento, análisis y presentación de datos.....	68
CAPITULO IV	
PRESENTACIÓN DE RESULTADOS.....	75
CAPÍTULO V	
DISCUSIÓN.....	94
CONCLUSIONES.....	98
SUGERENCIAS Y RECOMENDACIONES.....	99
REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA.....	100
ANEXOS.....	107

INTRODUCCIÓN

La naturaleza es sabia y como muestra de ello existe toda una colección de plantas con poderes curativos cuyas cualidades medicinales vienen siendo un recurso muy utilizado desde la prehistoria en las distintas partes del mundo.

Siendo Perú uno de los países con mayor diversidad se sabe que desde tiempos remotos el hombre hizo uso de las plantas con fines alimenticios y medicinales, pero muchas de ellas son empleadas únicamente mediante conocimiento empírico y solamente para determinados padecimientos, desconociendo completamente sus usos para otro tipo de dolencias, pero todo esto carece de sustento y base científica.

Es por ello que las nuevas investigaciones están dando énfasis a la medicina tradicional, utilizando las plantas que se encuentran al alcance de la población, como es el caso del *Piper aduncum*, conocida como matico, planta con múltiples propiedades, las cuales tratamos de orientar al tratamiento de algunas patologías orales.

Nuestra población actual necesita nuevas alternativas de tratamiento de costo mínimo y beneficios altos para el tratamiento de distintas patologías bucales, por lo que esta investigación ayudaría a aquellas personas de clases populares.

CAPITULO I.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Origen Y Definición Del Problema

Las enfermedades periodontales son de etiología multifactorial, que afectan las estructuras del soporte dentario ocasionando la pérdida de la pieza dentaria. Siendo la segunda enfermedad más prevalente de la boca después de la caries dental, afectando así en nuestro medio a un 85% de la población según el Ministerio de Salud.¹

La *Porphyromona gingivalis*, bacilo Gram negativo que forma colonias uniformes, patógeno oportunista bien adaptado a la mucosa oral, mejor conocido por su participación en la periodontitis, halitosis, periimplantitis también puede ser un mediador importante en el desarrollo de enfermedades crónicas como: aterosclerosis, diabetes, cánceres orodigestivos, artritis reumatoide, artritis inducida por colágeno y enfermedades cardiovasculares.

La *Porphyromona gingivalis* es causante de múltiples problemas para el ser humano por lo cual se busca nuevas alternativas de tratamiento a base de medicina tradicional encontrando así que el *Piper aduncum* (Matico), presenta múltiples propiedades como: antibióticas, antiinflamatoria, antihipertensiva, cicatrizantes, fungicida,² etc. Que son empleadas por la población para el tratamiento de conjuntivitis, aftas, úlceras bucales, heridas, infecciones vaginales, úlceras gástricas, etc^{3,4}

No existe un estudio acerca del efecto antibacteriano del *Piper aduncum* en *Porphyromonas gingivalis* por lo cual el propósito de este proyecto es constituir el primer paso en la investigación sobre el efecto antibacteriano en *Porphyromonas gingivalis*, demostrado el efecto podrá ser empleado como alternativa de tratamiento a otras enfermedades relacionadas a la mencionada bacteria.

1.2 Formulación Del Problema

1.2.1 Problema Principal:

¿Cuál es el efecto antibacteriano del extracto etanólico del *Piper aduncum* (matico) frente a cepas de *Porphyromonas gingivalis* in vitro?

1.2.2 Problemas Secundarios:

- a) ¿Cuál es la concentración que tiene mayor efecto antibacteriano el extracto etanólico de *Piper aduncum* (matico) sobre la *Porphyromonas gingivalis*?
- b) ¿Cuál es el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico del *Piper aduncum* (matico) en comparación con la clorhexidina frente a cepas de *Porphyromonas gingivalis*?
- c) ¿Cuál es el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico del *Piper aduncum* (matico) en comparación con el agua destilada frente a cepas de *Porphyromonas gingivalis*?

- d) ¿Cuál es el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico del *Piper aduncum* (matico) a las 72 horas en comparación con las 96 horas frente a cepas de *Porphyromonas gingivalis*?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico del *Piper aduncum* (matico) frente a cepas de *Porphyromonas gingivalis* in vitro
Lima-2014

1.3.2 Objetivos Específicos

- a) Hallar en qué concentraciones tiene más efecto antibacteriano el extracto etanólico de *Piper aduncum* (matico) sobre la *Porphyromonas gingivalis*
- b) Evaluar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Piper aduncum* (matico) en comparación con la clorhexidina frente a cepas de *Porphyromonas gingivalis*
- c) Evaluar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Piper aduncum* (matico) en comparación con el agua destilada frente a cepas de *Porphyromonas gingivalis*
- d) Determinar cuál es el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico del *Piper aduncum* (matico) a las 72 horas en comparación con las 96 horas frente a cepas de *Porphyromonas gingivalis*.

1.4 Justificación e Importancia

Bastara con observar a nuestro alrededor para tener una respuesta sencilla y lógica: ejercer la medicina en el Perú y otros países con niveles socio económicos parecidos al nuestro es todo un reto profesional pues el médico no puede circunscribirse a recetar, es necesario ubicarse en la realidad del paciente, que cuando proviene de estratos económicos deprimidos muchas veces no puede adquirir la receta completa para su tratamiento.⁵

La fitoterapia es una alternativa accesible, ventajosa y natural que cualquier profesional de la salud pondría en práctica, no solo en prevención de la enfermedad, sino también en la terapia de diversas patologías, reconocida a través de diversas investigaciones químicas, farmacológicas y seguimiento clínico en el Perú y el extranjero; y sobre todo por los menores riesgos de toxicidad de los pacientes cuando se utilizan correctamente, más aun considerando que el 80% de la población ya lo usa en mayor o menor grado, dentro de usos y costumbres de la medicina tradicional peruana.⁵

Es así que partiendo de un hecho anecdótico y las costumbres ancestrales de las personas, estamos tratando de demostrar si esta planta (*Piper aduncum*) es correctamente empleada o si sus efectos son reales y afecta a la bacteria que es importante en el campo de la odontología.

1.5 Limitaciones

- Los pocos estudios realizados con la planta *Piper aduncum* (matico) a nivel internacional y local, la cual impide obtener datos importantes para realizar este trabajo.
- Dificultad para la adquisición y mantenimiento de la *Porphyromona gingivalis*, por ser una bacteria Gram negativa, puesto que requiere mayor cuidado con el equipo.
- Mayor cuidado con la manipulación de las cepas de *P. gingivalis*
- Limitaciones económicas, por ser un proyecto costoso.
- Dificultad para los accesos al laboratorio.
- Dificultad para la identificación del tipo de planta en la región Huánuco, ya que requiere buen conocimiento botánico.

CAPITULO II.

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de Estudios Realizados

Ruiz, S “et al”. 2013.⁶ “Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos de *Piperaceae* y nisina en *Alicyclobacillus acidoterrestris*.”, Maringa, Brasil.

Acidoterrestris Alicyclobacillus es una bacteria aerobia Gram-positiva. Esta bacteria resiste temperaturas de pasteurización y de pH bajo y por lo general está implicada en el deterioro de zumos y bebidas ácidas. El objetivo de este estudio fue evaluar las actividades antibacterianas de la nisina y la especie *Piper* (*Piperaceae*) sobre *A. acidoterrestris*. La concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración bactericida mínima (MBC) se determinaron por el método de microdilución en caldo. La especie *Piper aduncum* tenía el MIC más bajo y una MBC de 15,6 mg / ml y fue seleccionado para el fraccionamiento. Se obtuvieron seis fracciones, y la fracción de diclorometano (F.3) tuvo el MIC más bajo / MBC (7,81 mg / mL). La fracción de diclorometano se fraccionado de nuevo, y un análisis espectral reveló que el compuesto se prenylated cromo (F.3.7). El método de tablero de ajedrez demostrado que el extracto crudo (CE) de *P. aduncum* más nisina tenía una interacción sinérgica (concentración inhibitoria fraccional [FIC] = 0,24). La actividad bactericida de (F.3.7) fue confirmada por la curva de tiempo-kill. *P. aduncum*, nisina, y cromo prenylated exhiben una fuerte actividad antibacteriana contra las esporas y células vegetativas de *A.*

acidoterrestres. Los resultados de este estudio sugieren que los extractos del género Piper pueden proporcionar una alternativa a la utilización de tratamiento térmico para el control de *A. deterioro*.

Leite, M “et al”. 2013.⁷ “La actividad antifúngica de los extractos de las hojas de Piper aduncum preparado por diferentes disolventes y técnicas de extracción contra dermatofitos Trichophyton rubrum y Trichophyton interdigitale” Sao Paulo, Brasil

Se evaluaron los efectos de diferentes técnicas de extracción de disolventes y sobre el perfil anti-Trichophyton y la actividad fitoquímica de los extractos de las hojas de Piper aduncum. Extracto de hecho por el método de maceración con etanol tiene un mayor contenido de sesquiterpenos y actividad antifúngica. Este extracto puede ser útil como un tratamiento alternativo para la dermatofitosis.

Melgarejo J “et al”. 2009.⁸ “Estudio químico biodirigido para la evaluación de actividad antimalárica de la especie vegetal Piper aduncum mediante el test FBIT”, La Paz, Bolivia.

Para la realización del presente trabajo, se utilizó hojas de la especie vegetal denominada Matico (Piper aduncum) que pertenece a la etnia Tacana, provincia Abel Iturralde del departamento de La Paz. El extracto orgánico y las fracciones de esta planta fueron evaluadas a través del test de inhibición de la

biomineralización de la ferro-protoporfirina-IX (FBIT), método "In vitro" (no directo), utilizado para la detección y evaluación de la actividad antimalárica.

Los resultados de la actividad antimalárica, se reportaron de acuerdo al valor de las Clso (concentración inhibitoria del 50% de la biomineralización de la FP-IX) donde el extracto crudo orgánico presenta un Clso de 2.24 mg/ml y del seguimiento biodirigido de separación por cromatografía líquida al vacío VLC, se logró purificar en 6 fracciones; que, incluyendo el extracto orgánico, presentan muy buena actividad antimalárica con un Clso $< \text{Ó}$ igual a 5mg/ml, excepto la fracción F1, con un Clso de 5.60 mg/ml. La fracción más representativa F2 (40%), presenta una actividad antimalárica con un Clso de 1,12 mg/ml.

Arroyo, J “et al”. 2013. ⁹“Efecto antitumoral in vitro del aceite esencial de Piper aduncum L. (Matico) y su toxicidad oral en ratones”, Lima.

Introducción: Piper aduncum (matico) es una especie utilizada por sus propiedades medicinales en desórdenes gastrointestinales y genitourinarios.

Objetivos: Evaluar el efecto antitumoral del aceite esencial de Piper aduncum (matico) in vitro en siete líneas celulares tumorales humanas y determinar la toxicidad oral en ratones.

Diseño: Experimental. Institución: Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. Material biológico: Líneas celulares tumorales humanas H460, DU-145, ME-180, K562, HT-29, MCF 7, M14, K562; fibroblastos normales de ratón 3T3 y ratones albinos machos Balb/C53.

Intervenciones: Las líneas celulares fueron expuestas a cuatro concentraciones del aceite esencial de *P. aduncum* y 5 fluorouracilo (5-FU). Para la toxicidad oral se utilizó ratones albinos machos Balb C/53 de 40 días post destete, a cinco dosis de tratamiento, evaluándose el número de muertes en cada dosis. Principales medidas de los resultados: Porcentaje de inhibición del crecimiento celular (IC50), dosis letal 50 (DL50).

Resultados: El aceite esencial mostró IC50 mayor a 250 ug/mL para las líneas celulares M-14 ($r = -0,99$; $p < 0,01$), DU-145 ($r = 0,99$; $p < 0,01$), ME-180 ($r = -0,99$; $p < 0,01$). Para líneas celulares tumorales H460 ($r = -0,99$; $p < 0,01$), MCF-7 ($r = -0,99$; $p < 0,01$), K562 ($r = -0,99$; $p < 0,01$), HT-29 ($r = -0,99$; $p < 0,01$), los niveles de IC50 estuvieron entre 20 ug/mL y 250 ug/mL. DL50 > 2 000 mg /kg.

Conclusiones: El aceite esencial de *P. aduncum* no presentó efecto antitumoral in vitro para las siete líneas celulares tumorales humanas y no fue tóxico

Matute, M. 2009 ¹⁰ “Evaluación In Vitro Del Extracto De Piper Angustifolium (Matico) Y La Clorhexidina Como Antisépticos Bucales.” **LIMA. 2009.**

Se evaluó el efecto antimicrobiano del extracto de *Piper angustifolium* en comparación con la clorhexidina al 0,12% frente a cepas de *Streptococcus mutans* y *Lactobacilos Casei* in Vitro; es un estudio de tipo longitudinal, experimental y comparativo; para lo cual se utilizaron 15 cultivos de *Streptococcus mutans* y 15 cultivos de *Lactobacilos Casei*. En todas las muestras se midió el halo de inhibición según los objetivos científicos y finalmente se comparara dichas

medidas. Se tomaron 100g de hojas secas y molidas que se maceraron con cantidad suficiente de alcohol de 96° por 8 días; luego se procedió al filtrado y desecación a temperatura ambiente por 4 días. Los resultados han demostrado que, el diámetro del halo de inhibición sobre el *Streptococcus mutans* a las 24 y 48 horas fue mayor en el extracto alcohólico de matico en comparación con el clorhexidine al 0,12 % y el diámetro del halo de inhibición sobre el *Lactobacilos casei* a las 24 y 48 horas fue mayor en el extracto alcohólico de matico en comparación con el clorhexidina al 0,12 %.

Calderón, A. 2010 ¹¹ “Actividad antibacteriana in vitro de soluciones de propóleo etanólico sobre dos bacterias periodontopatógenas frecuentes en la enfermedad gingivoperiodontal. Hospital Militar Central, Lima.

Determinar la actividad antibacteriana in vitro de soluciones de Propóleo Etanólico a diferentes concentraciones sobre dos bacterias periodontopatógenas frecuentes en la enfermedad periodontal, cuya población muestral estuvo conformada por 20 pacientes con Enfermedad periodontal atendidos en el Servicio de Periodoncia del hospital militar.

Se realizó una prueba piloto con Cepas ATCC Porphyromona gingivalis y Fusobacterium nucleatum para comprobar la actividad antibacteriana del Propóleo a sus diferentes concentraciones del 5% -15% - 30%, luego se procedió a la toma de muestras extraídas directamente de la placa subgingival del paciente con enfermedad Gingivo periodontal.

En condiciones de anaerobiosis las muestras fueron sembradas en cada placa utilizando el método de difusión de disco, una vez reactivadas las bacterias se procedió a preparar los pozos de sensibilidad para posteriormente realizar las lecturas de los diferentes halos de inhibición mediante un vernier, de las concentraciones de Propóleo Etanólico al 5%- 15%- 30%, así como de los Grupos control positivo y negativo.

Los resultados mostraron que todas las concentraciones de Propóleo Etanólico presentaron actividad antibacteriana; con promedios para el Propóleo etanólico al 5% de 17.15 mm, para el Propóleo Etanólico al 15% de 22 mm y en menor diámetro para el Propóleo Etanólico al 30% de 15.9 mm. Se concluye que el Propóleo Etanólico al 15% presentó una mayor actividad antibacteriana, mientras que al 30% se observó una disminución en esta, debido que a mayores concentraciones de Propóleo este tiende a saturarse y por lo tanto disminuir su actividad antibacteriana.

Purca, T. 2013 ¹² Efectividad antibacteriana "in vitro" del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre flora salival, Lima. En el Perú últimamente se han realizado diversos estudios en diferentes plantas medicinales, comprobándose las propiedades de sus componentes como: antibacterianas, antihemorrágicas, analgésicas, antiinflamatorias, etc. Debido a ello, estos estudios se han venido intensificando en los últimos años, lo que ha permitido identificar y aislar los principios activos responsables de su actividad

farmacológica dando lugar a variadas presentaciones avalando razonablemente su utilización. En el campo de la práctica odontológica, estas plantas han tenido todo tipo de uso, en especial en la parte preventiva como aditivos en los diversos productos de higiene oral con propiedades contra la halitosis, antiinflamatorios y antibacterianos y es sobre todo en esta última característica en que se han visto empíricamente y determinado metodológicamente. Sin embargo debido a la biodiversidad muchas de estas plantas no se han estudiado o recién se están empezando a estudiar especialmente en nuestro país. El *Rosmarinus officinalis* (romero), es una planta originaria del mediterráneo, cultivado en muchos países del mundo, planta rica en principios activos y con acción sobre casi todos los órganos del cuerpo humano. Al tener un alto contenido en aceites esenciales, cuyos ingredientes activos son flavonoides, ácidos fenólicos y principios amargos, genera una acción tónica y estimulante sobre el sistema nervioso, circulatorio y corazón, además de ser colerético, colagogo, antiespasmódico, diurético. Por lo que en los últimos años se han desarrollado una gran cantidad de aportaciones científicas que brindan amplia información de las aplicaciones del romero. Teniendo en cuenta que nuestra población necesita alternativas de costo reducido y alto beneficio para el tratamiento de lesiones bucales que lo haría accesible a las clases más populares. Por ello, este estudio tiene como objetivo determinar la efectividad antibacteriana del extracto etanólico de romero sobre flora salival.

2.2 BASES TEÓRICAS

PORPHYROMONAS GINGIVALIS

La *Porphyromonas gingivalis*, especie anaerobia negra pigmentada Gram- negativa que reside en el biofilm subgingival, este organismo normalmente crece sin oxígeno (o en presencia de concentraciones mínimas de oxígeno) y se encuentra en las bolsas periodontales anaeróbicas.

Además, se ha demostrado que este organismo tiene la capacidad de invadir y sobrevivir dentro de las células eucariotas¹³ es ampliamente reconocido como un contribuyente para el desarrollo de las infecciones periodontales junto con otros patógenos orales.¹⁴ Esto se debe a su arsenal de factores de virulencia especializados.¹⁵

P. gingivalis está presente en bolsas periodontales sometidos a destrucción, así como en los márgenes gingivales sanos.¹⁴

El mecanismo de la enfermedad periodontal con el desarrollo de esta bacteria no ha sido completamente aclarado, pero recientemente se ha propuesto una hipótesis, donde esta bacteria, llamada la piedra angular de la enfermedad periodontal, está vinculada con el deterioro del sistema inmunológico, haciendo que la periodontitis se encuentre en progreso.¹⁶

Su persistencia crónica en el periodonto depende de su capacidad para evadir la inmunidad del huésped sin inhibir la respuesta inflamatoria general.¹⁷

Hay evidencia emergente que la *Porphyromonas gingivalis*, un patógeno oportunista bien adaptado de la mucosa oral y constituyente importante de biofilms oral, mejor conocido por su participación en la periodontitis, puede ser un mediador importante en el desarrollo de una serie de enfermedades crónicas multifactoriales.¹⁸

Taxonomía

El Género bacteroide agrupó en su primera clasificación un conjunto de bacterias heterogéneas, con características de ser anaerobios obligados gram negativos, no esporulados y de forma bacilar, con la aplicación de nuevas técnicas de identificación a base de biología molecular como el ADN – ADN hibridación y estudio de su características bioquímica, se pudo identificar un grupo homogéneo de especies a partir de los bacteroides llamados porphyromonas.¹⁹

Morfología Y Estructura

Porphyromonas gingivalis es un bacilo corto o coco bacilo, que mide de 0.5 a 0.8 um por 1 – 3.5 um anaerobio estricto, gram negativo siendo considerado un comensal en la cavidad oral. Su pared celular presenta a nivel de la membrana externa la endotoxina, son capsulados, no esporulados, sin flagelos y abundantes fimbrias de diferentes tipos. A nivel superficial presenta vesículas que contiene una variedad de enzimas que juegan un rol importante en su virulencia. Así también producen múltiples enzimas con capacidad de degradar compuestos proteicos.¹⁹

Propiedades y Patogenicidad de la: *P. Gingivalis*

La perturbación de las células epiteliales por las bacterias es la primera etapa en la iniciación de los procesos inflamatorios e inmunes que eventualmente van a causar la destrucción de los tejidos que rodean y soportan los dientes que en última instancia resultan en la pérdida de dientes.

Las *Porphyromonas gingivalis* pueden invadir localmente los tejidos periodontales y evadir los mecanismos de defensa del huésped. Al hacer esto, se utiliza un panel de factores de virulencia que causan la liberalización de las respuestas inmunes e inflamatorias innatas. Las *Porphyromonas gingivalis* se adhiere rápidamente a la superficie de la célula huésped seguido por la internalización a través de bolsas lipídicas y la incorporación de la bacteria en los primeros fagosomas. Las *Porphyromonas gingivalis* activa la autofagia celular para proporcionar un nicho replicativo mientras que suprime la apoptosis. La vacuola de replicación contiene proteínas del huésped emitidos por la autofagia que se utilizan por este patógeno asaccharolítico de sobrevivir y replicarse dentro de la célula huésped. Cuando la autofagia es suprimida por 3 - metiladenina, interioriza los tránsitos de *Porphyromonas gingivalis* al fagolisosoma donde se destruye y degrada. Por esa razón, la supervivencia de *Porphyromonas gingivalis* depende de la activación de la autofagia y la supervivencia de la célula huésped endotelial.

La formación de biopelículas bacterianas y la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) contribuyen al potencial patogénico de *Porphyromonas gingivalis*.

Su persistencia crónica en el periodonto depende de su capacidad para evadir la inmunidad del huésped sin inhibir la respuesta inflamatoria general, que en realidad es beneficioso para esta y otras bacterias periodontales. De hecho, el exudado inflamatorio (fluido crevicular gingival) es una fuente de nutrientes esenciales, tales como péptidos y hierro hemoderivados.

Porphyromonas gingivalis contribuye a la patogénesis de la periodontitis agresiva mediante la inducción de altos niveles de citoquinas proinflamatorias, tales como IL 1 β e IL-6 por las células T auxiliares CD4 + periféricas.¹⁵

Virulencia Y Crecimiento De La *P. gingivalis*.

Se han descrito varios factores de virulencia para contribuir a la patogenicidad de *P. gingivalis*, incluyendo lipopolisacárido (LPS), fimbrias, hemaglutinina, hemolisina, y la Arg-X-(RGP) y Lys-X-específica (kcp) proteinasas de cisteína (gingipains) (13). Los principales factores de virulencia de *P. gingivalis* incluyen fimbrias, cápsula, vesículas de membrana externa, lipopolisacárido (LPS), los metabolitos tóxicos y proteinasas.⁴²

1. Cápsula:

Constituido por polisacáridos siendo un agente codificante de epimerasa *epsC* esencial para su síntesis existiendo 6 serotipos capsulares de K1 - K6. Este juega un rol importante en la evasión del sistema inmunológico, eludiendo la fagocitosis, opsonización y accionar del complemento.¹⁹

La presencia de una cápsula en la *P. gingivalis* también puede proteger contra el estrés oxidativo, Estos estudios demuestran que con una cápsula, no sólo se reduce la respuesta del huésped, pero se reduce la fagocitosis y hay un aumento en la supervivencia de las bacterias.¹³

2. Endotoxina: (LPS)

Presenta en la membrana externa de la bacteria, compuesta en parte del lípido A, que estaría participando en la interrupción de la homeostasis inmunológica del huésped, ocasiona inflamación gingival, asociada a la destrucción del tejido conectivo y la reabsorción del hueso alveolar por la activación de osteoclastos y causa la liberación de prostaglandina E2, así como el incremento de IL18 ILB¹⁹

El lipopolisacárido de *P. gingivalis* es un factor clave en el desarrollo de la periodontitis. Fibroblastos gingivales, que son los principales constituyentes de tejido conjuntivo gingival, puede interactuar directamente con *Porphyromonas gingivalis* y sus productos bacterianos, incluyendo lipopolisacárido, en las lesiones de periodontitis. La *Porphyromonas gingivalis* LPS induce citoquinas proinflamatorias, tales como IL-1 β , IL-6, e IL-8, que inducen la destrucción del tejido periodontal. *P. gingivalis* LPS inhibe la actividad de la fosfatasa alcalina, el colágeno de tipo 1 Alfa 1, y la producción de osteocalcina y la mineralización en los PDLSCs que son positivas para STRO-1 y SSEA-4. La *P. gingivalis* LPS también promueve la proliferación celular y produce IL-1 β , IL-6, e IL-8.¹⁵

3. Vesículas de la Membrana Externa:

Son sacos cerrados que se encuentran a un nivel más externo de la bacteria, presenta en su interior numerosas enzimas como: fosfolipasa C, proteasas, fosfatasa alcalina, hemolisina, lipopolisacáridos. Estas son liberadas, produciendo daño a las células periodontales y neutrófilos.¹⁹

4. Hemaglutininas:

Son proteínas codificadas por el gen *hag* estas pueden ser 5 de A-E, promueve la colonización por medio de la unión bacteriana a receptores oligosacáridos de células humanas.¹⁹

5. Fimbras:

Las bacterias comúnmente expresan apéndices proteicos en sus superficies exteriores. Una clase de polímeros extracelulares, conocido como pili o Fimbrias (apéndices no flagelares), es utilizado como apego y la invasión de las células huésped, la formación de biopelícula, la motilidad celular, y el transporte de proteínas y ADN a través de las membranas celulares.¹⁴

Fimbrias *P. gingivalis* parecen participar en casi todas las interacciones entre la bacteria y el huésped, al igual que con otras bacterias. Este patógeno expresa dos distintas fimbria- moléculas en su superficie celular, uno que se compone de una proteína de la subunidad (llamado Fim A o fimbrillin) codificada por el gen *fim A* , y denominado fimbrias largas, mientras que la

otra consiste en una subunidad Proteína Mfa codificada por el gen MFA1 y denominado corto , menor, o Mfa fimbrias,¹⁴ donde ambos están aparentemente involucrados en el desarrollo de la periodontitis.

Presentes en forma peritrica de 0.3 a 3.0 um de largo y 5nm de ancho, compuestos por monómeros de fimbrilina, codificados por el gen *fim A*, pudiéndose clasificar en 6 variantes, del tipo I al V y el Ib Estas presentan capacidad de unirse a diferentes sustratos, moléculas, y células epiteliales, fibrinógeno, fibronectina, lactoferrina. A su vez presenta propiedades quimiotácticas y de inducción de citoquinas. Se ha podido detectar a las *P. gingivales* con fimbrias *fim A* tipo II y IV en la progresión de la periodontitis y a las de tipo I, V en adultos sanos.¹⁹

Las fimbrias fueron reconocidas como un factor de virulencia crítico que influye la iniciación y progresión de la enfermedad, ya que se cree que desempeñan un papel importante en la colonización y la invasión de los tejidos periodontales.²⁰

- **Fimbrias Largas:** A las fimbrias largas se considera que son directamente responsables de muchas de las propiedades adhesivas del organismo, que se unen específicamente y la activación de diversas células huésped, tales como células epiteliales, endoteliales, y bazo, así como monocitos de la sangre, dando lugar a la liberación de citoquinas inflamatoria y varias adherencias moleculares.¹⁴

Nakagawa et al. Demostraron que la recombinación de la Proteína Fim A correspondiente a fim A genotipo II tiene una mayor capacidad de adherirse e invadir células epiteliales humanas que Fim A correspondiente a la proteína de otros genotipos. La patogenicidad de los diversos genotipos de fim A también se ha evaluado en modelos animales, con fim A genotipos II, Ib, y IV muestran que causan fuertes síntomas infecciosos y cambios inflamatorios en comparación con las cepas que albergan fim A genotipos I y III.¹⁴

- **Fimbrias Cortas:**

Mientras que las fimbrias de menor importancia son 80-120 nm de longitud y 3,5 - 6.5 nm de diámetro (Park et al, 2005).²¹

Las fimbrias largas promueven la formación inicial de biopelículas y luego actúan restringiendo la regulación sobre la maduración del biofilm, mientras que fimbrias cortas y Kgp tienen una supresiva y regulatoria función durante el desarrollo del biofilm.¹⁴

- **Participación de Fimbrias en la Formación de Biopelículas**

P. gingivalis es capaz de agregarse con diversas bacterias orales Gram-positivas y especies - negativos. Las fimbrias largas tienen una significativa distancia de la pared celular bacteriana, lo que sugiere que ellos son los primeros componentes bacterianos en interactuar con otras bacterias, así como con las células huésped.¹⁴

6. Proteínasas Cisteinproteasas: Las proteasas de cisteína de *Porphyromonas gingivalis* son productos extracelulares de un agente etiológico importante en las enfermedades periodontales. Muchas de las acciones in vitro de estas enzimas son consistentes con las características inflamatorias e inmunes desregulados observadas de la enfermedad.¹⁵

Son compuestos bacterianos que proporcionan nutrientes para el crecimiento bacteriano, produciendo un daño colateral al huésped, degradando colágeno de diferentes tipos. Estas proteínas son llamadas gingipains, produciendo el 85 % de la actividad proteolítica generada por *P. gingivalis* y el 100 % de la actividad tipo tripsina. Las gingipains son productos de 3 genes *rgpA*, *rgpB*, *Kgp*.²⁵ Se ha podido determinar que entre las acciones que producen están; la degradación de fibronectina, fibrinógeno y de las uniones de las células epiteliales, activación del sistema de coagulación y sistema calicreina quinina. Interrumpen en la defensa del huésped al degradar IL8, un importante quimiotáctico y C3 cuya activación produce C3a y C3b, este último un potente opsonizante.¹⁹

Estas enzimas están implicadas tanto en la destrucción de los tejidos periodontales y la interrupción de los mecanismos de defensa del huésped a través de la degradación de las inmunoglobulinas y factores del complemento que conducen finalmente a la progresión de la enfermedad.¹⁵

Gingipains están presentes en grandes cantidades en la superficie celular de *P. gingivalis*, y desempeñan un papel importante en la patogénesis de la

periodontitis por disregularización los mecanismos de defensa del huésped y diversas proteínas del huésped degradantes¹⁴. Las gingipains también juegan un papel en la limpieza bacteriana, incluyendo la captación de aminoácidos de las proteínas del huésped, la adquisición de hierro a partir de eritrocitos, y la maduración de las fimbrias.²²

7. Proteinasas no Cisteinproteasas:

Estas son la colagenasa, proteasa7, hemaglutinina11, una enzima tipo convertora de endotelina, una dipeptidilpeptidasa31 y la periodontina, esta última, degrada las proteínas desnaturalizadas y los polipéptidos.¹⁹

8. Inductor de Metaloproteinasas de la Matriz:

No es un producto generado por *P. gingivalis*, pero si lo induce, para que sea producida por fibroblastos, leucocitos y macrófagos. Estas metaloproteinasas degradan la mayoría de moléculas de la matriz extracelular, como el colágeno, fibronectina y la laminina.

P. gingivalis inactiva los inhibidores tisulares de metaloproteinasas, específicamente el tipo 1, que tiene mucha relación con la destrucción del colágeno tipo I y fibronectina.¹⁹

9. Rol del Hierro:

Utilizado por este patógeno en forma de hemo se ha demostrado que desempeñan un papel esencial en su crecimiento y la virulencia.

Porphyromonas gingivalis no produce sideróforos. En lugar de ello, se emplea a receptores específicos de la membrana externa, proteasas (en particular gingipains), y lipoproteínas para adquirir hierro / hemo.

Además, las actividades proteolíticas de gingipain R y gingipain K contribuyen al procesamiento / la maduración de varias proteínas de la superficie celular de *Porphyromonas gingivalis*, tales como fimA fimbriin (una subunidad de mayor fimbrias), proteína de 75 kDa (un ofminorfimbriae subunidad), hemaglutininas, y la proteína del receptor de hemoglobina, que son importantes para la bacteria de colonizar y proliferar en el surco gingival y para invadir el periodonto.¹⁵

Dentro de la disponibilidad de nutrientes la cavidad oral está en constante cambio, y como cualquier patógeno bien desarrollado la *P. gingivalis* ha ideado mecanismos para resistir este cambio. Como se observa, la *P. gingivalis* es capaz de controlar la expresión de varios factores de virulencia para sobrevivir en ambientes limitados de nutrientes. La adquisición de hierro, tanto para los humanos y los microbios, es una señal importante para alterar la expresión génica y la producción de proteínas; en las bacterias los mecanismos de adquisición de hierro se asocian específicamente con la modulación de la expresión de los determinantes de virulencia. Cuando el hierro es limitada, los cambios drásticos en la saliva resultado el perfil bacteriano, de manera que se produce un aumento en *Streptococcus*, *Gemella* spp., Y *Granulicatella* spp., Que pueden, a su vez, altera el paisaje del biofilm

oral. Si *P. gingivalis* es un residente de esta comunidad, será entonces, a su vez, alterada su expresión génica en respuesta a la proliferación de Gram positivos. Además, se ha demostrado que cuando *P. gingivalis* se cultiva en un biofilm con *T. forsythia*, hay distintos cambios en el proteoma, en particular para los procesos relacionados con la adquisición de hierro.¹⁹

Fisiopatología

P. gingivalis es considerado un colonizador secundario, comensal del surco gingival, que llega por contagio o transmisión por individuos infectados, por medio de la saliva principalmente. Su capacidad de adherirse principalmente por sus fimbrias peritricas tipo Ib, II así como por sus vesículas de membrana, hemaglutininas, cápsula, le permiten dar el primer paso en la colonización del surco, poder adaptarse e invadir las células epiteliales en un periodo aproximado de 20 minutos,³³ pudiendo replicarse dentro de ellas y diseminarse a las células de alrededor. Esta característica de invadir la célula, le da la capacidad de evadir las defensas del huésped. Así también su capacidad de degradar diversas proteínas, componentes del surco gingival, ligamento periodontal y hueso alveolar, además de alterar la respuesta innata y específica del anfitrión.

A todo esto se suma un factor huésped, que ante la presencia de esta bacteria, activa una diversidad de respuestas que pueden incrementar el proceso inflamatorio, presente en el surco, haciendo crónico el proceso de destrucción del periodonto.¹⁹

Aislamiento Bacteriano

P. gingivalis es un microorganismo anaeróbico estricto, que esta predominantemente en las bolsas periodontales, específicamente en el biofilm subgingival y es por eso que la muestra para su aislamiento es a partir del biofilm subgingival, que se toma con diferentes instrumentos, como curetas, cintas, conos de papel. Siendo el más utilizado el cono de papel número 30 ó 40, que se colocan dentro del surco o bolsa periodontal, por un periodo de 20 a 60 seg, para luego ser llevado a un medio de transporte como VMGA-III, BHI, Tioglicolato, y luego ser sembrado en medios enriquecidos como Agar sangre suplementado o el medio selectivo Agar Columbia antibiótico³⁷ e incubar a 37 °C por 7 a 14 días, en condiciones de anaerobiosis, que puede ser por Jarra, cámara o sobres de anaerobiosis.

Pasado el tiempo, la lectura de las colonias debe reconocer características como; tamaño de 1-2 mm, forma redonda, convexa y ser pigmentados de un color marrón a negro. La coloración gram debe evidenciar una morfología cocobacilar de 0.5x1-2 um y ser negativa.

Para la identificación final se puede utilizar, un kit de pruebas bioquímicas específicas, la prueba BANA: Benzoil- DL-Arginina-Naftilamida, los test serológicos tipo ELISA^{41, 42} y la prueba de fluorescencia negativa con UV. Las pruebas con base en la biología molecular como PCR (reacción en cadena de polimerasa), son muy utilizados en la actualidad por su alto porcentaje de especificidad y sensibilidad.¹⁹

Interacciones Microbianas de la *Porphyromona gingivalis*:

El establecimiento de una comunidad se considera que es esencial para el crecimiento y la supervivencia microbiana en la cavidad oral humana.

En el mundo natural, los microorganismos se organizan principalmente en las comunidades, y éstas a su vez se encuentran montados sobre soportes abióticos o de vida como biofilms. El biofilm comprende células microbianas incluidas dentro de una matriz que consiste en polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (Flemming y Wingender, 2010) derivados de fuentes de microbios y fuentes ambientales. La integridad de la comunidad de biopelícula se mantiene por adherencia microbiana, la señalización celular por medio del contacto de célula a célula, y la comunicación metabólica.

Microorganismos como el estreptococos y otros precursores proporcionan sitios receptores exclusivos para colonizadores más patógenos tardíos, tales como *Fusobacterium nucleatum* (He et al, 2012.), *Tannerella Forsythia*, *Treponema denticola*, y *Porphyromonas gingivalis* ((Kuboniwa y Lamont, 2010; Periasamy y Kolenbrander, 2010), que están estrechamente asociado con el desarrollo de la periodontitis. La adhesión de *P. gingivalis* a las bacterias anteriores promueve la colonización inicial, y en última instancia, facilita la destrucción periodontal.

Una interacción entre especies bien comprendida es entre la de *P. gingivalis* y el comensal oral de *Streptococcus gordonii*. Las Células de *P. gingivalis* muestran la unión preferencial a las superficies orales recubiertas con determinado *estreptococos*,

como *S. gordonii* y otros miembros del grupo oralis (Lamont et al., 1992). Es probable que esta interacción comienza principalmente en la superficie del diente supragingival, desde aquí, *P. gingivalis* puede extenderse lateralmente a la región subgingival a través de un incremento en la biomasa o por la dispersión de células como resultado de la liberación celular activa o pasiva por cizallamiento mecánico de la biopelícula supragingival. *P. gingivalis*, y algunos otros colonizadores secundarios tales como *Fusobacterium nucleatum* también pueden proporcionar funciones de puente mediante la expresión de múltiples adhesinas que se unen a otros colonizadores posteriores.

El crecimiento de bacterias dentro de una comunidad puede aportar ventajas metabólicas y acceso a los nutrientes que no estarían disponibles para los organismos planctónicos. Como algunas especies florecen dentro de la comunidad que liberan metabolitos que pueden ser utilizados por otros habitantes de la comunidad. En una biopelícula como heterotípicos, bacterias a menudo se colocan con otros constituyentes que son metabólicamente compatibles. Esta sinergia metabólica dentro de la comunidad puede permitir el desarrollo de una microbiota más compleja. Un ejemplo de sinergia metabólica se produce entre *T. denticola* y *P. gingivalis*. Cuando se cultiva en un biofilm de especies dobles, estos organismos producen una biomasa significativamente mayor que el total de los biopelículas individuales (Grenier, 1992). *P. gingivalis* produce ácido isobutírico que estimula el crecimiento de *T. denticola*, *T. denticola*, produce ácido succínico que aumenta el crecimiento de *P. gingivalis*. La proteinasa de tipo quimotripsina producido por *T. denticola* también

estimula la formación de un biofilm dual con *P. gingivalis* (Cogoni et al., 2012). La cooperación de *P. gingivalis* con otras especies orales tales como *F. nucleatum* también ha sido demostrado. La capacidad de algunas cepas de *F. nucleatum* de tolerar mayores concentraciones de oxígeno que *P. gingivalis* significa que *F. nucleatum* facilita la generación de condiciones de oxígeno reducido que promueven el crecimiento y la supervivencia de *P. gingivalis*. Esta modificación del microambiente por *F. nucleatum* puede permitir el crecimiento de otras especies orales estrictamente anaerobias (Kolenbrander et al., 1995). *F. nucleatum* también puede elevar el pH de su entorno a través de la generación de amoníaco, neutralizando el ácido producido por la fermentación de los microorganismos y la creación de un entorno más favorable para *P. gingivalis* y otros.

La colonización por los colonizadores pioneros tempranos, por ejemplo, estreptococos puede mejorar el crecimiento y la virulencia de bacterias potencialmente patógenas tales como *P. gingivalis* y *T. denticola*.

Pero también algunos estreptococos orales han demostrado tener un impacto negativo en la formación de biopelículas por *P. gingivalis*. El contacto con el colonizador por estreptococos después *S. cristatus* se ha demostrado que disminuir la expresión de Fim A, que codifica la principal adhesina fimbrial de *P. gingivalis*, y por lo tanto evita la acumulación de *P. gingivalis* sobre *S. cristatus* rico en sustratos. *S. intermedius* también produce arginina de aminasa que puede reprimir la expresión de ambos Fim A y MFA1 (fimbria menores) en *P. gingivalis*.²¹

Patologías Frecuentes Ocasionadas por la *Porphyromona gingivalis*:

Hay evidencia emergente que *La Porphyromonas gingivalis*, un patógeno oportunista bien adaptado de la mucosa oral y constituyente importante de biofilms orales mejor conocido por su participación en la periodontitis, puede ser un mediador importante en el desarrollo de un número de enfermedades crónicas multifactoriales y aparentemente no relacionados, tales como la artritis reumatoide y cánceres orodigestivos.¹⁵ y puede influir en la salud sistémica y aumentar el riesgo para aterosclerosis y diabetes,²³ y aumenta el desarrollo de la artritis inducida por colágeno.¹⁵

Una asociación estadísticamente significativa también se ha observado entre *P. gingivalis* en muestras de saliva y la enfermedad del hígado graso no alcohólico, fortaleciendo aún más el papel de *P. gingivalis* como factor de riesgo en múltiples enfermedades crónicas.¹⁸

1. Su Relación Con La Periodontitis

La placa supragingival en los adultos sanos se compone principalmente de especies Gram-positivas pertenecientes a los géneros *Streptococcus* y *de Actinomyces*, y al género Gram-negativas *Veillonella*, en los pacientes con enfermedad periodontal tienen una mayor proporción de Gram negativo, proteolítica, bacterias tales como *P. gingivalis* o *Tannerella forsythia*, así como especies de *Prevotella*, *Fusobacterium*, y *Treponema* en su placa subgingival, anaerobios clave que contribuyen a la progresión

de la enfermedad, en cuestión de cuáles son los factores desencadenantes que inducen un cambio de la salud oral de la enfermedad sigue siendo inexplicable. De hecho, estudios recientes realmente han desafiado el paradigma de que los pacientes con periodontitis están colonizados principalmente por especies Gram negativas como la *P. gingivalis* se describe mejor como un patobionte, es decir, un miembro natural de la microbiota humana que bajo ciertas perturbaciones en el huésped y / o microflora puede causar la patología.

Si bien se cree que la mayoría de personas albergan *P. gingivalis* en algún nivel en la boca, un cambio en la composición microbiana se asocia con el crecimiento y desarrollo de la periodontitis, es conocido por ser altamente proteolítica, activa cambios en las condiciones ambientales; importante, causando un aumento del pH, creando así un entorno más acogedor para muchos anaerobios Gram-negativos.²⁴

P. gingivalis es un organismo robusto que ha desarrollado numerosas estrategias para sobrevivir en el duro ambiente de la bolsa periodontal. Sus estrategias eficaces para facilitar la persistencia juegan un papel importante en la iniciación y progresión de las enfermedades periodontales en adultos.¹³

Se reconoce cada vez más que la periodontitis crónica no es una infección bacteriana en el sentido clásico, es decir, causada por una sola o un número limitado de agentes patógenos. Más bien, la enfermedad

periodontal es el resultado de una perturbación inducida en la comunidad polimicrobiana de la homeostasis en individuos susceptibles. Los Componentes bacterianos de estas comunidades a menudo presentan interacciones sinérgicas que pueden mejorar la colonización, la persistencia o la virulencia, algunas bacterias pueden estar involucradas en la ruptura de la homeostasis periodontal, mientras que otras pueden desencadenar la inflamación destructiva y a su vez interrumpe la homeostasis.²³

Además, *P. gingivalis* HRgpA y RgpB activan la protrombina para formar trombina, que, a su vez, genera C5a biológicamente activo el actuar como una convertasa C5. C5a potencialmente puede desempeñar un papel clave en la defensa del huésped frente a la infección. *P. gingivalis* no sólo pueden promover su supervivencia, sino también contribuir a la inflamación destructiva. La diafonía C5aR-TLR2 inducida por *P. gingivalis* también inhibe la IL-12p70 inducida de TLR2, pero aumenta la expresión de citoquinas inflamatorias y de resorción de hueso, tales como la IL-1 β , IL-6, IL-17, y TNF para causar la pérdida ósea inflamatoria.²³

Estos datos sugieren que las bacterias periodontales han desarrollado mecanismos para regular de forma proactiva la inflamación en su propio beneficio, ya que la destrucción del tejido les puede proporcionar los

nutrientes y nuevos nichos (como resultado de las bolsas periodontales profundas).²³

La periodontitis humana es probablemente la infección más común, una enfermedad inflamatoria crónica y se caracteriza por la destrucción de los tejidos de soporte de los dientes, incluyendo la reabsorción del hueso alveolar 1). La degradación del tejido Periodontal resulta principalmente desde la respuesta inflamatoria del huésped ante un conjunto de bacterias anaerobias gramnegativas subgingivales 2). Varios microbios orales han sido implicados en la periodontitis incluyendo el llamado grupo de 'complejo rojo "que comprende *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythias*, y *Treponema denticola* 3). La presencia de *P. gingivalis* está fuertemente correlacionada con la enfermedad y está considerado como una especie clave.¹⁷

El daño colateral resultante de la batalla entre el huésped y la flora es la pérdida de inserción clínica entre el diente y el hueso, debido a la migración apical del epitelio y tejido conectivo junto con la pérdida de hueso alveolar. En pacientes no tratados periodontales, más, la pérdida de inserción clínica y la inflamación periodontal en curso, genera una bolsa periodontal, que se manifiesta como un espacio más profundo por debajo de la línea de las encías que excede 3 mm de profundidad, medida desde el margen de la encía a la parte inferior del surco gingival.²⁵

Las regiones más profundas de la bolsa periodontal están protegidas de perturbaciones y es más probable que sea anaeróbico, rica en proteína de la sangre y suero, y tienen un pH estable, ligeramente alcalino. Las Bolsas periodontales profundas, evidentemente, proporcionan las condiciones ideales para la propagación de *P. gingivalis*.²⁵ Para establecer una infección crónica en un entorno hostil del huésped de la hendidura gingival, es imperativo que *P. gingivalis* encuentre maneras de evadir o deshabilitar los mecanismos de defensa del huésped con el objetivo de eliminarlo.¹⁷

Las tácticas de *P. gingivalis* para socavar la inmunidad innata puede promover la supervivencia de otros miembros de la comunidad del biofilm periodontal. Esta capacidad se ve reforzada por el hecho de la liberación de vesículas de membrana de *P. gingivalis* fácilmente difusibles que contienen factores de virulencia clave como gingipains, LPS, y fimbrias, que de este modo puede estar disponible para otras bacterias dentro de la misma biopelícula.¹⁷

Por lo tanto, es razonable sugerir que los patógenos periodontales han evolucionado en formas que les permiten no sólo soportar la inflamación, sino también se aprovechan de ella para promover su supervivencia y, colateralmente, infligir daño a los tejidos periodontales. En conclusión, la manipulación de patógenos de la inmunidad innata periodontal puede perturbar las interacciones homeostáticas entre el huésped y la bacteria, lo

que conduce a la inflamación crónica no protectora y no resuelta del periodonto.¹⁷

Una de las patologías más comunes en la cavidad oral es la periodontitis crónica, la cual presenta una etiología bacteriana predominante, siendo entre ellas, las que más destacan *P. gingivalis*, *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, que son considerados como el grupo agresivo en la lesión. Pero es la *P. gingivalis* la predominante en esta patología. En el Perú, según MINSA, la enfermedad periodontal, presenta una prevalencia de 85-87 %, no habiendo reportes de la periodontitis crónica, la cual se presenta en personas por encima de los 40 años. La bacteria una vez que llega a su habitat, se condiciona al medio para vivir en condiciones de oxidoreducción negativa, así como por su diversidad de factores de virulencia, rompe la homeostasis en el surco, generando una destrucción continua y agresiva de los tejidos de sostén del diente, llegando a degradar hueso y tejidos blandos. Esta destrucción va a generar signos clásicos como enrojecimiento perisulcular, incremento de la profundidad del surco gingival, sangrado al estímulo, movilidad de diversos grados, que con la cronicidad de la lesión puede perderse la pieza dentaria.¹⁹

2. P. Gingivalis y la Halitosis:

La causa principal del mal aliento es la microflora oral, que produce moléculas odoríferas volátiles, incluyendo compuestos de azufre y ácidos orgánicos.

Estudios recientes han indicado que la superficie dorsal de la lengua puede ser la fuente primaria de putrefacción microbiana en la boca. El papel de las bacterias específicas en la superficie de la lengua en la producción del mal olor no se ha entendido completamente in vivo. Varios estudios reportan una asociación significativa de organismos positivos BANA es decir; *P. gingivalis* y *B. forsythus* con el mal olor oral.

En otro estudio, se concluyó que las bacterias gram positivas contribuyeron poco a la producción del mal olor oral, mientras que las bacterias Gram negativas producen grandes cantidades de VSC (moléculas odoríferas volátiles); entre las bacterias gram negativas, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* y *T. denticola*, los periodontopatógenos son los principales contribuyentes.

Por ende el dentista / periodoncista debe hacer hincapié en las medidas de limpieza de la lengua, que reducirían la carga microbiana odorífera.²⁶

3. P. Gingivalis Asociada a la Periimplantitis:

Varios parámetros se han descrito para la determinación del éxito o el fracaso de los implantes dentales.

El propósito de un estudio fue comparar la tendencia de los dos patógenos periodontales para adherirse a colonizar y pilares de óxido de circonio y aleaciones de titanio, tanto en superficies duras y tejidos blandos. Entre estos *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis* han sido identificados como la especie más fuertemente asociados con la periodontitis y periimplantitis, Estos dos patógenos han demostrado ser capaces de invadir las células epiteliales bucales humanos.

La falta de una capa de cemento y de fibra de Sharpey en las superficies de los implantes hace que la invaginación epitelial se produce más rápido que los dientes naturales.²⁷

4. Enfermedades Cardiovasculares:

Varios estudios han informado de la detección de *P. gingivalis* en muestras recogidas de pacientes con enfermedades cardiovasculares. En una de esas, el 42% de la endarterectomía especímenes mostraron una asociación histológico de *P. gingivalis* con úlcera y la formación de trombos y encontraron que el 26% en la carótida muestras de endarterectomía fueron positivos.

El mencionado estudio demostró que aproximadamente el 50 % de los especímenes recogidos de biofilm dental de pacientes cardiovasculares fueron positivos para *P. gingivalis*, con fim A tipo II que se encuentra en 36 %, de tipo I en el 29%, y el tipo IV en 21 %. Estos hallazgos sugieren que las cepas con tipos de *fim A* específicos, tales como de tipo II y IV, se asocian con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.¹⁴

El lipopolisacárido sistémica baja estimula una respuesta inflamatoria en el ventrículo izquierdo a través de la metalo proteinasa que conduce a una disminución de la función cardíaca.¹⁵

5. Asociación de la *P. Gingivalis* con el Cáncer:

Un patógeno oportunista, la *Porphyromonas gingivalis*, ha surgido como un mediador potencial en la etiología de una variedad de enfermedades crónicas presumiblemente no relacionados, tales como la artritis reumatoide, enfermedades cardiovasculares, la diabetes y más recientemente, los diferentes tipos de cáncer orodigestivo.¹⁸

La importancia de la participación de *P. gingivalis* en el cáncer ha evolucionado en la última década. Cronológicamente estudios iniciales han comprendido mayor asociación epidemiológica y clínica entre microbioma oral, enfermedad periodontal o pérdida de dientes, con cánceres orodigestivo incluyendo cánceres de la cavidad oral, el tracto gastrointestinal y el páncreas.

Un estudio de 2012, que mide los anticuerpos del plasma a 25 bacterias orales en muestras de sangre pre-diagnóstico de 405 pacientes con cáncer de páncreas y 416 controles emparejados también indirectamente asociados *P. gingivalis* con un mayor riesgo de cáncer de páncreas. El estudio demostró una alta correlación de dos cepas de *P. gingivalis* (ATCC 53978 y 33277). Las personas con altos niveles de anticuerpos contra *P. gingivalis* ATCC 53978 tenían un doble riesgo más alto de cáncer de páncreas que los individuos con niveles más bajos de anticuerpos de *P. gingivalis*.¹⁸

PIPER ADUNCUM

Historia

En Flora de Perú, El Catálogo de las Angiospermas y Gimnospermas reporta unas 830 especies de Piperáceas, principalmente hierbas y arbustos (Brako y Zarucchi, 1993); este número se ve nutrido con nuevos registros y especies de manera continua, como se aprecia, por ejemplo, en el documento Diez años de adiciones a la flora de Perú (Ulloa et al., 2004), que añade 12 especies para el género *Piper* y 7 especies para el género *Peperomia* solamente en el lapso de una década. *Piper* es el género más rico en especies endémicas en el Perú.²⁸

Piper aduncum conocido también con el nombre de pañil o hierba del soldado, debido a que aliviaban las hemorragias causadas por enfrentamientos en la guerra.

Se dice que su nombre proviene de un soldado español llamado Matico que la descubrió accidentalmente curando heridos en Perú.²⁹

Según la leyenda esta planta fue descubierta por un soldado español herido llamado Matico. Es probable que aprendiera su uso de las tribus locales que aplicaban las hojas a las heridas para detener las hemorragias y comenzó a llamarse Matico o hierba del soldado. Fue introducida en la medicina de Europa y Estados Unidos por un médico de Liverpool en 1839, como hemostático y astringente para las heridas. En textos médicos norteamericanos, la United States Pharmacopoeia, de principios del siglo XIX ya aparece citada esta planta.³⁰

Conocido también como Matico, hierba del soldado, Palo del soldado, achotlín, cordoncillo, candelillo, higuillo, pimentero de hoja angosta, moho-moho. (21) Los sinónimos científicos de esta planta son *piper aduncun*, *piper angustifolium*, *piper elongatum* y *Artanthe elongata*.^{33,4} *Piper celtidifolium*.³¹

Taxonomía

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

Plantas vasculares

Superdivisión: Spermatophyta

Plantas con semillas

División: Magnoliophyta

Plantas con flores

Clase: Magnoliopsida

Dicotiledóneas

Orden: Piperales

Familia: Piperaceae

Género: Piper

Especie: P. aduncum³²

Descripción Botánica

Matico, hierba del soldado, Palo del soldado, achotlín, cordoncillo, candelillo, higuillo, pimentero de hoja angosta, moho-moho.³²

- **Árbol** de 3 - 5 m de alto y 8 - 15 cm de diámetro, ramificado en el segundo tercio, con el fuste nudoso.
- **Corteza externa** de color verde o gris pálido, con anillos horizontales en todo el fuste, distanciados unos 20 cm entre sí, con pequeñas fisuras separadas 1- 2 cm entre sí, y lenticelas poco protuberantes y equidimensionales, alargadas horizontalmente, de 0,2 - 0,5 cm de longitud, regularmente distribuidas, del mismo color que la corteza externa.
- **Corteza interna homogénea**, color verde o blanquecino; oxida a color marrón oscuro luego de unos cinco minutos de expuesta al aire; tiene olor fuerte, algo dulce y picante.
- **Ramita terminal** con sección circular, de 5 - 6 mm de diámetro, lenticelada, levemente fisurada, glabra, provista de nudos notables en la zona de

inserción de cada hoja, los entrenudos de 2 - 5 cm de longitud; prófalo ligulado - lanceolado, de 1,5 - 3 cm de longitud.

- **Hojas** simples, alternas y dísticas, de 12 - 17 cm de longitud y 3,5 - 5 cm de ancho, color verde o verde amarillento en el haz, verde más pálido en el envés, lanceoladas hasta oblongo - elípticas, el ápice acuminado, la base rotunda y en casos desigualmente cordulada, con uno de los lados 3 - 10 mm más corto que el otro, nervios secundarios 6 - 7 pares, pinnados, curvos, prolongados hasta la parte media o 2/3 de la lámina, el par superior fuertemente ascendente en ángulo de 60° con respecto al nervio principal, los nervios terciarios moderadamente reticulados; láminas cartáceas, haz pubérulo con pelos simples y cortos, envés con pelos simples y medianos; peciolo corto, de 3 - 6 mm de longitud, levemente pubescente, vaginado solamente en la base. Fig. 1
- **Inflorescencias** en espigas de color blanco hasta verde, péndulas, de unos 8 - 15 cm de longitud y 4 mm de diámetro, las flores densamente agrupadas en bandas transversales; pedúnculo de 12 - 15 mm de longitud, esparcidamente pubescente hasta glabrado.
- **Flores** pequeñas, rodeadas por brácteas irregularmente oblongas, densamente fimbriadas con pelos blanco, amarillentos en los márgenes, anteras con tecas de 0,2 mm de longitud, lateralmente dehiscentes.
- **Fruto** obovoide, algo redondeado a tetragonal visto desde arriba; estigmas, cortos y sésiles.⁴

Distribución Geográfica

P. aduncum crece en México, América Central, América del Sur y las Antillas; aunque se ha naturalizado en otras regiones como Indonesia, Malasia, Filipinas y en islas del Océano Pacífico. En Papua, Nueva Guinea, se le considera la planta invasora de mayor importancia.³⁴

En el Perú:

Departamentos de Amazonas, Ayacucho, Cuzco, Huánuco, Junín, Loreto, Madre de Dios, San Martín, Ucayali, Cajamarca, Lima, Lambayeque, Pasco y Piura, 0 – 3000 msnm.²⁸

Hábitat

El género *Piper* se distribuye en zonas pantropicales y subtropicales, la mayor diversidad de especies se encuentra en el neotrópico (700 subespecies), seguido del sur de Asia (300 subespecies).

El matico de la puna es una planta oriunda de América del Sur que crece en los lugares húmedos, junto a los arroyos y riachuelos³⁵ crece silvestre en los bordes de la vegetación boscosa, las áreas perturbadas abiertas, los bordes de caminos y cerca de corrientes de agua; prefiere las faldas de colinas calcáreas y los terrenos húmedos, llanos o de poca elevación. Se ha considerado también como una planta indeseable en los cultivos de cacao y de café.³⁴

Usualmente en suelos de textura arcillo arenosa, con pedregosidad media a alta.²⁸

Composición Química

El componente más importante, desde el punto de vista cuantitativo, y al que se atribuye en parte sus virtudes cicatrizantes, es el tanino. Esta sustancia se encuentra en una concentración de 5,7%.

Otros constituyentes importantes son varios tipos de alcaloides, a los que se les atribuye un efecto relajador de la musculatura lisa. Por último, se señala la presencia de numerosos glucósidos, especialmente de tipo flavonoides.

En *Piper elongatum* el compuesto principal es la Canfora (22.68%), el Canfene (21.18%), Isoborneol (11.53%). También presenta alfa pineno, mirceno, limoneno, borneol y terpinol acetato.

El aceite esencial contiene 5-metoxi-6 (2'-propen) - benzodioxole, dillapiol, etoxidillapiol, mirisicina y piperitona.

Sin duda, la principal propiedad medicinal de esta planta es la de ayudar en la cicatrización de todo tipo de heridas, ya sea externas o internas. De aquí deriva su utilidad en el tratamiento de la úlcera digestiva. Externamente, su efecto benéfico sobre heridas de lenta cicatrización es muy sorprendente, lo que ha contribuido en mayor medida a su gran reputación. El Padre Zinn (1929) le reconoce, además, bondades hemostáticas y un efecto benéfico en algunos trastornos de las vías urinarias. Sin embargo, la principal y que parece útil mantener en primer lugar es su propiedad vulneraria, vale decir, cicatrizante de heridas.

Fitoconstituyentes

Aminas: Presentes en gran cantidad de compuestos orgánicos, muchas veces les confieren su actividad fisiológica

Alcaloides: Medicinal. Por su actividad fisiológica diversa constituyen materias primas para la fabricación de medicamento

Esteroles: Medicinal. Forman parte de hormonas animales y vitaminas

Triterpenos: Medicinal e industrial. Constituyen los llamados aceites esenciales, útiles en perfumería, farmacia y en la preparación de determinados alimentos

Glicósidos cardiotónicos: Medicinal. Estimulan la función cardíaca, son los llamados venenos del corazón

Saponinas: Medicinal e industrial. Precursores de hormonas esteroidales y corticosteroides. Por su actividad tensoactiva son útiles como emulgentes y hemolizantes

Fenoles simples: Medicinal e industrial. Poseen actividad antifúngica, desinfectante y aromatizante

Flavonoides: Medicinal e industrial. Reducen fragilidad capilar, protegen frente a estados tóxicos, antiinflamatorios y colorantes.

Taninos:

Medicinal e industrial. Propiedades astringentes y antisépticas. Útiles en la fabricación de tintas y otros colorantes, para curtir pieles

Cumarinas:

Medicinal e industrial. Anticoagulante y aromatizante.²

Según Smith y Kassim que estudiaron esta especie en Australia, se sabe que los siguientes compuestos son constituyentes de esta especie:

Dillapiol, piperitona Pseudo-dillapiol y dihidrochalcona.³

El análisis fitoquímico determinó la presencia de quinonas, saponinas esteroidales, taninos, monoterpenos, alcaloides y flavonoides los cuales fueron identificados mediante reacciones químicas de identificación y análisis CCD en cromatoplasmas de sílicagel G-60 empleando agentes reveladores: luz visible, luz UV 254 y 366nm²

Tab. 1

PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

Actividad fungicida contra *Penicillium*, *Hyalopus* y *Hormodendrum*; actividad bactericida contra *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli*.

El componente más conocido y al que se debe la acción cicatrizante es el tanino. (5,7%), que reduce el tiempo de cicatrización de las lesiones⁴, los cuales poseen una acción inhibitoria sobre la Enzima convertidora de angiotensina³⁶

En un estudio microscópico, se observó que en todos los grupos había una capa de de granulación, en virtud a una reacción natural de cicatrización, siguiéndole los tratados por vía tópica, lo que evidencia una mayor velocidad de cicatrización por neofibrogénesis.⁴

El ácido artrántico, mucílagos, resinas, maticina y alcaloides que tienen un efecto relajador de la musculatura lisa y la vitamina K, con una acción antihemorrágica.³⁷

De forma interna:

Al contener taninos también ayudara a aliviar las diarreas, pero si se abusa puede ser irritante. Se utiliza para náuseas, dolor de estómago, vómito, tos, bronquitis, neumonía, infecciones urinarias, etc.

Los flavonoides, seguido por alcaloides, saponinas, taninos, aceites esenciales y esteroides; ha demostrado un efecto antihipertensivo relativamente efectivo con el extracto etanólico de matico.³⁶

El alto contenido de flavonoides, inducen la relajación de los vasos sanguíneos al favorecer la presencia de algunas moléculas vasodilatadoras, como la acetilcolina, adenosin trifosfato (ATP) y adenosin difosfato (ADP), la sustancia P, bradiquinina, histamina, trombina, serotonina y otras

Los flavonoides son capaces de incrementar la actividad del promotor de la sintasa del óxido nítrico endotelial, incrementando así la producción de óxido nítrico en cultivos celulares de células endoteliales humanas

La presencia de alcaloides en el extracto etanólico de matico sugiere su capacidad de activar los receptores colinérgicos muscarínicos, lo cual conlleva a un incremento del calcio intracelular de las células endoteliales.³⁶

En la presente investigación se ha comprobado que las hojas de *Piper angustifolium* o *aduncum* bajo las formas de extracto acuoso y extracto alcohólico han mostrado eficacia farmacológica como cicatrizante. Un estímulo (mecánico, físico, químico o biológico) sobre la membrana celular induce aumento de la actividad de la fosfolipasa A2, liberación de histamina del mastocito, activación de la cascada del ácido Araquidónico, y un incremento de otras sustancias vasoactivas, Goodman y col. (1996). Por otro lado se demostraron que los flavonoides del tipo de las chalconas y sus derivados flavonas, inhibieron la peroxidación enzimática; evidenciando que la chalcona 3b presentaba una disminución dependiente de la dosis referente a la actividad de la fosfolipasa A2, la generación del TXB2 de las plaquetas humanas y degranulación del neutrófilo humano. Esta chalcona ejerce un efecto antiinflamatorio tópico en ratones; estos hallazgos explicarían el efecto cicatrizante obtenido en ratones.³⁸

Al *Piper aduncum*, popularmente conocido como matico, se le atribuyen propiedades medicinales como antisépticas y cicatrizantes de heridas; usado en problemas

intestinales, erisipelas, desordenes hepáticos, contiene flavonoides y compuestos fenólicos, y estos metabolitos le confieren efecto antioxidante y protector del hígado frente a los agentes tóxicos. También contiene taninos, los que poseen propiedades similares a la de los flavonoides sobre los radicales libres de oxígeno, y por consiguiente actividad hepatoprotectora.³⁹

Usos Y Aplicaciones

- **Aftas o úlceras de la boca.**

Hacer gárgaras con la infusión durante 3 días. Además mascar la hoja y ponerla en contacto con la zona inflamada.

- **Cicatrizante.**

Especialmente del ombligo de los niños. Aplicar el polvo de la planta seca machacada sobre la zona afectada.

- **Conjuntivitis.**

Hacer lavados con la infusión.

- **Cortes y raspones.**

Hacer lavados con la infusión.

- **Diarrea.**

Sobre todo la infantil. Beber la infusión como agua de tiempo.

- **Digestivo.**

Tomar la infusión de 15g de hojas por taza de agua, 3 x 4 veces al día.

Además, frotar 2 o 3 hojas cocidas a fuego lento sobre el estómago.

- **Encías, sangrado**

Hacer gárgaras con la infusión.

- **Faringitis.**

Hacer gárgaras con la infusión.

- **Infecciones vaginales.**

Hacer lavados y baños de asientos con la infusión de matico y malva. No realizar durante la menstruación.

- **Infecciones de las vías urinarias**

Tomar la infusión como agua de tiempo.

- **Inflamación de la boca.**

Hacer gárgaras con la infusión.

- **Inflamación de la piel.**

Hacer lavados con el cocimiento o aplicar las hojas cocidas directamente sobre la zona afectada.

- **Inflamaciones respiratorias.**

- **Tos.**

- **Úlceras gástricas.**

También el té de Matico se emplea en la higiene femenina como desinfectante, se emplea para combatir las hemorragias de las mujeres, cólicos y tumores de la matriz.

Son admirables las propiedades medicinales del Matico en el tratamiento de flujos blancos y amarillos de las mujeres. En este caso, los lavados deben ser practicados con igual cocimiento del Matico y de agua pura.

Para tratar las inflamaciones de la garganta se hacen gárgaras, cada dos horas, con igual cocimiento.

Las partes empleadas son las flores y hojas en infusión.

Lo usan mayormente las personas que viven en el campo en forma de té o como unguento para aliviar las heridas.²⁹

La madera es usada eventualmente como combustible. Las hojas y ramitas tiernas en infusión se emplean en la Amazonía peruana como un tónico para mitigar la fiebre, inflamaciones, afecciones urinarias, amigdalitis, cistitis, diarreas y estreñimiento; también como diurético (IIAP, 2010)²⁸

Preparación

- **Úlceras del estómago:**

Las hojas secas en infusión a dosis de 20 gramos por litro de agua.

- **Heridas Y Llagas:**

Cocimiento ligero de 40 gramos de hojas secas en un litro de agua. Aplicar en lociones o lavativas en heridas o llagas de cualquier tipo.

- **Para uso tópico, en gárgaras:**

Se prepara una infusión de una hoja fragmentada, en ½ taza de agua bien caliente. En estado tibio se pueden hacer gárgaras para aliviar las inflamaciones de la garganta. Actúa como anti inflamatorio y antiséptico.

- **Como vulnerario:**

Se prepara una decocción de unas 3 o 4 hojas y al enfriar, hacer lavado de las heridas externas. Si se cuenta con polvo preparado de las hojas secas, se espolvorea, para obtener el efecto cicatrizante. La infusión de las hojas solas o conjuntamente con las de malva de olor es muy efectiva para los lavados vaginales en los casos de trichomoniasis (picazón y descensos). Una infusión de 10 a 30 gramos de hojas frescas en 250 cc de agua en dosis de una a 3 copitas por día se aconseja en las disenterías, diarreas y el cólera morbos. Los frutos son utilizados como diuréticos, y en las infecciones venéreas. El cocimiento de la raíz, como desobtruyente de las vías urinarias.

- **Antiinflamatorio:**

Colocar las hojas sancochadas sobre las heridas, son eficientes antiinflamatorios.

- **Pomada:**

La pomada se realiza en dos etapas: - Maceración: Se dejan en remojo 100 gramos de hojas de matico en medio litro de alcohol, por una semana. -

Elaboración de la pomada: Colar el macerado y filtrar con un paño limpio o filtro de papel. Se calienta a baño María medio kilo de vaselina sólida y se le agrega el filtrado. Se revuelve hasta lograr una mezcla homogénea. Aplicar sobre la lesión, después de lavar la herida. Su aplicación, como se ve, es la curación de heridas.³⁸

La especie vegetal *Piper aduncum* fue seleccionada para realizar la purificación preliminar biodirigida de los posibles metabolitos responsables de la actividad antipalúdica, ya que estudios bibliográficos indican que presenta además actividad biológica contra hongos (*Neurospora crassa*, *C. albicans*), y bacterias (*B. subtilis*, *S. aureus*).²⁰

Usos de Matico en la Odontología:

Lents et al, estudiaron las plantas medicinales y mostraron que el extracto de *P. aduncum* es activo frente a *S. aureus*, *B. subtilis* y *Mycobacterium*. Además, el extracto de las hojas de *P. aduncum* probados contra nueve cepas bacterianas diferentes fue significativamente más activo frente a bacterias Gram -positivas y bacterias Gram- negativas.

La actividad antimicrobiana del extracto de *P. aduncum* no está limitado a bacterias y hongos. Su actividad también ha sido demostrada para poliovirus y *L. amazonensis*. El amplio espectro de actividad del extracto de *Piper aduncum* ayuda a explicar el uso generalizado de esta planta entre las poblaciones de los diferentes países.³⁷

La evaluación de la actividad bacteriostática in vitro de los aceites esenciales de *Piper angustifolium* sobre *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* realizada por Tirillini mostró que esta especie posee dicha actividad sobre estos bacilos gram negativos.⁴⁰

En un estudio se evaluó la actividad antimicrobiana de 92 plantas medicinales de Honduras, el extracto de etanol de *P. aduncum* mostró eficacia más amplia contra hongos y bacterias; sin embargo, cuando se mide en las bacterias orales, no fue capaz de inhibir el crecimiento de *S. mutans*, pero inhibió el crecimiento de *S. sanguis* y otras bacterias (tales como *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. intermedia*)³⁷

En Brasil se usa además contra la diarrea y la disentería, para dolores de muela, carminativo y antiulceroso.

Vásquez S. utilizó el aceite esencial de *piper angustifolium* (matico) para comprobar su efecto fungicida sobre *Candida albicans* en prótesis dentales.⁴¹

En la determinación de la toxicidad oral del aceite esencial de *Piper aduncum* (matico) administrado por vía oral en ratones, no se tuvo muertes hasta los quince días de observación y sin evidencia.⁴⁰

2.3 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS

Efecto antibacteriano:

Capaz de inhibir el crecimiento y desarrollo de bacterias (bacteriostático) o su eliminación (bactericida) sin dañar el organismo infectado, como los antibióticos.

Porphyromona gingivalis:

Bacteria "roja" y "trapezoidal" en el inicio de la periodontitis del adulto crónica. A pesar de que se encuentra en baja abundancia en la cavidad oral, que causa un cambio microbiano en la cavidad oral

Piper Aduncum

Piper aduncum, llamada popularmente matico, hierba del soldado, achotlín o cordoncillo, es un árbol perenne de la familia de la pimienta (piperácea). Crece silvestre en costas y selvas de Centroamérica y Suramérica y en los valles interandinos hasta los 3.000 msnm.

Extracto Etanólico

Consiste en poner en contacto la droga con un disolvente (en este caso alcohol), en proporción variable, capaz de solubilizar los principios activos.

Halo De Inhibición: Zona alrededor de un disco embebido de extracto etanólico de piper aduncum (matico) en el que no se produce crecimiento bacteriano.

2.4 HIPÓTESIS:

HIPOTESIS GENERAL

H1: El extracto etanólico de *Piper aduncum* posee efecto antibacteriano frente al crecimiento de cepas de la *Porphyromona gingivalis* (estudio in Vitro)

H0: El extracto etanólico de *Piper aduncum* no tiene efecto antibacteriano frente al crecimiento de cepas de la *Porphyromona gingivalis* (estudio in Vitro)

2.5 SISTEMA DE VARIABLES

- **Variable independiente:**

Extracto etanólico de *Piper aduncum* (matico)

- **Variable dependiente:**

Efecto antibacteriano sobre la bacteria *Porphyromona gingivalis*.

2.6 DEFINICIÓN OPERACIONAL DE VARIABLES, DIMENSIONES E INDICADORES

VARIABLE	DIMENSION	INDICADOR	CATEGORIA	ESCALA	INSTRUMENTO
Tipo de sustancia empleada	Extracto de etanólico <i>Piper aduncum</i>	Concentración del extracto	<ul style="list-style-type: none"> • 0.5% • 0.25% • 0.062% 	Nominal Ordinal	Registro de aplicación del experimento
	Clorhexidina	Concentración estandarizada de la clorhexidina	0.12%	Nominal Categoría	Registro de aplicación del experimento
	Agua destilada	Concentración estandarizada	5ml	Nominal Categoría	Registro de aplicación del instrumento
Efectividad Antibacteriana (IN VITRO)	Reducción del crecimiento mínimo bacteriano	Medición de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano	<ul style="list-style-type: none"> • 72 horas • 96 horas 	Nominal Ordinal	Registro de aplicación del experimento

CAPITULO III

MARCO METODOLOGICO

3.1 Tipo de estudio

Nivel: Tecnológico Intermedio

Tipo: Cuantitativo

3.2 Diseño de la investigación

Cuasi Experimental: porque se manipuló intencionalmente las condiciones de la investigación (variable independiente) y se analiza sus efectos sobre la variable dependiente.

Según el periodo en que se capta la información:

Prospectivo: porque los datos serán registrados conforme a la ocurrencia de los hechos.

Longitudinal: Cuando el interés del investigador es analizar los datos a través del tiempo en determinadas variables.

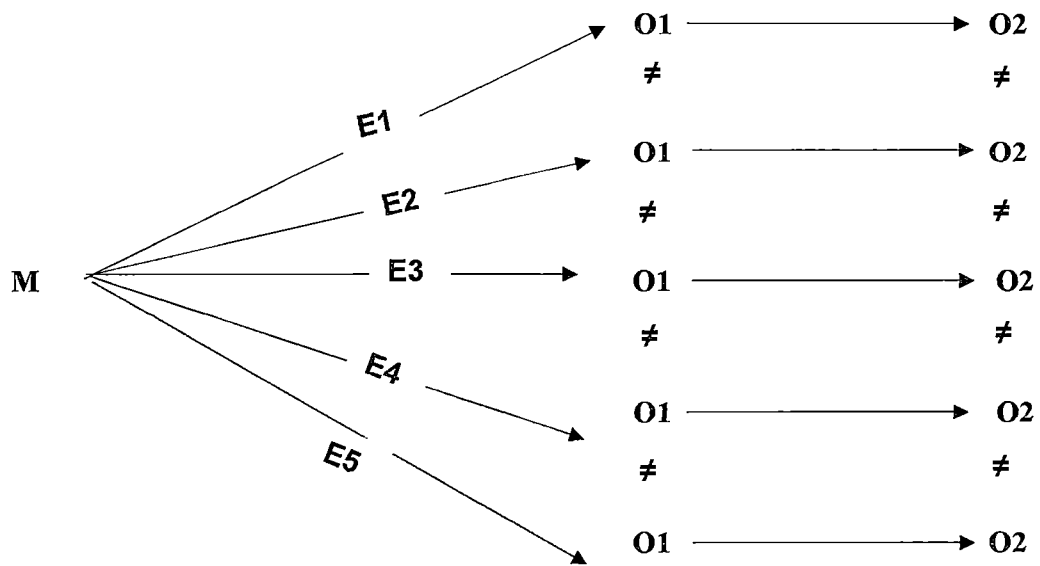
Según los objetivos de la investigación:

In Vitro: debido a que el estudio lo realizaremos en medios de cultivo que servirán para el desarrollo de las bacterias, que son manejados en el laboratorio.

Según la comparación de las poblaciones:

Comparativo: Porque compara y contrasta los efectos de la variable independiente en diferentes situaciones.

Dibujo del Diseño



- M** = Grupo experimental
- E1** = 0.5%
- E2** = 0.25%
- E3** = 0.062%
- E4** = 0.12%
- E5** = 5ml
- O1** = Experimento a las 72 horas
- O2** = Experimento a las 96 horas

3.3 Determinación del universo y población

Universo:

Microorganismos presentes en la cavidad oral, causantes de diversas patologías

Población Muestral:

Cepas de *Porphyromonas gingivalis*.

3.4 Selección de la Muestra:

Muestra:

Conformada por 20 cultivos de Cepas de *Porphyromonas gingivalis*

Método de selección:

Muestreo no probabilístico: intencional y por conveniencia.

3.5 Fuentes, técnicas e instrumentos de recolección datos:

- Fuentes:

Observación

- Prueba Antibacteriana

Medición del halo de inhibición bacteriana.

- Método:

Encuesta Etnobotánica

Procesamiento de datos

- Instrumento: Ficha de registro de medición de los halos inhibitorios. Tendrá la función de recolectar y registrar los datos sobre la medida individual de los

halos en mm, formados alrededor de cada pocillo presente en las placas sembradas.

A las 72 y 96 horas de haber realizado la siembra se procederá a hacer las lecturas y el llenado de la ficha de recolección.

IDENTIFICACIÓN DE LAS HOJAS Y ESPIGAS DE PIPER ADUNCUM

Para el proyecto se hizo una encuesta para determinar si la población de la ciudad de Huánuco, conocen y emplean la planta denominada matico. Se tomó una muestra del material a identificar, la cual se guardó durante 3 días en refrigeración y posteriormente se sometió a un secado con el fin de eliminar los posibles microorganismos que pueda contener y detener su deterioro. La muestra seca se comparó con los ejemplares previamente reconocidos que se encuentran en el herbario y de acuerdo a las similitudes que se encontraron, se clasificó. Esta caracterización se llevó a cabo en el herbario de la Universidad Privada Ricardo Palma – Lima (Perú), donde luego del reconocimiento de la planta se obtuvo la siguiente información general:

El Piper aduncum que pertenece a la familia de las piperáceas, es un arbusto de 2.5 a 3 metros de altura con ramas pubescentes, oblongolanceoladas, perfectamente acuminadas, peciolo de 0.5 c.m de largo, pubescente.

El material botánico se clasificó de la siguiente manera:

Clase: Dicotiledónea.

Orden: Piperales.

Familia: Piperaceae.

Género: Piper.

Especie: *Aduncum* L.

OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DEL PIPER ADUNCUM (MATICO)

La planta en estudio, *Piper aduncum* (matico) fue recolectada en el distrito de Coyllar, provincia de Ambo, departamento de Huánuco, a 3.050 msnm. Luego se trasladó a las instalaciones del Instituto de botánica de la Universidad Mayor de San Marcos para la obtención del extracto por el método de maceración.

Maceración

Para la obtención de los extractos etanólicos por éste método se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

- a) Recolección de la muestra.
- b) Pretratamiento: Limpieza y secado de la muestra

- c) Reducción de tamaño: se tomó las hojas secas y se procedió al molido
- d) Extracción: se pesó en gramos una cantidad de muestra (80 gr) y se depositó en los recipientes dispuestos para tal fin, se adicionó 400 ml de solvente etanol (96%) hasta cubrir completamente el material vegetal, se agitó y se tapó.
- e) Reposo: se dejó reposar por un período de 10 días, agitando esporádicamente el contenido.
- f) Obtención del extracto: se filtró el producto, y, se elimina el solvente con ayuda de un rotavapor, se envasó, pesó y almacenó el producto.
- g) Se realizó el tamizaje fitoquímico, ph y pruebas de solubilidad.

A partir de la masa de extracto seco de *Piper aduncum* se prepararon concentraciones de 150, 75, 18,75 mg en 3ml de dimetil sulfóxido las que fueron preservadas en frascos color ámbar estéril y conservado en refrigeración.

OBTENCIÓN DE LA BACTERIA

Se compró la bacteria *Porphyromona gingivalis* iofilizado en laboratorio reconocido THERMO SCIENTIFIC.

Porphyromonas gingivalis

(ATCC® 33277™)

Temperatura del almacenaje .Congelado: 80 °C o más frío liofilizado : 2 ° C a 8°

C. Nombre Depositado: Bacteroides gingivalis Coykendall et al.

Descripción de producto: La cepa es parte de un conjunto de organismos de control de calidad de los productos BioMerieux Vitek.

Propagación

Medio: SUPLEMENTO caldo de soja tríptico / Agar

Temperatura: 37 ° C

Atmósfera: mezcla de gas anaeróbico, el 80% N210% CO210% H2

Procedimiento De Reactivación de la Cepa

- Se abrió el vial de acuerdo a las instrucciones adjuntas
- Bajo condiciones anaeróbicas, se retiró del empaque y se procedió a reactivar la cepa en SCHAEHLER ANAEROBE AGAR que contiene 5% de sangre de carnero más vitamina k y hemina.
- Se colocó las placas en la JARRA DE ANAEROBIOSIS más el generador de condiciones anaerobias.
- Luego se incubó la bacteria en condiciones anaeróbicas a 37°C durante 10 días.

Siembra de la Muestra.

Mediante las asas se tomó una poco de la muestra de *Porphyromona gingivalis* y se colocó en caldo nutritivo (tioglicolato). Posteriormente se procedió hacer la siembra en agar SCHAEHLER por disseminación con un hisopo estéril sobre toda el área de la placa Petri. Se dejó de 3 – 5 minutos para el secado. Se realizó la lectura a las 72 y 96 horas.

PRUEBA DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Una vez realizada la siembra de la muestra en el Agar SCHAEGLER en la placa Petri, se procedió a la elaboración de seis pocillos, con un diámetro de 0.3mm, de 0.02 ml de capacidad. La distribución fue: 01 pocillo para el extracto etanólico del *Piper aduncum* al 0.5%, pocillo 02 para el extracto etanólico del *Piper aduncum* al 0.25%, pocillo 03 para el extracto etanólico del *Piper aduncum* al 0.062%, pocillo 04 para el control blanco de dimetil sulfoxido, pocillo 05 para la clorhexidina al 0.12 % que es el control positivo, y pocillo 06 pocillos para el control negativo de agua destilada.

Se marcó en la base de la placa una línea que indicaron la posición de los pocillos y el tipo de solución para cada uno. Así mismo se enumeró cada placa con números arábigos del 1 al 20 en relación al número de placas. Luego se colocaron en cada pocillo 0.02ml de cada una de las soluciones sobre la superficie del medio y se dejó reposar por 10 minutos antes de incubarlo.

Incubación

Posteriormente se procedió la colocación de las placas Petri en una jarra, incorporándole el generador de condiciones anaerobias y cerrándola herméticamente (método de la jarra de anaerobiosis) para después llevarla a la incubadora a 37 °C por 72 horas para luego proceder con la lectura.

3.6 Procesamiento, análisis y presentación de datos:

Una vez recolectados los datos fueron procesados y pasados a Excel, se usó la prueba de análisis de varianza (Anova) mediante el estadístico de Fisher (F) y el nivel de significancia fue usado a 0.05. Esta prueba se usó para comparar los promedios entre los 6 tratamientos.

También se usó la prueba de T de Student comparativo en los diferentes tamaños de los halos de inhibición en las 72 y 96 horas respectivamente.

CAPUTILO IV.

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

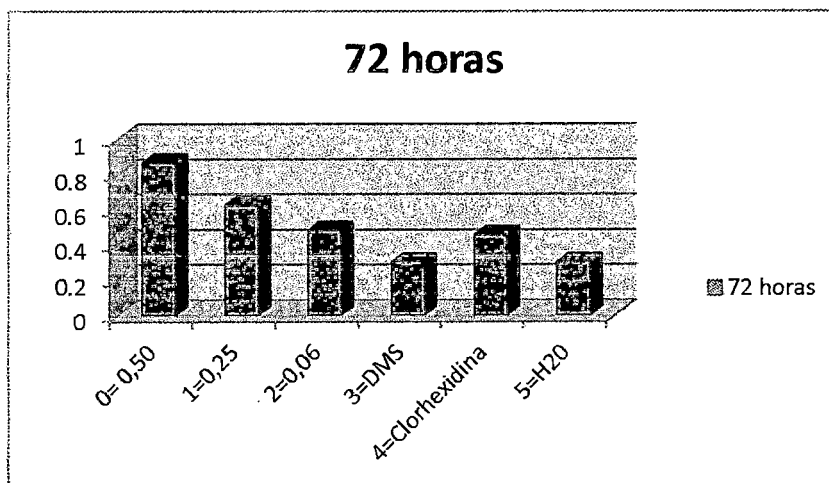
ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS:

CUADRO N° 01. Promedio de la medición de los halos inhibitorios en los cultivos de *Porphyromonas gingivalis*, según sustancia empleada, resultante de su aplicación a las 72 horas.

Tipo de Sustancia	mm
0=Extracto etanólico de <i>Piper aduncum</i> al 0,5%	0.865
1= Extracto etanólico de <i>Piper aduncum</i> 0,25%	0.625
2= Extracto etanólico de <i>Piper aduncum</i> 0,062%	0.48
3=Dimetil Sulfóxido	0.3
4=Clorhexidina 0.12%	0.455
5=Agua destilada	0.3

Fuente: Ficha de registro de observación.

GRAFICO N° 01. Promedio de la medición de los halos inhibitorios en los cultivos de *Porphyromonas gingivalis*, según sustancia empleada, resultante de su aplicación a las 72 horas.



Fuente: Cuadro N° 01.

Comentario:

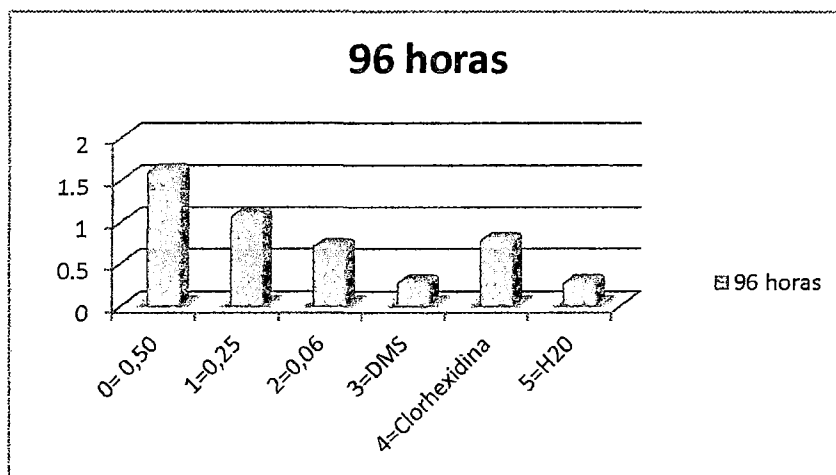
Hecha la lectura a las 72 horas de los halos de inhibición se encontró que cuando se emplea el extracto etanólico al 0.5% el halo de inhibición es 0.865, extracto etanólico al 0.25% el halo de inhibición es 0.625, extracto etanólico al 0.062% el halo de inhibición es 0.48, al emplear el grupo control blanco, dimetil sulfóxido, se produjo un halo de inhibición de 0.3, el halo de inhibición del grupo control positivo, la clorhexidina, es de 0.455 y el halo de inhibición del grupo control negativo, el agua destilada, es de 0.3.

CUADRO N° 02 Promedio de la medición de los halos inhibitorios en los cultivos de *Porphyromonas gingivalis*, según sustancia empleada, resultante de su aplicación a las 96 horas.

Sustancia Empleada	mm
0=Extracto etanólico de <i>Piper aduncum</i> al 0,5%	1.625
1= Extracto etanólico de <i>Piper aduncum</i> 0,25%	1.095
2= Extracto etanólico de <i>Piper aduncum</i> 0,062%	0.735
3=Dimetil Sulfóxido	0.3
4=Clorhexidina 0.12%	0.81
5=Agua destilada	0.3

Fuente: Ficha de registro de observación.

GRAFICO N° 02. Promedio de la medición de los halos inhibitorios en los cultivos de *Porphyromonas gingivalis*, según sustancia empleada, resultante de su aplicación a las 96 horas.



Fuente: Cuadro N° 02

Comentario:

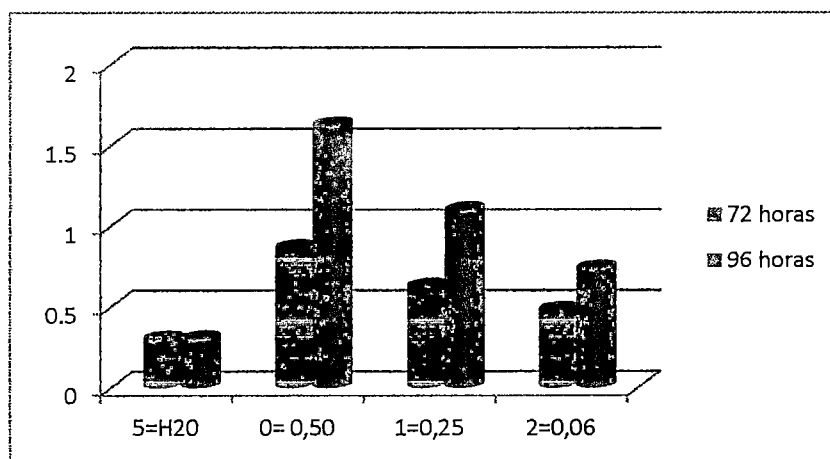
Hecha la lectura a las 96 horas de los halos de inhibición se encontró que cuando se emplea el extracto etanólico al 0.5% el halo de inhibición es 1.625, extracto etanólico al 0.25% el halo de inhibición es 1.095, extracto etanólico al 0.062% el halo de inhibición es 0.735, al emplear el grupo control blanco, dimetil sulfóxido, se produjo un halo de inhibición de 0.3, el halo de inhibición del grupo control positivo, la clorhexidina, es de 0.81 y el halo de inhibición del grupo control negativo, el agua destilada, es de 0.3.

CUADRO N° 03 Comparación de los promedios de la medición de los halos inhibitorios en cultivos de *Porphyromona gingivalis* aplicando el agua destilada (control negativo), a las 72 horas versus 96 horas.

Sustancia Empleada	72 Horas mm	96 Horas mm
5=Agua destilada	0.3	0.3
0= Extracto etanólico de <i>Piper aduncum</i> al 0,5%	0.865	1.625
1= Extracto etanólico de <i>Piper aduncum</i> 0,25%	0.625	1.095
2= Extracto etanólico de <i>Piper aduncum</i> 0,062%	0.48	0.735

Fuente: Ficha de registro de observación.

GRAFICO N° 03. Comparación de los promedios de la medición de los halos inhibitorios en cultivos de *Porphyromona gingivalis* aplicando el agua destilada (control negativo), a las 72 horas versus 96 horas



Fuente: Cuadro N° 03

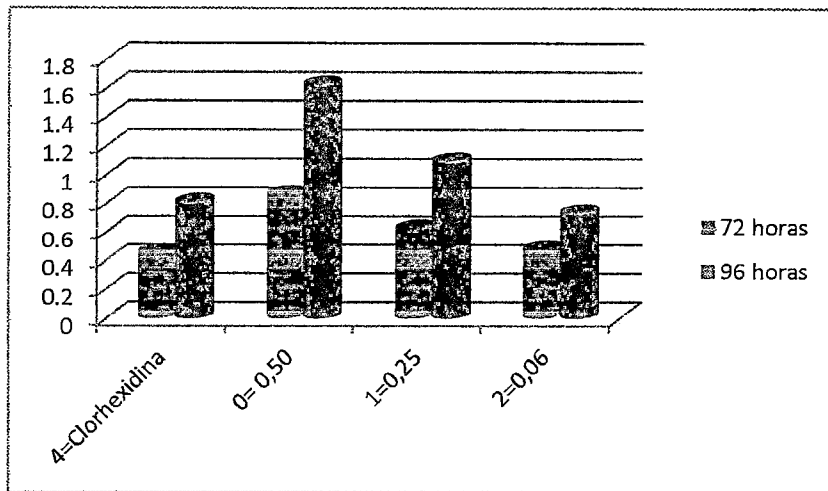
Comentario: La gráfica nos ilustra la comparación de los promedios de los halos inhibitorios en cultivos de *Porphyromona gingivalis* donde el agua destilada presenta un halo inhibitorio de 0.3 a las 72 horas, que se mantiene a las 96 horas. El extracto etanólico de *Piper aduncum* al 0,5%, presentó un halo de inhibición de 0.865 a las 72 horas y de 1.625 a las 96 horas. El extracto etanólico de *Piper aduncum* 0,25% presentó un halo de inhibición de 0.625 a las 72 horas y de 1.095 a las 96 horas. Y el extracto etanólico de *Piper aduncum* 0,062% % presentó un halo de inhibición de 0.48 a las 72 horas y de 0.735a las 96 horas.

CUADRO N° 04 Comparación de los promedios de la medición de los halos inhibitorios en cultivos de *Porphyromona gingivalis* aplicando la clorhexidina al 0.12% (control positivo), a las 72 horas versus 96 horas.

Sustancia Empleada	72 Horas mm	96 Horas mm
4=Clorhexidina al 0.12%	0.455	0.81
0= Extracto etanólico de <i>Piper aduncum</i> al 0,5%	0.865	1.625
1= Extracto etanólico de <i>Piper aduncum</i> 0,25%	0.625	1.095
2= Extracto etanólico de <i>Piper aduncum</i> 0,062%	0.48	0.735

Fuente: Ficha de registro de observación.

GRAFICO N° 04. Comparación de los promedios de la medición de los halos inhibitorios en cultivos de *Porphyromona gingivalis* aplicando la clorhexidina al 0.12% (control positivo), a las 72 horas versus 96 horas.



Fuente: Cuadro N° 04

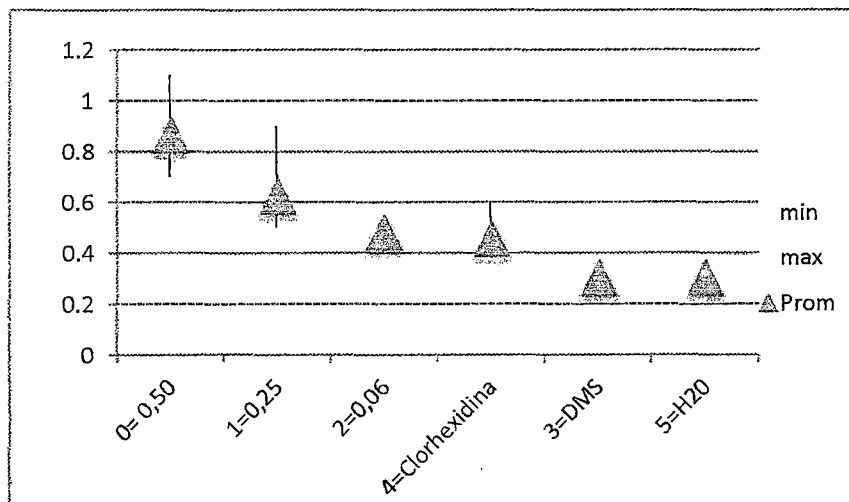
Comentario: La gráfica nos ilustra la comparación de los promedios de los halos inhibitorios en cultivos de *Porphyromona gingivalis* donde la clorhexidina al 0.12% presenta un halo inhibitorio de 0.455 a las 72 horas y de 0.81 a las 96 horas. El extracto etanólico de *Piper aduncum* al 0,5%, presentó un halo de inhibición de 0.865 a las 72 horas y de 1.625 a las 96 horas. El extracto etanólico de *Piper aduncum* 0,25% presentó un halo de inhibición de 0.625 a las 72 horas y de 1.095 a las 96 horas. Y el extracto etanólico de *Piper aduncum* 0,062% % presentó un halo de inhibición de 0.48 a las 72 horas y de 0.735a las 96 horas.

CUADRO N° 05. Comparación de las medidas mínimas y máximas de los halos inhibitorios de los Cultivos de *Porphyromona Gingivalis*, según sustancia empleada a las 72 horas.

Pruebas de Medias	Min	Max	Prom.
0=Extracto etanólico de <i>Piper aduncum</i> al 0,5%	0.7	1.1	0.865
1= Extracto etanólico de <i>Piper aduncum</i> 0,25%	0.5	0.9	0.625
2= Extracto etanólico de <i>Piper aduncum</i> 0,062% .	0.4	0.5	0.48
3=Dimetil Sulfoxido	0.3	0.3	0.3
4=Clorhexidina 0.12%	0.4	0.6	0.455
5=Agua destilada	0.3	0.3	0.3

Fuente: Ficha de registro de observación.

GRAFICO N° 05 Comparación de las medidas mínimas y máximas de los halos inhibitorios de los Cultivos de *Porphyromona Gingivalis*, según sustancia empleada a las 72 horas.



Fuente: Cuadro N° 05

Comentario:

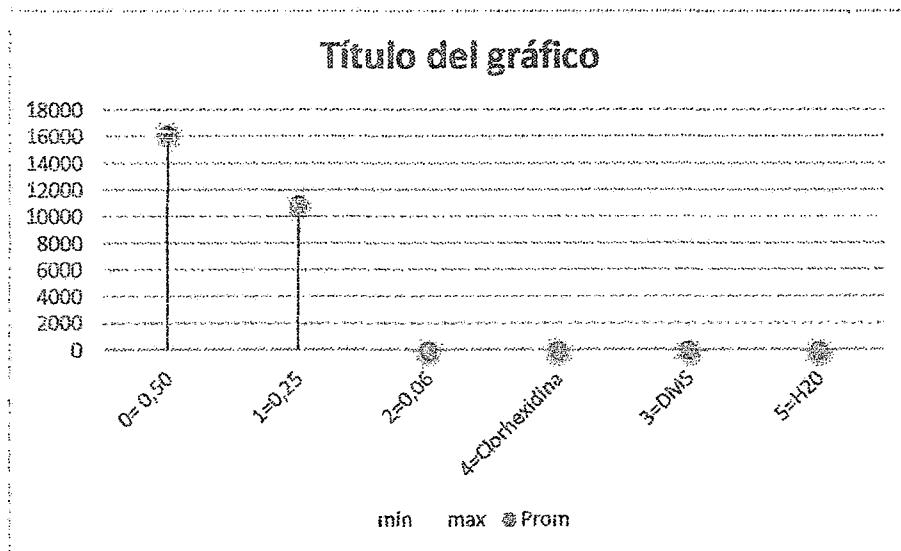
La gráfica nos ilustra que el halo de inhibición mínimo del extracto etanólico de *Piper aduncum* al 0,5% es de 0.7, el halo de inhibición máximo es 1.1, obteniendo un promedio de 0.865. El halo de inhibición mínimo del extracto etanólico de *Piper aduncum* al 0,25% es de 0.5, el halo de inhibición máximo es 0.9, obteniendo un promedio de 0.625. El halo de inhibición mínimo del extracto etanólico de *Piper aduncum* al 0,062% es de 0.4, el halo de inhibición máximo es 0.5, obteniendo un promedio de 0.48. El halo de inhibición mínimo del dimetil sulfóxido es de 0.3, el halo de inhibición máximo es 0.3, obteniendo un promedio de 0.3. El halo de inhibición mínimo de la clorhexidina al 0.12% es de 0.4, el halo de inhibición máximo es 0.6, obteniendo un promedio de 0.455. El halo de inhibición mínimo del agua destilada es de 0.3, el halo de inhibición máximo es 0.3, obteniendo un promedio igual a 0.3.

CUADRO N° 06. Comparación de las medidas mínimas y máximas de los halos inhibitorios de los Cultivos de *Porphyromona Gingivalis*, según sustancia empleada a las 96 horas.

Pruebas de Medias	Min	Max	Prom.
0=Extracto etanólico de <i>Piper aduncum</i> al 0,5%	1	2.4	16,250
1= Extracto etanólico de <i>Piper aduncum</i> 0,25%	0.7	1.4	10,950
2= Extracto etanólico de <i>Piper aduncum</i> 0,062%	0.5	1.2	,7350
3=Dimetil Sulfoxido	0.3	0.3	,3000
4=Clorhexidina 0.12%	0.4	2	,8100
5=Agua destilada	0.3	0.3	,3000

Fuente: Ficha de registro de observación.

GRAFICO N° 06 Comparación de las medidas mínimas y máximas de los halos inhibitorios de los Cultivos de *Porphyromona Gingivalis*, según sustancia empleada a las 96 horas.



Fuente: Cuadro N° 06

Comentario:

La gráfica nos ilustra que el halo de inhibición mínimo del extracto etanólico de *Piper aduncum* al 0,5% es de 1, el halo de inhibición máximo es 2.4, obteniendo un promedio de 16,250. El halo de inhibición mínimo del extracto etanólico de *Piper aduncum* al 0,25% es de 0.7, el halo de inhibición máximo es 1.4, obteniendo un promedio de 10,950. El halo de inhibición mínimo del extracto etanólico de *Piper aduncum* al 0,062% es de 0.5, el halo de inhibición máximo es 1.2 obteniendo un promedio de 7,350. El halo de inhibición mínimo del dimetil sulfóxido es de 0.3, el halo de inhibición máximo es 0.3, obteniendo un promedio de 0.3. El halo de inhibición mínimo de la clorhexidina al 0.12% es de 0.4, el halo de inhibición máximo es 2, dando un promedio de 8,100. El halo de inhibición mínimo del agua destilada es de 0.3, el halo de inhibición máximo es 0.3, obteniendo un promedio igual a 0.3.

ESTADÍSTICOS DE CONTRASTE

CUADRO N° 07. Contrastación estadística de la **Prueba T Student** aplicada para diferenciar las sustancias empleadas. Extracto etanólico al 0.5%

Estadísticos de grupo

	quimtotal	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
lec72y96	96 h	20	1,6250	,26926	,06021
	72 h	20	,8650	,12258	,02741

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)
lec72y96	3,105	,086	11,488	38	,000
			11,488	26,551	,000

Comentario: Hay diferencias entre 72 h y 96 h, siendo mayor a las 96 h el halo de inhibición

CUADRO N° 08. Contrastación estadística de la **Prueba T Student** aplicada para diferenciar las sustancias empleadas. Extracto etanólico al 0.25%

Estadísticos de grupo

	quimtotal	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
lec72y96	72 h	20	,6250	,07164	,01602
	96 h	20	1,0950	,31368	,07014

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)
lec72y96	69,343	,000	6,533	38	,000
			6,533	20,976	,000

Comentario: Hay diferencias entre 72 h y 96 h, siendo mayor a las 96 h el halo de inhibición

CUADRO N° 09. Contrastación estadística de la **Prueba T Student** aplicada para diferenciar las sustancias empleadas. Extracto etanólico al 0.062%

Estadísticos de grupo

	quimtotal	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
lec72y96	72 h	20	,4800	,04104	,00918
	96 h	20	,7350	,21831	,04881

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias			
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	
lec72y96	Se han asumido varianzas iguales	33,590	,000	5,134	38	,000
	No se han asumido varianzas iguales			-5,134	20,341	,000

Comentario: Hay diferencias entre 72 h y 96 h, siendo mayor a las 96 h el halo de inhibición

CUADRO N° 10. Contrastación estadística de la **Prueba T Student** aplicada para diferenciar las sustancias empleadas. Dimetil Sulfoxido.

Estadísticos de grupo

	quimtotal	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
lec72y96	72 h	20	,3000	,00000	,00000
	96 h	20	,3000	,00000	,00000

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)
Se han asumido varianzas iguales			,000	38	1,000
No se han asumido varianzas iguales			,000	38,000	1,000

Comentario: No Hay diferencias entre 72 h y 96 h en el halo de inhibición en el dimetil sulfóxido.

CUADRO N° 11. Contrastación estadística de la **Prueba T Student** aplicada para diferenciar las sustancias empleadas. Clorhexidina al 0.12%

Estadísticos de grupo

	quimtotal	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
lec72y96	72 h	20	,4550	,06863	,01535
	96 h	20	,8100	,46893	,10486

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)
lec72y96	14,479	,001	3,350	38	,002
			-3,350	19,814	,003

Comentario: Hay diferencias entre 72 h y 96 h siendo mayor a las 96 h el halo de inhibición

CUADRO N° 12. Contrastación estadística de la **Prueba T Student** aplicada para diferenciar las sustancias empleadas. Agua destilada.

Estadísticos de grupo

	quimtotal	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
lec72y96	72 h	20	,3000	,00000	,00000
	96 h	20	,3000	,00000	,00000

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)
lec72y96			,000	38	1,000
			,000	38,000	1,000

Comentario: No Hay diferencias entre 72 h y 96 h en el halo de inhibición.

CUADRO N° 13. Contrastación estadística de la **Prueba de Anova** aplicada para diferenciar los promedios inter e intra grupos, según la sustancia empleada.

ANOVA de un factor

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	4,623	5	,925	208,947	,000
lect72h Intra-grupos	,505	114	,004		
Total	5,128	119			
Inter-grupos	25,425	5	5,085	69,588	,000
lect96h Intra-grupos	8,331	114	,073		
Total	33,756	119			

Tabla de resultado de varianza de Fisher.

Comentario: A las 72 horas de exposición existen diferencias significativas en el promedio de los halos de inhibición de la bacteria *Porphyromona gingivalis* entre los 6 tratamientos (extracto etanólico al 0.5%, extracto etanólico al 0.25%, extracto etanólico al 0.062%, dimetil sulfóxido, clorhexidina al 0.12% y agua destilada) ($F = 208,947$) y ($p = ,000$)

A las 96 horas de exposición existen diferencias significativas en el promedio de los halos de inhibición de la bacteria *Porphyromona gingivalis* entre los 6 tratamientos (extracto etanólico al 0.5%, extracto etanólico al 0.25%, extracto etanólico al 0.062%, dimetil sulfóxido, clorhexidina al 0.12% y agua destilada) ($F = 69,588$) y ($p = ,000$)

CUADRO N° 14. Contrastación estadística de la prueba de Tukey aplicada para diferenciar los promedios de los halos de inhibición según sustancia empleada a las 72 horas.

Leyenda	
Extracto etanólico de <i>Piper aduncum</i> al 0,5%	0
Extracto etanólico de <i>Piper aduncum</i> 0,25%	1
Extracto etanólico de <i>Piper aduncum</i> 0,062%	2
Dimetil Sulfoxido	3
Clorhexidina 0.12%	4
Agua destilada	5

Sustancia empleada	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
3,00	20	,3000			
5,00	20	,3000			
4,00	20		,4550		
2,00	20		,4800		
1,00	20			,6250	
,00	20				,8650
Sig.		1,000	,842	1,000	1,000

Comentario:

A las 72 horas de exposición, según los halos de inhibición en la bacteria *Porphyromona gingivalis* entre los 6 tratamientos, resultaron 4 grupos:

- El primero grupo es el de menor halo de inhibición formado por el agua destilada y el dimetil sulfóxido
- El segundo grupo es la clorhexidina al 0.12% y el matico al 0.062%
- El tercer grupo formado por el matico al 0.25%
- Y el cuarto grupo el matico al 0.5%

Por ende se observa la secuencia de menor a mayor en diámetro de los halos de inhibición: agua= dimetil < clorexidina=extracto etanólico 0.062< extracto etanólico 0.25< extracto etanólico0.5

El cual demuestra que el extracto etanólico al 0.5% tiene mayor halo inhibitorio sobre las bacterias de *Porphyromonas gingivalis*.

químicos	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
3,00	20	,3000			
5,00	20	,3000			
2,00	20		,7350		
4,00	20		,8100		
1,00	20			1,0950	
,00	20				1,6250
Sig.		1,000	,951	1,000	1,000

Comentario:

A las 96 horas de exposición, según los halos de inhibición en la bacteria *Porphyromona gingivalis* entre los 6 tratamientos, resultaron 4 grupos:

- El primero grupo es el de menor halo de inhibición formado por el agua destilada y el dimetil sulfóxido
- El segundo grupo es la clorhexidina al 0.12% y el matico al 0.062%
- El tercer grupo formado por el matico al 0.25%
- Y el cuarto grupo el matico al 0.5%

Por ende se observa la secuencia de menor a mayor en diámetro de los halos de inhibición: agua= dimetil < clorexidina=extracto etanólico 0.062< extracto etanólico 0.25< extracto etanólico0.5

CAPITULO V

DISCUSIÓN

El presente trabajo tuvo como objetivo encontrar la acción antibacteriana del extracto de *Piper aduncum* en comparación con la clorhexidina al 0,12 % específicamente sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis*

En la presente investigación los resultados nos demostraron que existen diferencias significativas con respecto al tamaño de los halos de inhibición en las distintas concentraciones utilizadas del extracto etanólico de *Piper aduncum* (0.5% - 0.12% - 0.062%), se ha determinado que el extracto de *Piper aduncum* resulta ser más eficaz sobre estos microorganismos en comparación con la clorhexidina 0.12% en las dos mediciones horarias en que se realizó la lectura, lo que concuerda con los estudios realizados por **Matute, M.**¹⁰ que tratan sobre las propiedades antibacterianas del Extracto etanólico de *Piper aduncum* en bacterias anaerobias como *Streptococcus mutans* y *Lactobacilos Casei*, obteniendo también formaciones de halos inhibitorios, el diámetro del halo de inhibición sobre el estreptococos mutans a las 24 y 48 horas fue mayor en el extracto alcohólico de matico en comparación con el clorhexidina al 0,12 % y el diámetro del halo de inhibición sobre el lactobacilos casei a las 24 y 48 horas fue mayor en el extracto alcohólico de matico en comparación con la clorhexidina al 0,12 %

En nuestra investigación se emplearon concentraciones de 0.006 µg/mL, 0.025 µg/mL y 0.050 µg/mL las cuales son menores que las que empleó **Arroyo, J “et al”**. (2013)⁹ que evaluó el efecto antitumoral del aceite esencial de *Piper aduncum* (matico) in vitro en siete líneas celulares tumorales humanas y determinó la toxicidad oral en ratones. El Porcentaje de inhibición del crecimiento celular (IC50), dosis letal 50 (DL50). El aceite esencial mostró IC50 mayor a 250 µg/mL para las líneas celulares los niveles de IC50 estuvieron entre 20 µg/mL y 250 µg/mL. DL50 > 2 000 mg /kg. Y concluyó que el aceite esencial de *P. aduncum* no presentó efecto antitumoral in vitro para las siete líneas celulares tumorales humanas y no fue tóxico lo que nos indica que nuestras concentraciones tampoco serían tóxicas si se hacen pruebas en seres vivos

Los promedios de medición de los halos de inhibición para cada concentración de extracto etanólico que fue empleada en nuestra investigación mostraron que todas las concentraciones de extracto de *Piper aduncum* presentaron actividad antibacteriana; con promedios para el de extracto de *Piper aduncum* al 0.5% de 16.25 mm, para el extracto de *Piper aduncum* al 0.12% es de 10.95 mm y en menor diámetro para el extracto de *Piper aduncum* al 0.062 % es de 7.35 mm lo que difiere a la investigación de **Calderón, A.** que determina la actividad antibacteriana in vitro de soluciones de Propóleo Etanólico a diferentes concentraciones sobre dos bacterias periodonto patógenas frecuentes en la enfermedad periodontal, realizó una prueba piloto con Cepas ATCC *Porphyromona gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* para comprobar la actividad antibacteriana del Propóleo a sus diferentes concentraciones

del 5% -15% - 30%, y los resultados mostraron que todas las concentraciones de Propóleo Etanólico presentaron actividad antibacteriana; con promedios para el Propóleo Etanólico al 5% de 17.15 mm, para el Propóleo Etanólico al 15% de 22 mm y en menor diámetro para el Propóleo Etanólico al 30% de 15.9 mm. Se concluye que el Propóleo Etanólico al 15% presentó una mayor actividad antibacteriana, mientras que al 30% se observó una disminución en esta, debido que a mayores concentraciones de Propóleo este tiende a saturarse y por lo tanto disminuir su actividad antibacteriana; mientras que el extracto de *Piper aduncum* a más concentración mayor potencial antibacteriano.

Cabe resaltar que para la presente investigación utilizamos como control negativo agua destilada, y dimetil sulfóxido (solvente del extracto) la cual no formó halo inhibitorio en ninguno de los ensayos, manteniéndose como constante en 0 mm. Lo cual nos sirve a manera de control de calidad garantizando la siembra bacteriana y que la formación de los halos inhibitorios alrededor de los pocillos de las diferentes concentraciones de extracto de *Piper aduncum* y *clorhexidina* fueron formados por estas sustancias.

Finalmente esta investigación nos permite demostrar que el extracto *Piper aduncum* que se obtiene de la maceración las hojas de matico y etanol tiene efecto antibacterial sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis*, frente a la existencia de resultados con algunas semejanzas con otras sustancias, sería importante comparar nuevos resultados aplicando estas sustancias.

CONCLUSIONES

- El extracto etanólico de *Piper aduncum* (matico) tiene efecto antibacteriano sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis* y en las diferentes concentraciones de 0.5%, 0.25% y 0.062% %, independientemente, muestran un efecto inhibitorio.
- Las concentraciones del extracto etanólico de *Piper aduncum* de 0.5% y 0.25%, tiene mayor efecto antibacteriano que el grupo control positivo, la clorhexidina 0,12 % frente a cepas de *Porphyromonas gingivalis*.
- La concentración del extracto etanólico de *Piper aduncum* al 0.062% tiene igual efecto antibacteriano que el grupo control positivo, la clorhexidina 0,12 % frente a cepas de *Porphyromonas gingivalis*.
- Las concentraciones del extracto etanólico de *Piper aduncum* de 0.5%, 0.25% y 0.062% tiene mayor efecto antibacteriano que el grupo control negativo, el agua destilada, frente a cepas de *Porphyromonas gingivalis*.
- Existe un mayor efecto de antibacteriano del extracto etanólico de *Piper aduncum* al 0.5%, 0.25% y 0.062% a las 96 horas en comparación de las 72 horas en las cepas de *Porphyromonas gingivalis*.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda hacer un estudio de biocompatibilidad y citotoxicidad del *Piper aduncum*
- Se recomienda realizar estudios con respecto a la composición química del *Piper aduncum* con el fin de determinar el o los compuestos químicos que causan la acción antibacteriana.
- Realizar estudios para determinar las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (MIC) y Concentraciones Mínimas Bactericidas (MBC) del extracto etanólico de *Piper aduncum*.
- Se recomienda realizar trabajos comparativos entre las distintas especies del *Piper*.
- Realizar estudios *in vivo* del extracto etanólico de *Piper aduncum*, a fin de verificar, si con los resultados *in vitro* son similares.
- Comprobar el efecto antibacteriano del *Piper aduncum* en la preparación de pomadas, colutorios y pastas dentales para ser utilizadas en pacientes con enfermedad periodontal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Minsa [base de datos en línea]. Perú. 2014 [fecha de acceso 10 de noviembre del 2014]. URL disponible en: http://www.minsa.gob.pe/portada/est_san/saludbucal.htm
2. Zaa C, Valdivia M, Marcelo A, Efecto neuroprotector del extracto hidroalcohólico de Piper aduncum “matico” en un modelo in vitro de neurodegeneración. Rev. peru. biol. Diciembre 2012; 19(3): 235 - 240
3. Shimabukuro Yamashiro D, Torres López, E, estudio técnico de la extracción de aceites esencial de Piper Aduncum L. “matico” y diseño de planta piloto [tesis doctoral] Perú: universidad de ingeniería 1992.
4. MATICO (Piper aduncum) [base de datos en línea]. Milan. 2012. Taylor L. [fecha de acceso 29 de octubre del 2014]. URL disponible en: http://www.rain-tree.com/matico.htm#.VGPg_2fYjdW
5. Obregón Vilchez L. Uña de Gato. Perú: Instituto de Fitoterapia Americano; 2006.
6. RUIZ Sp “et all”, Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos de Piperaceae y Nisina en *Alicyclobacillus acidoterrestri*. *J Food Sci (Brasil)*. 2013; 78 (11):1750 -3841
7. Leite Santo, MMaximillian “es all”, La actividad antifúngica de los extractos contra dermatofitosis *Trichophyton rubrum* y

Trichophytoninterdigitale. Brazilian Journal of Microbiology (São Paulo)
2013 ; 44(4) : 1517-8382

8. Melgarejo P, José Antonio “es all”, Estudio químico biodirigido para la evaluación de actividad antimalárica de la especie vegetal Piper aduncum mediante el test FBIT. visión científica (Bolivia) 2006; 1(1):1 -6
9. Arroyo, J “et al”, Efecto antitumoral in vitro del aceite esencial de Piper aduncum L. (Matico) y su toxicidad oral en ratones. (Lima) Anales de la Facultad de Medicina, 2014, 75(1): 13-18
10. Matute Senteno Maria Elena. Evaluación In Vitro Del Extracto De Piper Angustifolium (Matico) Y La Clorhexidina Como Antisépticos Bucales. [Tesis para obtener el título de cirujano dentista]. Lima. UNFV, Facultad de odontología; 2009.
11. Calderón Puente de la Vega Alan. Actividad antibacteriana in vitro de soluciones de propoleo etanólico sobre dos bacterias periodontopatógenas frecuentes en la enfermedad gingivoperiodontal. Hospital Militar Central Lima. [Tesis para obtener el título de cirujano dentista]. Puno. Universidad Nacional Del Altiplano, Escuela profesional de odontología ; 2010
12. Purca Peña Taylor Pitágoras. Efectividad antibacteriana "in vitro" del extracto etanólico de Rosmarinus officinalis (romero) sobre flora salival. [Tesis para obtener el título de cirujano dentista]. Lima. UNMSM, Facultad de odontología; 2013

13. Leroy G, Rachelle M, Robles A, Fletcher H, Oxidative stress resistance in *Porphyromonas gingivalis*. NIH PA Author Manuscript. 2012 abr; 7(4): 497–512.
14. Morten E, Kazuhiko N, Atsuo A. *Porphyromonas gingivalis* Fimbriae. *Journal of Oral Microbiology*. 2013 may 06; 1-10.
15. Morten E, Kazuhiko N, Atsuo A. *Porphyromonas gingivalis* Fimbriae. *Journal of Oral Microbiology*. 2013 may 06; 1-10.
16. Nagano K. Fim A Fimbriae of the Periodontal Disease-associated Bacterium *Porphyromona gingivales*. *Yakugaku Zasshi*. 2013 may 31; 133(9): 963-978.
17. Hajishengallis George, Immune evasion strategies of *Porphyromonas gingivalis*. NIH PA Author Manuscript. 2011 dic 06; 53 (3): 233-240
18. Atanasova K, Yilmaz O. Looking in the *Porphyromonas gingivalis* cabinet of curiosities: the microbium, the host and cancer association. *Molecular oral Microbiology*. 2014 ene 16; 29 (2014): 55–66.
19. Ramos Perfecto D, Moromi Nakata H, Martínez Cadillo E, *Porphyromonas gingivalis*: patógeno predominante en la periodontitis crónica. *Odontol. Sanmarquina* 2011; 14(1): 34-38
20. Xianghui Feng, et al, Detection of Eight Periodontal Microorganisms and Distribution of *Porphyromonas gingivalis* fimA Genotypes in Chinese

- Patients With Aggressive Periodontitis. *J Periodontol.* 2014 ene; 85 (1): 1-10
21. Christopher Wright J. Microbial interactions in building of communities. NIH PA Author Manuscript. 2013 abr; 28(2): 83–101
 22. Naoyuki Sugano, Biological plaque control: novel therapeutic approach to periodontal disease. *Journal of Oral Science.* 2012; 54(1): 1-5
 23. Hajishengallisa G, Toshiharu A, Tomoki Maekawaa, Evlambia Hajishengallisb, Lambris J, Role of complement in host-microbe homeostasis of the periodontium. NIH PA Author Manuscript. 2013 Febr; 25(1): 65–72.
 24. Cugini C, et al, *Porphyromonas gingivalis*: keeping the pathos out of the biont. *Journal of Oral Microbiology.* 2013 abr 03; 1-10.
 25. Tribble G, Kerr G, Bing-Yan, Genetic diversity in the oral pathogen *Porphyromonas gingivalis*: molecular mechanisms and biological consequences. NIH PA Author Manuscript. 2013 may; 8(5):1-22.
 26. Dinesh Kamaraj R, Kala Bhushan, Vandana K, An Evaluation of Microbial Profile in Halitosis with Tongue Coating Using PCR (Polymerase Chain Reaction)- A Clinical and Microbiological Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 2014 Jan, Vol-8(1): 263-267
 27. Rabelo de Oliveira G, et al, Bacterial adhesion and colonization differences between zirconia and titanium implant abutments: an in vivo

- human study. *JIPS Journal of Periodontal & Implant Science*; 2012 nov 25; (42):217-223
28. Sauñe A, Reynel C, Árboles y arbustos de piper (“matico”) del valle de chanchamayo, dp. de junín (perú) .Lima: Herbario de la Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Nacional Agraria La Molina; 20013
29. Propiedades Medicinales del Matico (*Piper aduncum*).[base de datos en línea].Perú. Chico S. 2014 [fecha de acceso 11 de noviembre del 2014]. URL disponible en: <http://www.trucosnaturales.com/beneficios-y-propiedades-medicinales-del-matico/>
30. *Piper aduncum*. [base de datos en línea]. Perú. 2014 [fecha de acceso 05 de noviembre del 2014]. URL disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/Piper_aduncum
31. Abreu Guirado O, Rodríguez Tamargo A, Morgado Montes M, Cao Vocero L, Pharmacognosy, pharmacobotany, pharmacogeography, and pharmacoetymology of platanillo de Cuba (*Piper aduncum* subespecie *ossanum*). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, junio 2012; 17 (2): 1028-4796
32. Familia piperaceae Matico [base de datos en línea]. Colombia. 2013. Ventura R. [fecha de acceso 05 de noviembre del 2014]. URL disponible en: <http://es.scribd.com/doc/142133001/MATICO>
33. Karl Bunn. *Glossário da medicina oculta*. Brasil: igreja gnóstica;2012

34. Arroyo D, Pareja B, Raez J, Efecto cicatrizante del Piper angustifolium R. & P. sobre lesiones de piel inducidas en animales de Experimentación, Folia Dermatológica Peruana. 1 Marzo de 2005; 10 (1): 48- 51
35. Pacheco Romero J, Matico o matico de la puna. An Fac med. Perú. 2011; 72(4):229-30
36. Arroyo J. et al, Piper aduncum [matico] extract antihypertensive effect on L-NAME induced hypertension in mice. An. Fac. med. dic. 2012; 73(4): 1025-5583
37. Chaiana Fróes M, IMUNOPATOLOGIA DAS DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS Chaiana Fróes Magalhães Efeito de extratos e frações de Piper aduncum sobre o crescimento e metabolismo dos Streptococcus mutans e Streptococcus sanguis. [tesis doctoral].Brasil:universidad Vale do Rio; 2010
38. Chaiana Fróes M, IMUNOPATOLOGIA DAS DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS Chaiana Fróes Magalhães Efeito de extratos e frações de Piper aduncum sobre o crescimento e metabolismo dos Streptococcus mutans e Streptococcus sanguis. [tesis doctoral].Brasil:universidad Vale do Rio; 2010
39. Arroyo J. et al, Piper aduncum leaves ethanol extracts protective effect compared with silymarin in liver cirrhosis induced in rats. An. Fac. med. jun. 2012; 73 (2): 1025-5583

40. CLAROS P et a, Actividad anti-*Helicobacter pylori* de *Plantago major*, *Clinopodium bolivianum*, *Caléndula officinalis* y *Piper angustifolium* por el método de difusión de disco. *BIOFARBO*, 2007; 15 (1): 1813-5363.
41. Ciencia & tecnología para el nuevo milenio [en línea]. Perú: rotativa servive S.A.C.2012.[fecha de acceso octubre 2014].URL disponible en:
https://www.um.es/c/document_library/get_file?uuid=965bde04-3c29-48d1-8be6-d91a7307cae1&groupId=479763
42. Li N, Collyer C, Gingipains From *Porphyromonas Gingivalis* – Complex Domain Structures Confer Diverse Functions. *European Journal of Microbiology and Immunology*.2011; 2011 (1): 41–58.

ANEXOS

ANEXO N° 01

PIPER ADUNCUM (MATICO)

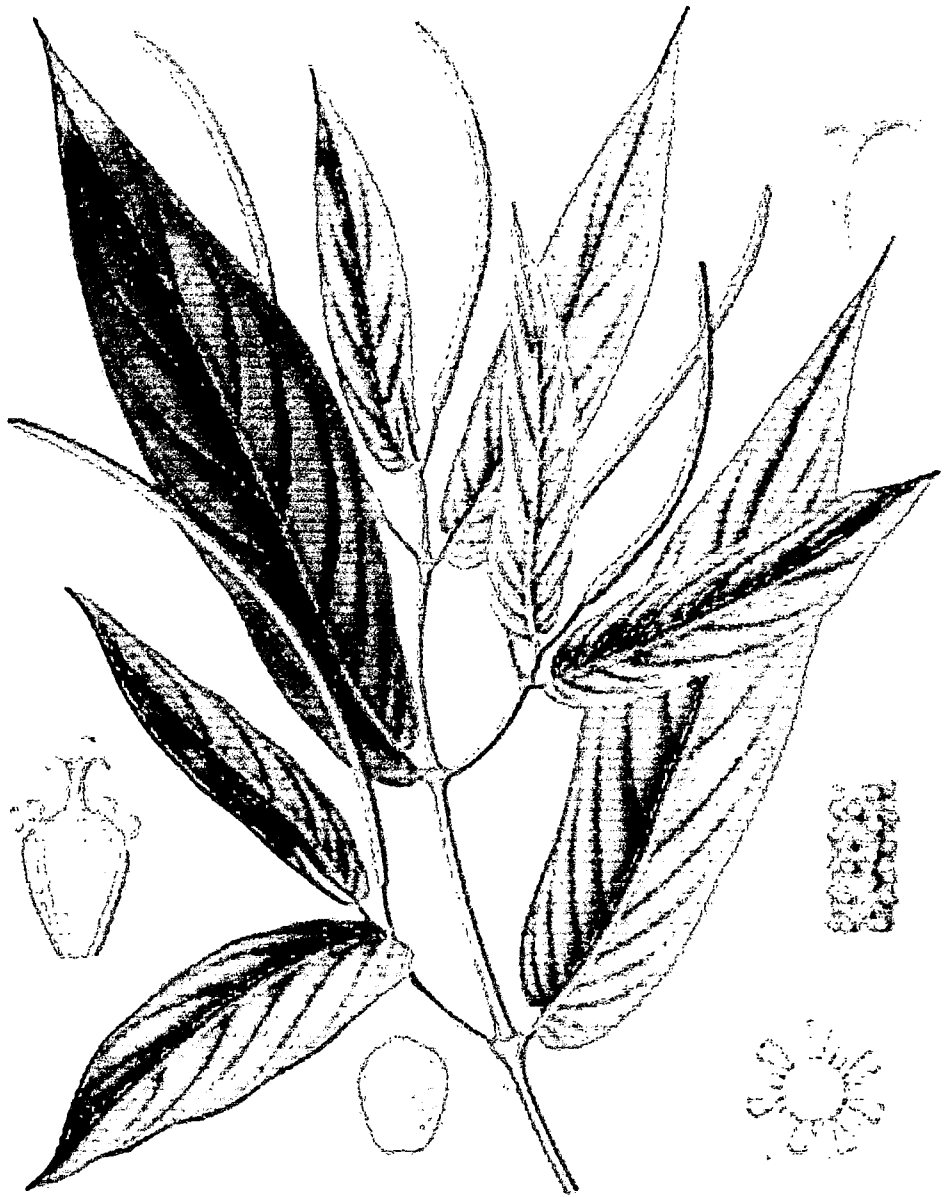


Fig. N° 01

TABLA N°1

Tabla 1. Estudio fitoquímico de los extractos acuoso y etanólico de las hojas de "maico"

Metabolitos secundarios: Rx	Extracto acuoso	Extracto etanólico
Alcaloides : Dragendorff	+	++
Flavonoides : Shinoda	++	+++
Saponinas Espuma	++	+
Fenólicos : Cloruro férrico	++	+++
Aceites : Olor	++	+++
Taninos : Gelatina	++	++
Esteroides : L. Burchard	-	+
Aminoácido : Ninhidrina	-	-
Quinonas : Bortranger	-	+

(-) = Ausencia (+) = Poca cantidad
 (++) = Regular cantidad (+++) = Bastante cantidad

ANEXO N° 2

ENCUESTA ETNOBOTÁNICA

ENCUESTA ETNOBOTÁNICA

Proyecto Matico Odontología UNHEVAL – Huánuco 2014

Datos Personales del Encuestado

SEXO:

EDAD:

LUGAR DE NACIMIENTO:

LUGAR DONDE

VIVE:

HACE CUANTO TIEMPO VIVE EN ESTE LUGAR:

OCUPACIÓN:

1. ¿Qué plantas medicinales usted ha usado? ¿Qué tipo de dolencia trata con estas plantas?

.....
.
.....
.....

2. ¿Ha escuchado alguna vez sobre el matico? ¿Lo ha usado alguna vez?

.....
...
.....
...

Si la respuesta es **SI**, siga con el cuestionario

3. ¿Para qué usa el matico?

.....
.....
.....

4. ¿Qué parte de la planta usa?

.....
.....
.....

5. ¿En qué estado usa el matico, son tiernas o maduras?

.....
.....
.....

6. ¿Cómo consigue el Matico?

.....
.....
.....

7. ¿Cómo prepara la planta para tratar estas enfermedades?

.....
.....
.....

8. ¿Qué cantidad de preparado usa y durante cuánto tiempo trata esas enfermedades?

.....
.....
.....

.....
.....

9. ¿A qué hora del día administra el preparado?

.....
.....
.....
.....

10. ¿Cómo administra el preparado a la persona enferma?

.....
.....
.....
.....

11. ¿Quién le enseñó a usar el Matico?

.....
.....
.....

ANEXO N° 03

FICHA DE OBSERVACIÓN DEL EXPERIMENTO

UNIVERSIDAD NACIONAL HERMILIO VALDIZÁN

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA.

N de muestra ____

TÍTULO:

EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE PIPER
ADUNCUM (MATICO) FRENTE A CEPAS DE PORPHYROMONAS
GINGIVALIS (ESTUDIO IN VITRO) LIMA -2014

OBJETIVOS:

¿Cuál es el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *piper aduncum* (matico) frente a cepas de *Porphyromonas gingivalis* (estudio in vitro)?

e) ¿Cuál es la concentración que tiene más efecto antibacteriano de extracto etanólico de *piper aduncum* (matico) frente a cepas de *Porphyromonas gingivalis*?

f) ¿Cuál es el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *piper aduncum* (matico) en comparación con la clorhexidina frente a cepas de *Porphyromonas gingivalis*?

g) ¿Cuál es el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *piper aduncum* (matico) en comparación con el agua destilada frente a cepas de *porphyromonas gingivalis*?

FICHA DE OBSERVACIÓN DE EXPERIMENTO

1. EXTRACTO EMPLEADO

	72 horas	96 horas
Extracto etanólico 0.062	_____	_____
Extracto etanólico 0.25	_____	_____
Extracto etanólico 0.5	_____	_____
Clorhexidina 0.12%}	_____	_____
Agua destilada	_____	_____

2. EFECTO SOBRE CRECIMIENTO ANTIBACTERIAL

Halo inhibitorio 72 h

Halo inhibitorio 96 h

ANEXO N° 04

VALIDACIÓN DE LAS ENCUESTAS

Directora del Museo de Etnobiología de la Universidad Privada Ricardo Palma- Lima:
Lic. Gonzales de la Cruz Mercedes

INFORME DE OPINIÓN DE EXPERTOS DE INSTRUMENTO DE INVESTIGACION

I. DATOS GENERALES:

- 1.1. Apellidos y Nombres del Informante: *González de la Cruz, Mercedes.*
 1.2. Cargo e Institución donde labora: *Directora del INETB - URP.*
 1.3 Nombre del Instrumento, motivo de evaluación:
Encuesta... etnobotánica
 1.4 Título de la Investigación:
Efectividad antibacteriana de Piper aduncum frente
 1.5 Autor del Instrumento: *a Ojas de Porfiriano, Singsivalis*
Espejo Evaristo, Beatriz J. Ruiz Angulo, Giselle

II. ASPECTOS DE VALIDACIÓN:

INDICADORES	CRITERIOS	Deficiente 00-20%	Regular 21-40%	Buena 41-60%	Muy Buena 61-80%	Excelente 81-100%
1. CLARIDAD	Está formulado con lenguaje apropiado.					✓
2. OBJETIVIDAD	Está expresado en conductas observables.					✓
3. ACTUALIDAD	Adecuado al avance de la ciencia y la tecnología.				✓	
4. ORGANIZACIÓN	Existe una organización lógica.					✓
5. SUFICIENCIA	Comprende los aspectos en cantidad y calidad					✓
6. INTENCIONALIDAD	Adecuado para valorar aspectos de la investigación.					✓
7. CONSISTENCIA	Basado en aspectos teórico-científicos.					✓
8. COHERENCIA	Entre las dimensiones, indicadores e índices.					✓
9. METODOLOGÍA	La estrategia responde al propósito de la investigación.					✓
10. OPORTUNIDAD	El instrumento será aplicado en el momento oportuno o más adecuado según sus procedimientos.					✓
PROMEDIO DE VALIDACION						

Adaptado de: OLANO, Atilio. (2003).

III. PROMEDIO DE VALORACIÓN: *95*%. IV. OPINIÓN DE APLICABILIDAD:

(...) El instrumento puede ser aplicado, tal como está elaborado.

(...) El instrumento debe ser mejorado antes de ser aplicado:

Lugar y fecha: *Sucre, 23 de octubre 2014.*


Firma del Profesional Experto.

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
INSTITUTO DE ETNOBIOLOGIA
[Signature]
Lic. Mercedes Gonzales de la Cruz
DIRECTORA

INFORME DE OPINIÓN DE EXPERTOS DE INSTRUMENTO DE INVESTIGACION

I. DATOS GENERALES:

- 1.1. Apellidos y Nombres del Informante: Iannacone Oliver José Alberto
- 1.2. Cargo e Institución donde labora: Investigador URP.
- 1.3. Nombre del Instrumento motivo de evaluación:
- 1.4. Título de la Investigación:
- 1.5. Autor del Instrumento:

II. ASPECTOS DE VALIDACIÓN:

INDICADORES	CRITERIOS	Deficiente 00-20%	Regular 21-40%	Buena 41-60%	Muy Buena 61-80%	Excelente 81-100%
1. CLARIDAD	Está formulado con lenguaje apropiado.				65	
2. OBJETIVIDAD	Está expresado en conductas observables.				80	
3. ACTUALIDAD	Adecuado al avance de la ciencia y la tecnología.				80	
4. ORGANIZACIÓN	Existe una organización lógica.					85
5. SUFICIENCIA	Comprende los aspectos en cantidad y calidad					83
6. INTENCIONALIDAD	Adecuado para valorar aspectos de la investigación.					83
7. CONSISTENCIA	Basado en aspectos teórico-científicos.				62	
8. COHERENCIA	Entre las dimensiones, indicadores e índices.				80	
9. METODOLOGÍA	La estrategia responde al propósito de la investigación.				80	
10. OPORTUNIDAD	El instrumento será aplicado en el momento oportuno o más adecuado según sus procedimientos.					90
PROMEDIO DE VALIDACION						

Adaptado de: OLANO, Atilio. (2003).

III. PROMEDIO DE VALORACIÓN: 78,8%. IV: OPINIÓN DE APLICABILIDAD:

(✓) El instrumento puede ser aplicado, tal como está elaborado.

(...) El instrumento debe ser mejorado antes de ser aplicado.

Lugar y fecha: Lima, 02 de Octubre del 2014

Firma del Profesional Experto.



ANEXO 05

CONSTANCIA DE LA CERTIFICACIÓN DE LA PLANTA

*Directora del Museo de Etnobotánica de la Universidad Privada Ricardo Palma- Lima
Gonzales de la Cruz, Mercedes*

CONSTANCIA

DETERMINACIÓN DE ESPECÍMENES

La que suscribe deja constancia que la muestra botánica (rama florífera) analizada, presentada por las señoritas: Beatriz Espejo Evaristo y Giselle Ruiz Angulo, corresponde a la especie *Piper aduncum* L. perteneciente a la familia Piperaceae

Por lo que se expide la presente constancia de determinación para los fines que crean pertinentes.

Surco, 03 de Noviembre de 2014



Blga. Mercedes Gonzalez de la Cruz
CBP: 1778

ANEXO 06

CONSTANCIA DE LA CERTIFICACIÓN DE LABORACIÓN DEL
EXTRACTO ETANÓLICO PIPER ADUNCUM

*Química Farmacéutica Bertha Jurado Teixeira de la Universidad de Biología y
Química San Marcos.*

CONSTANCIA

Se deja constancia que las Srtas. Bachilleras: RUIZ ANGULO, Giselle Madellin y ESPEJO EVARISTO Jaquelin Beatriz de la facultad de Medicina Humana E.A.P. Odontología de la Universidad Nacional Hermilio Valdizán han realizado la preparación del extracto etanólico, tamizaje fitoquímico y la prueba de solubilidad para el desarrollo de su proyecto de tesis titulada: "Efecto antibacteriano de *Piper aduncum* (matico) sobre cepas de *Prophyromonas gingivalis* – in vitro", que se realizó en el mes de enero de 2015.

Se expide la presente constancia para los fines que sean convenientes.

Lima, 03 de marzo del 2015.


Bertha Jurado Teixeira
QUÍMICO FARMACÉUTICO
C.Q.F.P. N° 3501

ANEXO 07

CONSTANCIA DE HABER REALIZADO LA PRUEBA ANTIBACTERIANA

Microbiólogo Elfer Valdivia Paz-Soldán

CONSTANCIA

Se deja constar que las señoritas Bachilleres ESPEJO EVARISTO, Beatriz Jaquelin y RUIZ ANGULO, Giselle Madellin de la Facultad de Medicina Humana EAP de Odontología de la Universidad Nacional Hermilio Valdizán han realizado la siembra, incubación bacteriana y las Pruebas de sensibilidad bacteriana para el desarrollo del proyecto de tesis titulada:

EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DEL PIPER ADUNCUM (MATICO) FRENTE A CEPAS DE PORPHYROMONAS GINGIVALIS (ESTUDIO IN VITRO) LIMA-2014

Que se llevó a cabo el mes de marzo del 2015 en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Científica del Sur, a cargo del microbiólogo Elfer Valdivia Paz-Soldán.

Se expide la presente constancia para los fines que sean convenientes.

Lima 28 de marzo del 2015.


ELFER VALDIVIA PAZ-SOLDÁN

ELFER VALDIVIA PAZ-SOLDÁN
Biólogo-Microbiólogo - CBP. 4415
Coordinador LAB. Microbiología
UCSUR

ANEXO 08

CERTIFICACIÓN DE LA BACTERIA

Hermito
SCIENTIFIC

Product Name: *[Illegible]*
Lot Number: *[Illegible]*

This product has been examined and found to contain the following organisms:

Family: *[Illegible]*

Viability and Quantification:
Each organism is recovered from the product and remains viable under the conditions prescribed above.

Macroscopic And Microscopic Appearance:
Colony morphology is consistent with *[Illegible]* and *[Illegible]*.
Microscopic appearance is *[Illegible]*.

Biochemical Analysis:
Organism exhibits *[Illegible]* characteristics. The *[Illegible]* and *[Illegible]* tests are *[Illegible]*.
Other *[Illegible]* tests: *[Illegible]*

CFUs (mg) *[Illegible]* (Range) *[Illegible]*

Genus/Species: *[Illegible]* Strain: *[Illegible]*

Appearance: *[Illegible]*

SIGNATURE
Shang Mason

Product Name: *[Illegible]*

ANEXO N°09

DATOS DE LA PLANTA

Propiedad	Extracto
Olor	<i>Suigeneris</i>
Color	<i>Verde oscuro</i>
Sabor	-
pH	5

Prueba de Solubilidad:

LEYENDA: (-) Insoluble (++) Soluble (+++) Muy soluble

Solventes	Extracto Seco
Agua destilada	-
Etanol	+++
Metanol	+++
n-butanol	++
Acetato de etilo	+++
Diclorometano	+++
Cloroformo	+++

Tamizaje Fitoquímico:

LEYENDA: (-) Nulo (+) Leve (++) Moderado (+++) Abundante

METABOLITO	REACCIÓN	PROCEDIMIENTO	REACCIÓN POSITIVA
CARBOHIDRATOS	Antrona (Antrona en H ₂ SO ₄ cc al 2%)	X gotas de MP + III gotas de Antrona	Coloración verde (++++)
	Feling (A: CuSO ₄ ; B: tartrato mixto de potasio y sodio (KNaC ₄ H ₄ O ₆ .4H ₂ O)	X gotas de MP + III gotas Fehling A + III gotas de Fehling B + calentar en B.M	Coloración rojo ladrillo (++++)
COMPUESTOS FENÓLICOS	FeCl ₃	X gotas de MP + III gotas de FeCl ₃ 10%	Coloración verde o azul (++++)

TANINOS	Gelatina	X gotas de MP + III gotas de gelatina	Precipitado denso blanco (++++)
FLAVONOIDES	Shinoda	X gotas de MP + 1-2 virutas de Mg metálico y III gotas de HCl cc	Chalconas, auronas, isoflavanonas: no hay coloración. Isoflavanonas: amarillo rojizo Flavanonoles: rojo a magenta Flavonas y flavonoles: amarillo a rojo. (++++)
ANTOCIANINAS Y FLAVONOIDES CATEQUICOS	Rosenheim (sol. Yodo yodurada)	X gotas de MP + III gotas de rosenheim	Coloracion rojo oscuro (-)
AMINOACIDOS LIBRES Y GRUPOS AMINO	Ninhidrina (0.1% en etanol)	X gotas de MP + III gotas de ninhidrina + calentar en B.M 10 min	Coloración violácea (-)
ALCALOIDES	Dragendorff (yoduro potasio – bismuto)	X gotas de MP + evaporar el solvente B.M + V gotas de HCl 10% + III gotas de Dragendorff	Precipitado naranja (++)
	Mayer (yoduro de potasio mercúrico)	X gotas de MP + evaporar el solvente B.M + V gotas de HCl 10% + III gotas de mayer	Precipitado blanco (+++)
	Bertrand (ácido silico – tungstico)	X gotas de MP + evaporar el solvente B.M + V gotas de HCl 10% + III gotas de Bertrand	Precipitado blanco (+++)
	Sonrenschlein (ácido fosfomolibdico)	X gotas de MP + evaporar el solvente B.M + V gotas de	Precipitado amarillo-verdoso

		HCl 10% + III gotas de Sonrenschlein	(+++)
NAFTAQUINONAS, ANTRAQUINONAS Y ANTRANONAS	Borntrager (NaOH 5%)	X gotas de MP + III gotas de Borntrager	Coloración roja (-)
TRITERPENOIDES Y ESTEROIDES	Lieberman - Bourchard	X gotas de MP + llevar a sequedad en B.M + X gotas de anhídrido acético + H2SO4 cc en zona (por la paredes del tubo) sin agitar	Esteroides : verde azul (++++) Triterpenoides: rojo naranja
SAPONINAS	Generación de espuma	1mL de MP + 5 mL de agua destilada + agitar fuerte por 1 min	Formación de 0.5 a 1 cm de espuma estable x 15 min (-)
GLICÓSIDOS	Baljet	X gotas de MP + V gotas de ácido pícrico 1% + V gotas de NaOH al 5%	Coloración anaranjada (+++)
LACTONAS	Legal	X gotas de MP + V gotas de nitroprusiato de Na 0.5% + V gotas de KOH 2N	Coloración rojo oscuro (-)
CUMARINAS	NH4OH cc ó NaOH 10%	X gotas de MP + Papel humedecido con NH4OH cc ó NaOH 10% en boca de tubo + calentar por 5 min	Fluorescencia celeste (+++)

ANEXO N°10

SECUENCIA DE ELABORACIÓN DEL PROYECTO



FIG. 1: se recolectó *Piper aduncum* (matipo) en su habitat en la ciudad de Huánuco provincia de Ambo

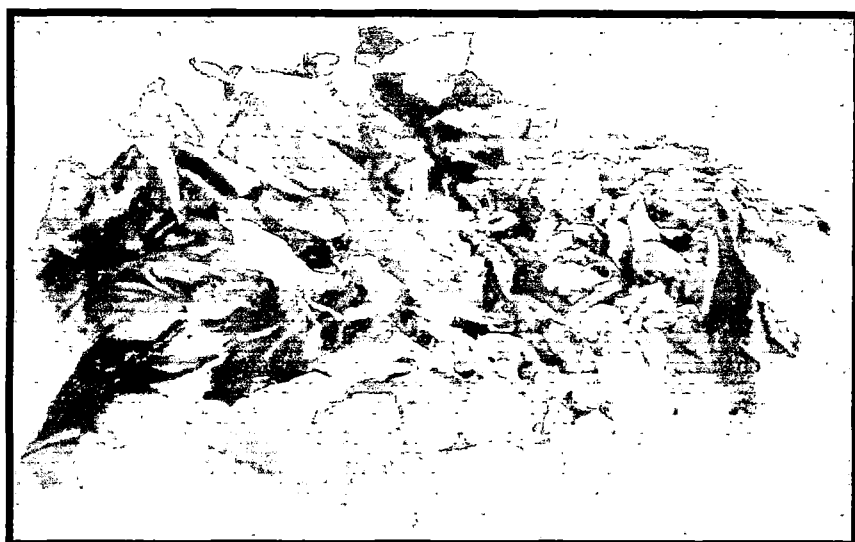


FIG. 2: Secado de las hojas de *Piper aduncum* (matico)

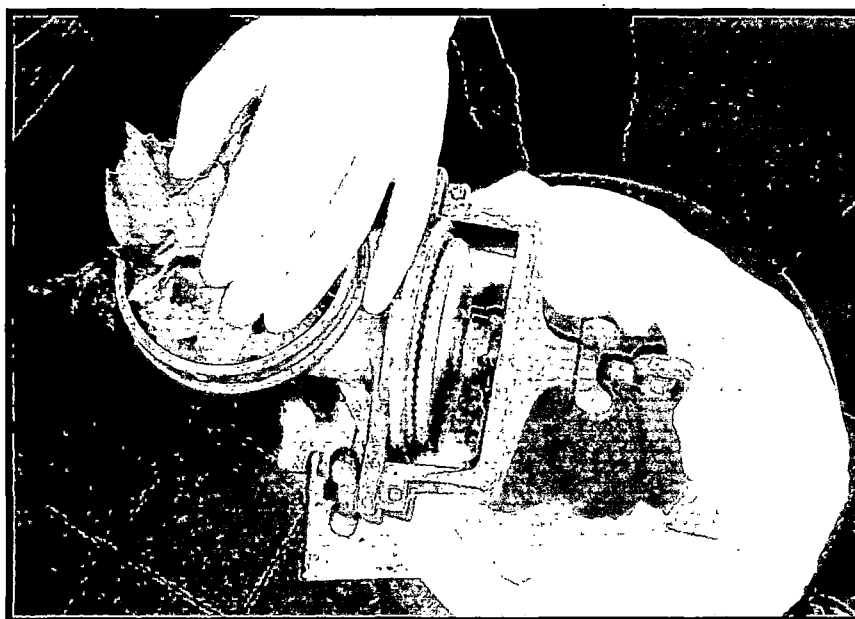


FIG. 3: moliendo las hojas secas de *Piper aduncum* (matico)

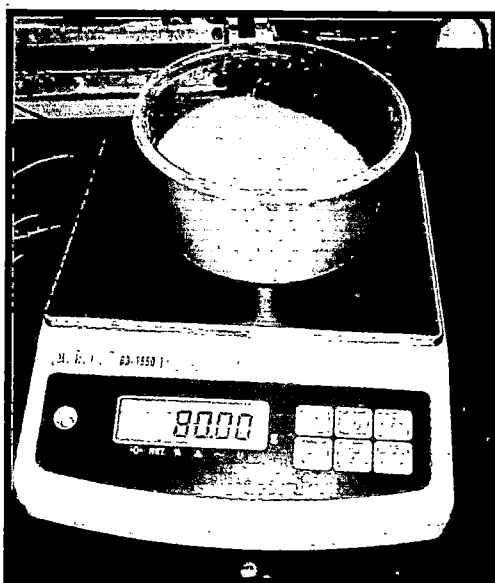


FIG.4: pesando las hojas secas y molidas de *Piper aduncum* (matico)



FIG. 5: se llevó el contenido a un frasco de color ámbar

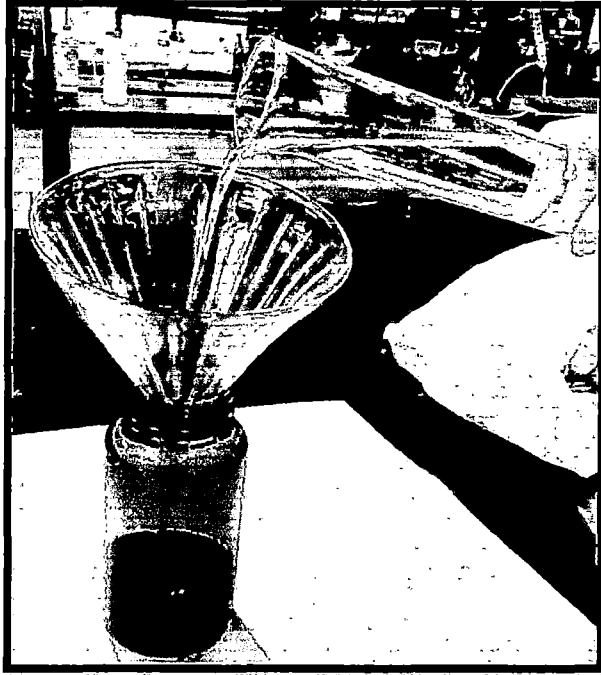


FIG46: al frasco que ya contenía las hojas secas y molidas se le añadió 400ml de alcohol al 96°

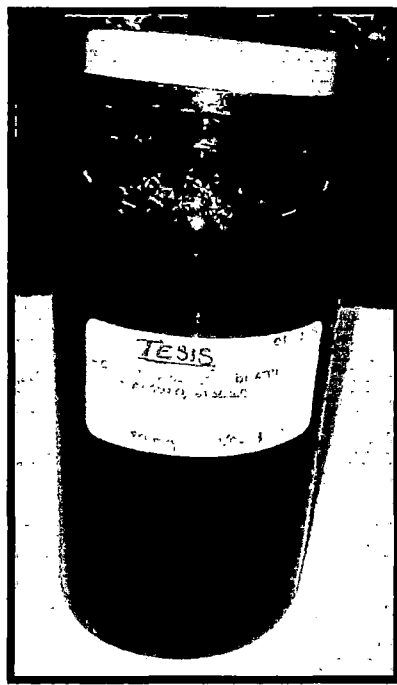


FIG 7: se maceró durante 10 días agitando el contenido todos los días



FIG 8: se coló el macerado con ayuda de una gasa

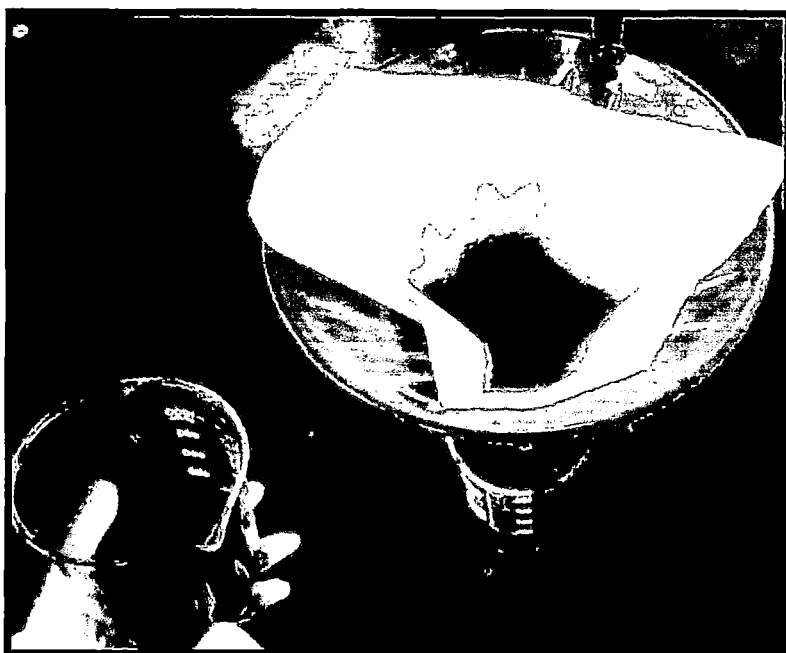


FIG 9: se volvió a colar con papel filtro

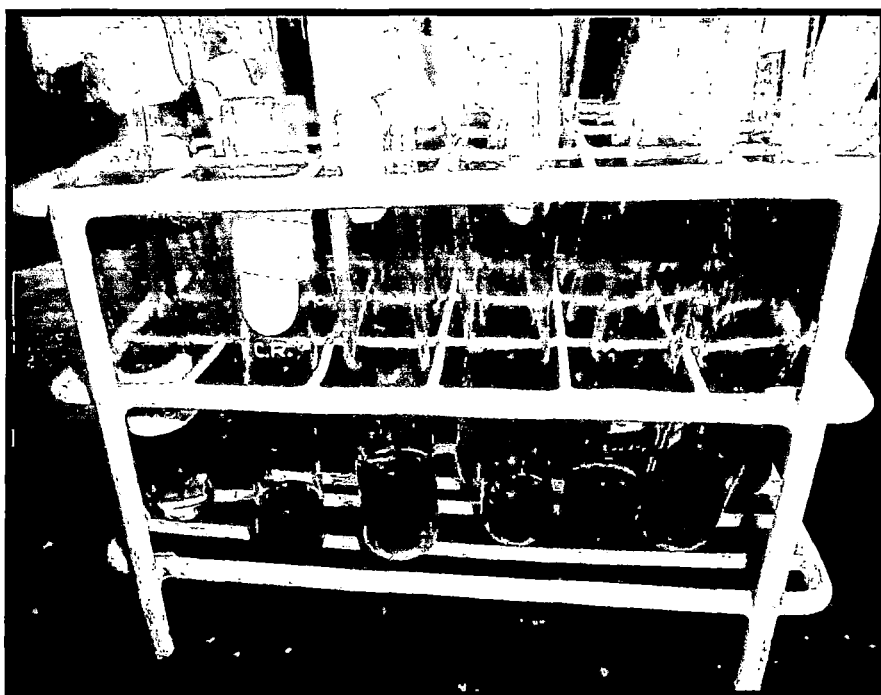


FIG 10: se tomó un poco de la muestra y se realizó las pruebas fotoquímicas



FIG 11: luego de obtener el extracto seco procedemos hacer las diluciones con dimetil sulfóxido

PRUEBA ANTIBACTERIANA

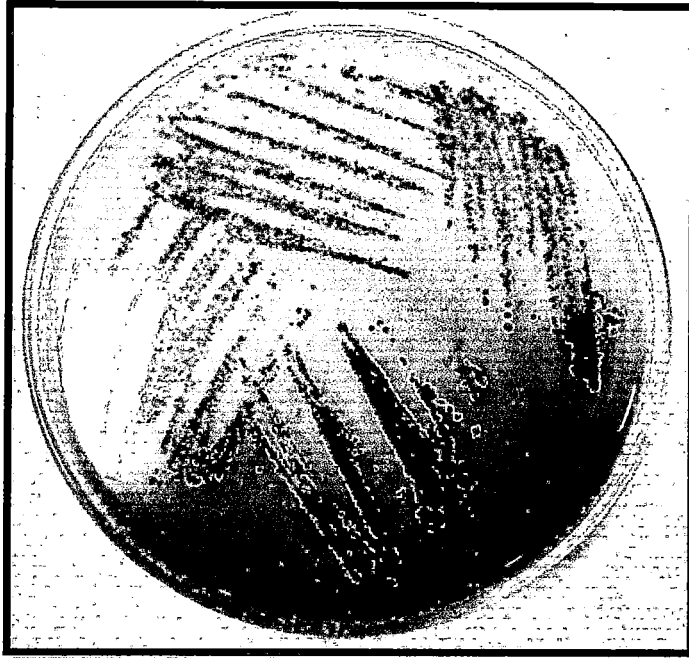


FIG 12: se reactivó e incubó las cepas de *Porphyromonas gingivalis*

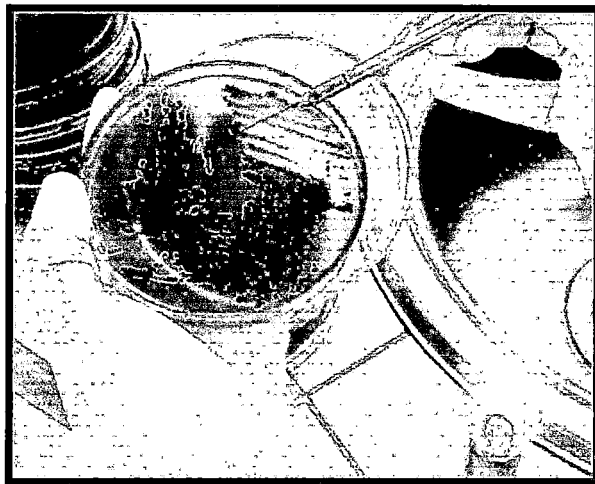


FIG 13: se tomó bacterias *Porphyromonas gingivalis*

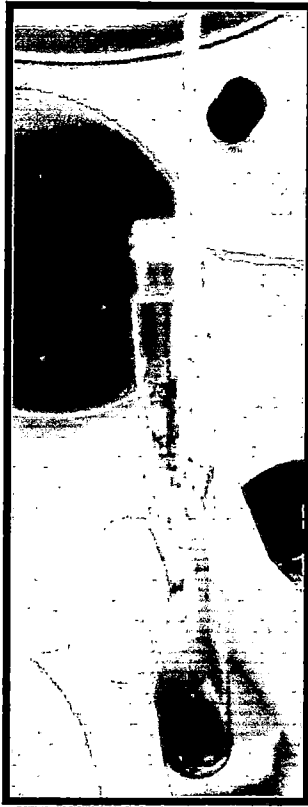


FIG 14: se colocó las Porphyromonas en caldo nutritivo (tioglicolato)

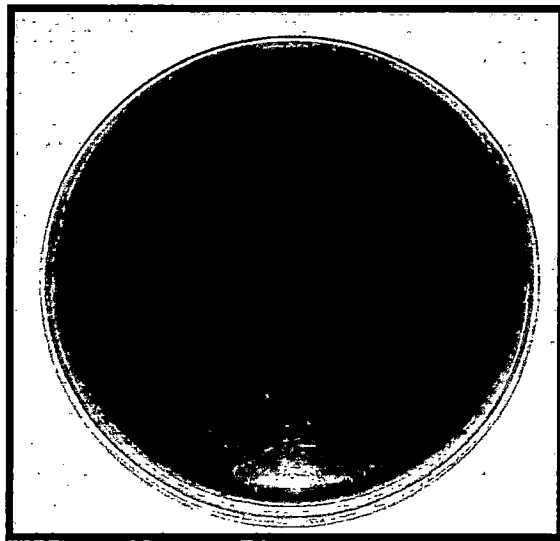


FIG 15: se marcó la placa para colocar en orden las sustancias

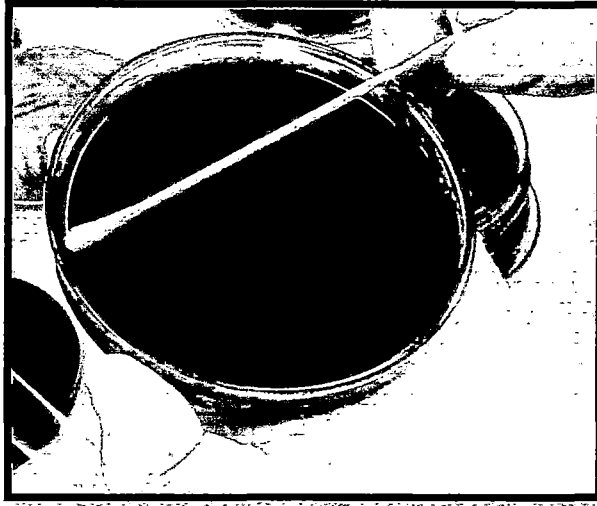


FIG 16: se colocó la mezcla de porphyromonas más el caldo nutritivo en el agar SHAEDLER

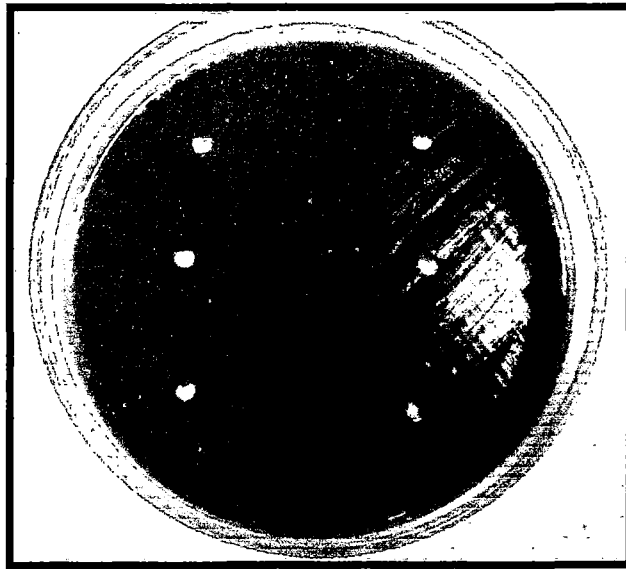


FIG 17: se hicieron 6 pozos

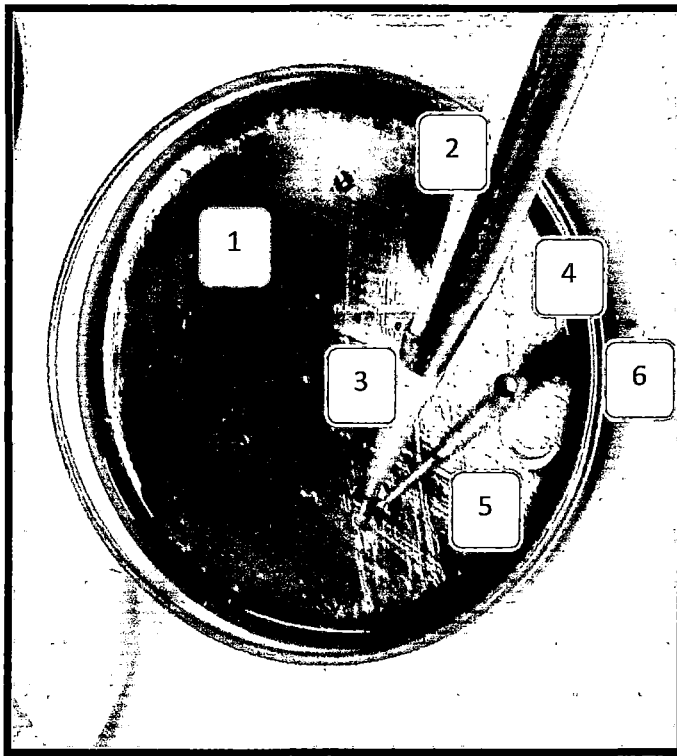
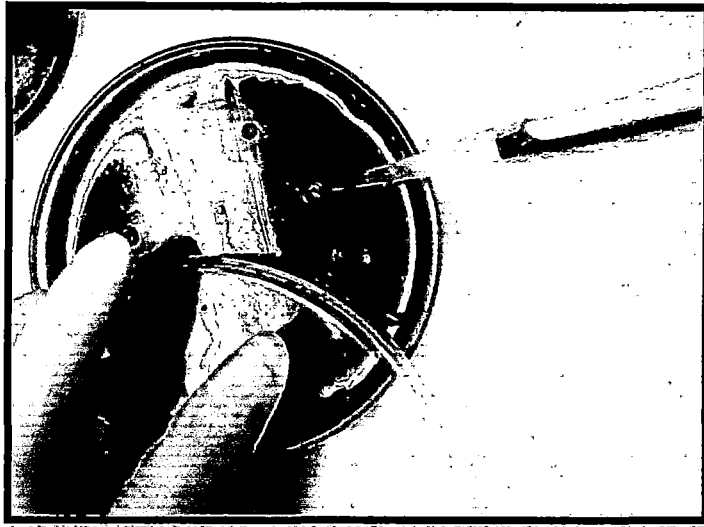


FIG 18: se colocó en cada pozo el extracto al 0.5%, 0.25%, 0.062% dimetil sulfóxido, clorhexidina 0.12% y agua destilada respectivamente

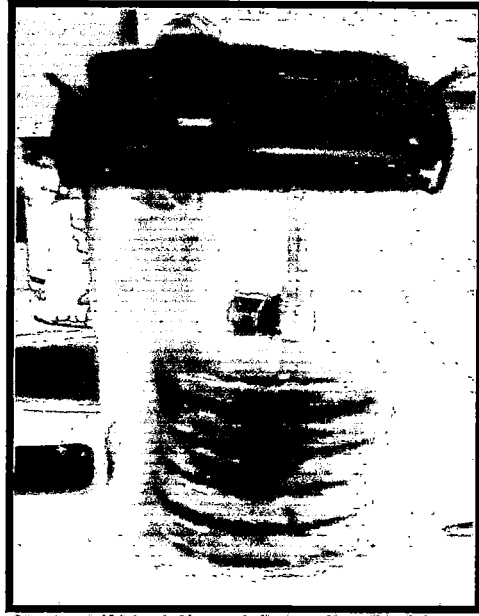


FIG 19: se colocaron las placas en una jarra de anaerobiosis con un sobre de CO₂
(acondicionador para anaerobios)



FIG 20: se puso la jarra en la incubadora a 37 °

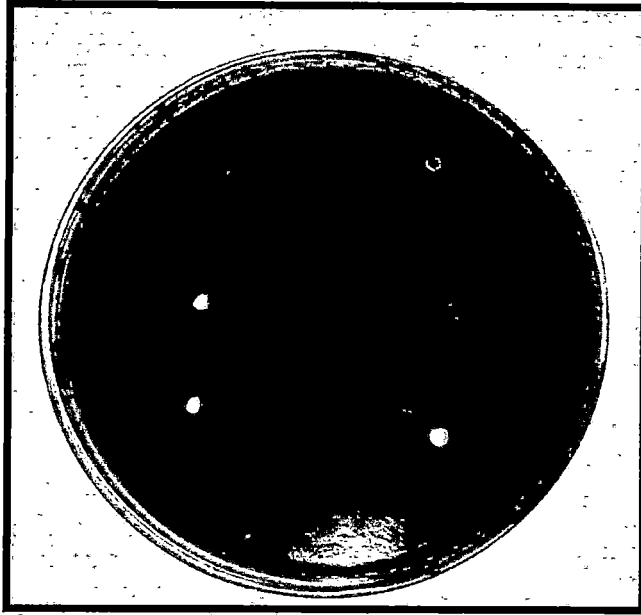


FIG 21: primera lectura 72horas

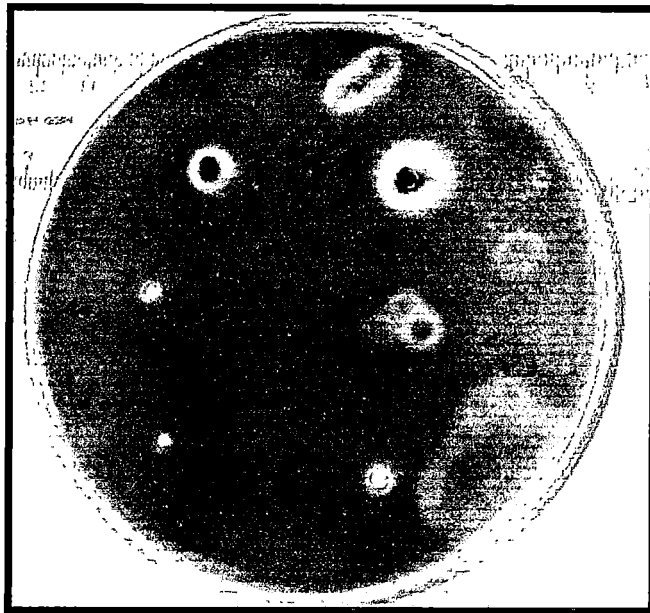


FIG 22: segundo lectura 96 horas



UNIVERSIDAD NACIONAL HERMILO VALDIZÁN DE HUÁNUCO
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO
PROFESIONAL DE CIRUJANO DENTISTA

En Cayhuayna, a los 22 días del mes de Abril del año dos mil quince, siendo las 11 horas con 07 minutos, y de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la UNHEVAL, se reunieron en el aula N° 301 de la EAP de Odontología, los miembros del Jurado Calificador de tesis, nombrados con Resolución N° 110-2015-UNHEVAL-FM-D, de fecha 23.Abr.2015, para proceder con la evaluación de la Tesis titulada: "EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DEL PIPER ADUNCUM (Matico) FRENTE A CEPAS DE PORHYROMONAS GINGIVALIS, (ESTUDIO IN VITRO) LIMA - 2014", elaborado por las Bachilleres en Odontología ESPEJO EVARISTO, Beatriz Jaquelin y RUÍZ ÁNGULO, Giselle.

El Jurado Calificador de Tesis está conformado por los siguientes docentes:

- + CD. César Lincoln GONZÁLES SOTO Presidente
+ Mg. Miguel Nino CHÁVEZ LEANDRO Secretario
+ CD. Jubert Guillermo TORRES CHÁVEZ Vocal
+ CD. Rafael CACHAY CHÁVEZ Accesorio

Finalizado el acto de sustentación de Tesis, el Presidente del Jurado Evaluador indica a los sustentantes y al público presente retirarse de la sala de sustentación por un espacio de cinco minutos para deliberara y emitir la calificación final, quedando... los sustentantes ESPEJO EVARISTO, Beatriz Jaquelin y RUÍZ ÁNGULO, Giselle, con la nota de 19 equivalente a Excelente, con lo cual se da por concluido el proceso de sustentación de Tesis a horas 12:00, en fe de lo cual firmamos.

Cayhuayna, abril 27 del 2015

Signature of César Lincoln GONZÁLES SOTO
PRESIDENTE

Signature of Miguel Nino CHÁVEZ LEANDRO
SECRETARIO

Signature of Jubert Guillermo TORRES CHÁVEZ
VOCAL

- Bueno (14,15 y 16)
Muy Bueno (17 y 18)
Excelente (19 y 20)