



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO
DEL EXTRACTO DE *Equisetum giganteum* L. (COLA DE
CABALLO) SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Pseudomonas*
***aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae*.**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: ITATY THALIA ZHICAY ORELLANA

DIRECTORA: BQCI. MISHHELL MORENO SAMANIEGO

Riobamba – Ecuador

2024

© 2024, Itaty Thalia Zhicay Orellana

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, ITATY THALIA ZHICAY ORELLANA, declaro que el presente Trabajo de Integración Curricular es de mi autoría y los resultados de este son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular, el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 31 de mayo de 2024



Itaty Thalia Zhicay Orellana

C.I. 1400959878

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular, Tipo Trabajo Experimental, **DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DEL EXTRACTO DE *Equisetum giganteum* L. (COLA DE CABALLO) SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae***, realizado por la señorita **ITATY THALIA ZHICAY ORELLANA** ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Ing. Hugo Javier Sánchez Moreno, MSc. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2024-05-31
BQ. Cl. Mishell Carolina Moreno Samaniego, MSc. DIRECTORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2024-05-31
Dra. Adriana Monserrath Monge Moreno, Msc. ASESORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2024-05-31

DEDICATORIA

A Dios, mi guía y fortaleza, quien ha sido la luz que ha iluminado mi camino a lo largo de esta travesía académica. Con humildad y gratitud reconozco su amor incondicional y la sabiduría que ha derramado sobre mí. A mi abuelito Jesús que desde el cielo sé que me ha estado acompañando y guiando en cada paso para lograr esta meta tan anhelada. A mis padres, quienes siempre han sido mi fuente inagotable de amor, apoyo y aliento incondicional. Gracias por ser mi mayor inspiración y creer en mí en cada paso del camino. Su sacrificio y dedicación han sido la fuerza impulsadora de este logro. A mis queridos hermanos y cuñada, quienes me han acompañado con su aliento y palabras de ánimo. Sus buenos deseos han sido mi motivación para superar cualquier obstáculo que se presentara. Y finalmente a todas las personas que de alguna forma han contribuido con palabras de aliento, consejo y muestra de interés en esta etapa

Itaty

AGRADECIMIENTO

Primeramente, agradezco a Dios por haberme dado la oportunidad de haber concluido esta meta y haberme dado la sabiduría para superar los obstáculos que a lo largo de esta investigación se fueron presentando. Agradezco a todas las personas que de una forma u otra permitieron la realización de este trabajo, en especial a la empresa Lowell Mineral Exploration S.A por el apoyo económico que me han brindado para la culminación de mis estudios universitarios. A mis padres y hermanos por su infinito cariño, paciencia y apoyo desde siempre. De igual manera a mi tutora y asesora de tesis quienes me han brindado su apoyo incondicional durante todo el desarrollo de la investigación. A la BQF. Yolanda Buenaño quien ha sido un pilar fundamental para que esta investigación se lleve a cabo de la mejor manera posible.

Itaty

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiv
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	3
1.1. Planteamiento del problema.....	3
1.2. Limitaciones y delimitaciones.....	4
<i>1.2.1. Limitaciones.....</i>	<i>4</i>
<i>1.2.2. Delimitaciones.....</i>	<i>4</i>
1.3. Problema General de la Investigación.....	4
1.4. Problemas Específicos de la Investigación.....	5
1.5. Objetivos de la investigación.....	5
<i>1.5.1. Objetivo general.....</i>	<i>5</i>
<i>1.5.2. Objetivos específicos.....</i>	<i>5</i>
1.6. Justificación.....	6
1.7. Hipótesis.....	6

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO.....	7
2.1. Antecedentes de investigación.....	7
2.2. Referencias teóricas.....	10
<i>2.2.1. Plantas medicinales.....</i>	<i>10</i>
<i>2.2.1.1. ¿Qué es una planta medicinal?.....</i>	<i>10</i>
<i>2.2.2. Equisetum giganteum L. (Cola de caballo).....</i>	<i>11</i>
<i>2.2.3. Descripción botánica de Equisetum giganteum L.....</i>	<i>12</i>
<i>2.2.4. Clasificación taxonómica.....</i>	<i>13</i>
<i>2.2.5. Componentes químicos de Equisetum giganteum L.....</i>	<i>13</i>
<i>2.2.6. Actividad antimicrobiana de Equisetum giganteum L.....</i>	<i>14</i>

2.2.6.1.	<i>Actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos</i>	14
2.2.6.2.	<i>Propiedades antimicrobianas de las saponinas</i>	15
2.2.6.3.	<i>Actividad antimicrobiana de los terpenoides</i>	15
2.2.7.	<i>Usos tradicionales de Equisetum giganteum L.</i>	16
2.3.	Extractos vegetales	17
2.4.	Microbiología	17
2.5.	Cepas ATCC	18
2.5.1.	<i>Uso de las cepas ATCC</i>	19
2.6.	Agentes patógenos	19
2.6.1.	Bacterias	19
2.6.1.1.	<i>Estructura de las bacterias</i>	20
2.6.1.2.	<i>Bacterias Gram positivas</i>	21
2.6.1.3.	<i>Bacterias gram negativas</i>	21
2.7.	Bacterias de estudio	22
2.7.1.	<i>Enterococcus faecalis, Klebsiella pneumoniae y Pseudomonas aeruginosa</i>	22
2.7.2.	<i>Enterococcus faecalis</i>	22
2.7.2.1.	<i>Generalidades</i>	22
2.7.2.2.	<i>Efectos sobre la salud</i>	23
2.7.2.3.	<i>Importancia clínica</i>	24
2.7.3.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24
2.7.3.1.	<i>Generalidades</i>	24
2.7.3.2.	<i>Efectos sobre la salud</i>	25
2.7.3.3.	<i>Importancia clínica</i>	26
2.7.4.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
2.7.4.1.	<i>Generalidades</i>	26
2.7.4.2.	<i>Efectos sobre la salud</i>	27
2.7.4.3.	<i>Importancia clínica</i>	29
2.8.	Determinación de la actividad antimicrobiana in vitro	29
2.8.1.	<i>Concepto de actividad antimicrobiana in vitro</i>	29
2.8.2.	<i>Métodos de determinación de la susceptibilidad antimicrobiana in vitro</i>	30
2.8.3.	<i>Interpretación de los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana in vitro:</i>	30
2.8.4.	<i>Importancia de la actividad antimicrobiana in vitro</i>	30
2.9.	Métodos de Dilución	31
2.10.	ANOVA	32
2.10.1.	<i>Cuando se utiliza la prueba estadística ANOVA</i>	32
2.10.2.	<i>Supuestos que se deben cumplir para utilizar ANOVA</i>	32

2.10.3. Terminologías relacionadas con ANOVA	33
2.10.3.1. <i>Gran media</i>	33
2.10.3.2. <i>Hipótesis</i>	33
2.10.3.3. <i>Distribución de variabilidad</i>	33
2.10.3.4. <i>Cociente F</i>	34
2.10.3.5. <i>Valor P en ANOVA</i>	34
2.10.3.6. <i>Grados de libertad</i>	34
2.10.4. Tipos de ANOVA	35
2.10.5. Métodos para encontrar dos poblaciones diferentes	36
2.10.5.1. <i>El método Tukey</i>	36
2.10.5.2. <i>El método Scheffe</i>	36
2.10.5.3. <i>El método Bonferroni</i>	37

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO	38
3.1. Enfoque de la investigación	38
3.2. Modalidad de la investigación	38
3.3. Diseño de la investigación	38
3.3.1. <i>Según la manipulación o no de la variable independiente</i>	38
3.3.2. <i>Según la perspectiva temporal</i>	39
3.4. Tipo de estudio	39
3.5. Método de investigación	39
3.6. Diseño experimental	39
3.6.1. <i>Metodología para realizar la prueba estadística ANOVA</i>	40
3.7. Población y planificación, selección y cálculo del tamaño de la muestra	41
3.7.1. <i>Población y planificación</i>	41
3.7.2. <i>Selección y cálculo de la muestra</i>	41
3.8. Métodos, técnicas e instrumentos de investigación	41
3.8.1. <i>Equipos, materiales, reactivos e insumos</i>	41
3.8.2. <i>Metodología del experimento</i>	42
3.8.2.1. <i>Recolección y procesamiento de la materia vegetal Equisetum giganteum L. (Cola de caballo)</i>	42
3.8.3. <i>Análisis fisicoquímico de Equisetum giganteum L.</i>	42
3.8.4. <i>Obtención del extracto de Equisetum giganteum L. (cola de caballo)</i>	43
3.8.4.1. <i>Extracción por el método de percolación</i>	43
3.8.4.2. <i>Características organolépticas del extracto hidroetanólico de Equisetum giganteum L.</i>	

.....	43
3.8.4.3. <i>Determinación del rendimiento de la extracción</i>	44
3.8.4.4. <i>Separación e identificación por cromatografía en capa fina (ccf)</i>	44
3.8.4.5. <i>Determinación del factor de referencia (rf)</i>	45
3.8.5. <i>Determinación del efecto antimicrobiano in vitro</i>	45
3.8.5.1. <i>Procesamiento de las cepas clínicas en estudio</i>	45
3.8.5.2. <i>Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana</i>	46
3.8.5.3. <i>Determinación de la concentración mínima inhibitoria</i>	47
3.8.5.4. <i>Determinación de la concentración mínima bactericida</i>	48
3.8.6. <i>Metodología para Tamizaje Fitoquímico de Equisetum giganteum L. (Cola de Caballo)</i>	49

CAPITULO IV

4. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	51
4.1. Control de calidad realizada a la materia vegetal	51
4.1.1. <i>Determinación de cenizas totales de Equisetum giganteum L crudo</i>	51
4.1.2. <i>Determinación de humedad de Equisetum giganteum L.</i>	51
4.2. Extracto de Equisetum giganteum L.	52
4.2.1. <i>Obtención del extracto de Equisetum giganteum L. (cola de caballo)</i>	52
4.2.2. <i>Características organolépticas del extracto hidroalcohólico de Equisetum giganteum L.</i>	53
4.2.3. <i>Determinación del rendimiento del extracto de Equisetum giganteum L.</i>	55
4.2.3.1. <i>Análisis estadístico descriptivo del rendimiento (%) del extracto de Equisetum giganteum l. (cola de caballo)</i>	55
4.2.4. <i>Tamizaje fitoquímico del extracto hidroetánolico de Equisetum giganteum L.</i>	56
4.2.5. <i>Separación e identificación por cromatografía en capa fina (CCF)</i>	60
4.2.5.1. <i>Identificación de terpenos</i>	60
4.2.5.2. <i>Identificación de flavonoides</i>	61
4.2.5.3. <i>Identificación de taninos</i>	62
4.2.5.4. <i>Identificación de alcaloides</i>	63
4.3. Actividad antimicrobiana del extracto	64
4.3.1. <i>Preparación de la muestra madre</i>	64
4.3.2. <i>Activación de las cepas bacterianas</i>	64
4.3.3. <i>Preparación del pre inóculo</i>	64
4.3.4. <i>Determinación del CMI / Concentración Mínima Inhibitoria</i>	64
4.3.4.1. <i>Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto hidroalcohólico de Equisetum</i>	

<i>giganteum</i> (Cola de Caballo).....	64
4.3.5. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)	67
4.3.5.1. Concentración Mínima Bactericida (CMB) del extracto hidroalcohólico de <i>Equisetum giganteum</i> (Cola de Caballo).....	67
4.3.6. Antibiograma (Método de Kirby Bauer)	70
4.3.6.1. Antibiograma <i>Enterococcus faecalis</i>	70
4.3.6.2. Antibiograma <i>Klebsiella pneumoniae</i>	73
4.3.6.3. Antibiograma <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	76
CONCLUSIONES	80
RECOMENDACIONES	81
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1: Clasificación taxonómica de la especie <i>Equisetum giganteum</i> L.	13
Tabla 2-2: Composición química de <i>Equisetum giganteum</i> L.	13
Tabla 2-3: Aplicaciones tradicionales del género <i>Equisetum</i> en países del área	16
Tabla 2-4: Métodos de extracción.....	17
Tabla 2-5: Viabilidad, propagación y transmisión.....	28
Tabla 3-1: Equipos, materiales, reactivos e insumos utilizados.....	41
Tabla 4-1: Cenizas totales de <i>Equisetum giganteum</i> L. crudo	51
Tabla 4-2: Humedad de <i>Equisetum giganteum</i> L.	51
Tabla 4-3: Características organolépticas del extracto hidroalcohólico de <i>Equisetum giganteum</i> L.....	53
Tabla 4-4: Rendimiento de los extractos de <i>Equisetum giganteum</i> L.....	55
Tabla 4-5: Análisis estadístico descriptivo del rendimiento (%)	55
Tabla 4-6: Tamizaje fitoquímico del extracto hidroetánolico de <i>Equisetum giganteum</i> L.	56
Tabla 4-7: Determinación de la CMI del extracto de <i>Equisetum giganteum</i> sobre <i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i>	65
Tabla 4-8: Determinación de la CMI del extracto de <i>Equisetum giganteum</i> sobre <i>Klebsiella</i> <i>pseudomoniae</i>	65
Tabla 4-9: Determinación de la CMI del extracto de <i>Equisetum giganteum</i> sobre <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	66
Tabla 4-10: Determinación de la CMB del extracto hidroalcohólico de <i>Equisetum giganteum</i> sobre <i>Enterococcus faecalis</i>	67
Tabla 4-11: Determinación de la CMB del extracto hidroalcohólico de <i>Equisetum giganteum</i> sobre <i>Klebsiella pseudomoniae</i>	68
Tabla 4-12: Determinación de la CMB del extracto hidroalcohólico de <i>Equisetum giganteum</i> sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	69
Tabla 4-13: Antibiograma <i>Enterococcus faecalis</i>	70
Tabla 4-14: ANOVA <i>Enterococcus faecalis</i>	72
Tabla 4-15: Antibiograma <i>Klebsiella pneumoniae</i>	73
Tabla 4-16: ANOVA <i>Klebsiella pneumoniae</i>	75
Tabla 4-17: Antibiograma <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	77
Tabla 4-18: ANOVA <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	79

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 2-1: <i>Equisetum giganteum L.</i>	12
Ilustración 4-1: Sistemas de percolación usando solvente hidroalcohólico.	52
Ilustración 4-2: Extracto hidroalcohólico de <i>Equisetum giganteum L.</i>	53
Ilustración 4-3: Identificación de terpenos	61
Ilustración 4-4: Identificación de flavonoides	62
Ilustración 4-5: Identificación de taninos	62
Ilustración 4-6: Identificación de alcaloides.....	63
Ilustración 4-7: Crecimiento bacteriano (CMI).....	67
Ilustración 4-8: Comparación de las CMB de las cepas estudiadas.	69
Ilustración 4-9: Comparación de halos de Inhibición del <i>Enterococcus faecalis</i>	71
Ilustración 4-10: Comportamiento de las variables concentración del extracto y halos de inhibición en el <i>Enterococcus faecalis</i>	73
Ilustración 4-11: Comparación de halos de Inhibición del <i>Klebsiella pneumoniae</i>	74
Ilustración 4-12: Comportamiento de las variables concentración del extracto.....	76
Ilustración 4-13: Comparación de halos de Inhibición del <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	78
Ilustración 4-14: Comportamiento de las variables concentración del extracto.....	79

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** OBTENCIÓN DE LA MATERIA VEGETAL EN EL SECTOR LA FLORIDA, UBICADO EN LA PARROQUIA SAN MIGUEL DE CONCHAY, LIMÓN INDANZA- MORONA SANTIAGO
- ANEXO B:** PREPARACIÓN DE MATERIA VEGETAL PARA EL PROCESO DE SECADO
- ANEXO C:** PREPARACIÓN DE MATERIA VEGETAL PARA EL PROCESO DE PULVERIZACIÓN
- ANEXO D:** PREPARACIÓN DE LA MATERIA VEGETAL PARA EL PROCESO DE PERCOLACIÓN
- ANEXO E:** OBTENCIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *EQUISETUM GIGANTEUM L.* (COLA DE CABALLO)
- ANEXO F:** RESULTADOS DE CONTROL DE CALIDAD DE LA MATERIA VEGETAL, DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD Y CENIZAS TOTALES
- ANEXO G:** RESULTADOS DE LA CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *EQUISETUM GIGANTEUM L.* (COLA DE CABALLO)
- ANEXO H:** RESULTADOS DEL TAMIZAJE DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *EQUISETUM GIGANTEUM L.* (COLA DE CABALLO)
- ANEXO I:** ACTIVACIÓN DE CEPAS ATCC *ENTEROCOCCUS FAECALIS*, *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*.
- ANEXO J:** RESULTADOS DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA DEL EXTRACTO *EQUISETUM GIGANTEUM L.* (COLA DE CABALLO)
- ANEXO K:** RESULTADOS ANTIBIOGRAMA EN CONCENTRACIONES 3000, 1500, 750, 350 Y 187.5 (MG/ML) DEL EXTRACTO *EQUISETUM GIGANTEUM L.* (COLA DE CABALLO)

RESUMEN

La resistencia antimicrobiana es un problema de salud pública que amenaza la eficacia de los tratamientos y aumenta la morbilidad y mortalidad asociada a las infecciones, el uso de plantas medicinales, como el extracto de *Equisetum giganteum L.*, proporciona una fuente potencial de compuestos antimicrobianos efectivos, esta investigación tuvo como objetivo determinar el efecto antimicrobiano in vitro del extracto de *Equisetum giganteum L.* sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae* mediante cepas ATCC. El extracto se obtuvo por el método de percolación, se utilizó un enfoque cuantitativo y aplicado, se llevaron a cabo pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para medir la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) del extracto, se clasificó como estudio experimental ya que implicó la manipulación controlada de la variable independiente en este caso el extracto de *Equisetum giganteum L.*, sobre cepas bacterianas, posteriormente se realizó un análisis estadístico ANOVA para evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de extracto sobre las cepas mencionadas. Los resultados revelaron que las muestras del extracto tuvieron un contenido promedio de cenizas totales de 11,36% y una humedad de 5,022%, el tamizaje fitoquímico mostró la presencia de compuestos fenólicos como flavonoides, cumarinas, alcaloides y triterpenos, la mayoría de las fracciones demostraron significativa actividad antimicrobiana, siendo 750 mg/ml la concentración más potente, la prueba de Kirby-Bauer indicó sensibilidad, mostrando una actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum L.* contra las cepas Gram positivas y Gram negativas, el análisis ANOVA demostró que la eficacia del extracto varió dependiendo la concentración, mostrando halos de inhibición de 3000 mg/ml y 1500 mg/ml en las concentraciones altas. Se concluyó que las dosis bajas no podrían ser suficientes para inhibir el crecimiento bacteriano, y se sugirió que *Equisetum giganteum L.* tiene un potencial considerable como agente antimicrobiano en condiciones específicas de concentración.

Palabras clave: <FITOTERAPIA>, <ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA>, <EQUISETUM GIGANTEUM L.>, <CEPAS ATCC>, <CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)>, <CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB)>, <MÉTODO DE KIRBY-BAUER >.

0774-DBRA-UPT-2024



ABSTRACT

The main objective of this research study was to focus on antimicrobial resistance which is a public health problem that threatens the effectiveness of treatments and increases morbidity and mortality associated with infections, the use of medicinal plants, such as *Equisetum giganteum L.* extract, provides a potential source of effective antimicrobial compounds, this research aimed to determine the in vitro antimicrobial effect of *Equisetum giganteum L.* extract on *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* and *Klebsiella pneumoniae* using ATCC strains. The extract was obtained by the percolation method, a quantitative and applied approach was used, antimicrobial susceptibility tests were carried out to measure the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the extract, it was classified as an experimental study since it involved the controlled manipulation of the independent variable in this case the extract of *Equisetum giganteum L.*, on bacterial strains, subsequently an ANOVA statistical analysis was performed to evaluate the effect of the different concentrations of extract on the mentioned strains. The results revealed that the extract samples had an average total ash content of 11.36% and a moisture content of 5.022%, the phytochemical screening showed the presence of phenolic compounds such as flavonoids, coumarins, alkaloids and triterpenes, most of the fractions showed significant antimicrobial activity, being 750 mg/ml the most potent concentration, the Kirby-Bauer test indicated sensitivity, showing antimicrobial activity of the hydroalcoholic extract of *Equisetum giganteum L.* against Gram-positive and Gram-negative strains, ANOVA analysis showed that the efficacy of the extract varied depending on the concentration, showing inhibition halos of 3000 mg/ml and 1500 mg/ml at high concentrations. It was concluded that low doses could not be sufficient to inhibit bacterial growth, and it was suggested that *Equisetum giganteum L.* has considerable potential as an antimicrobial agent under specific concentration conditions.

Keywords: <PHYTOTHERAPY>, <ANTIMICROBIAL ACTIVITY>, <EQUISETUM GIGANTEUM L.>, <CEPAS ATCC>, <MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION(MIC)>, <MINIMUM BACTERICIDE CONCENTRATION (MBC)>, <KIRBY-BAUER METHOD>.



Mgs. Evelyn Carolina Macias Silva

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales se utilizan con fines terapéuticos desde hace mucho tiempo debido a su riqueza en principios activos, pero su uso, al igual que el de los medicamentos, debe realizarse con precaución ya que, al igual que tienen propiedades farmacológicas, también pueden ser tóxicas dependiendo la concentración (Caceres, 2018).

Equisetum giganteum L. (cola de caballo) es un helecho perenne de la familia *Equisetaceae*. Tiene un tallo fértil amarillento no fotosintético, que produce esporas. Las ramificaciones estériles es el producto medicinal de la planta (Equiseti herba) mencionado en la Farmacopea Europea. La cola de caballo es una planta que crece y se propaga fácilmente cuando se planta en campo abierto, especialmente en pastos, suelos húmedos y pantanosos (Medina, 2016). Los compuestos fitoquímicos más conocidos de *Equisetum giganteum* L. son flavonoides, ácidos fenólicos, alcaloides, fitoesteroles, taninos y triterpenoides. Varios estudios han descrito diferentes efectos biológicos del extracto de *E. giganteum* L. o té con extracto natural, como propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antibacterianas y antifúngicas (Swaminathan, y otros, 2013).

La especie más estudiada es *E. arvense*, pero *E. giganteum* L., también tiene una larga historia de uso como planta medicinal tradicional para curar numerosas enfermedades. Se han informado efectos similares junto con la actividad antioxidante y antimicrobiana por lo tanto, se puede esperar que *E. giganteum* sirva como una rica fuente de compuestos biológicamente activos. Los usos terapéuticos del *Equisetum giganteum* L. son utilizados por varios grupos étnicos en todo el mundo que han generado validaciones farmacológicas por parte de varios investigadores, la mayoría de las cuales se basan en información de primera mano obtenida de la población local, así como en la literatura disponible (Alves, 2015)).

Generalmente se estudian en forma de aceites esenciales y extractos, ambos ricos en sustancias activas. La extracción debe realizarse con disolventes de baja toxicidad y puede ser en frío o en caliente (Phytochemistry and Pharmacology of the Genus *Equisetum* (Equisetaceae): A Narrative Review of the Species with Therapeutic Potential for Kidney Diseases., 2021). La base de aplicación de los extractos de plantas en la conservación de alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos son sus propiedades funcionales como la actividad antimicrobiana y antioxidante, que se debe a una variedad de compuestos biológicamente activos que se estudió mediante un análisis cromatográfico y tamizaje fitoquímico utilizando diferentes ensayos para evaluar el contenido de taninos, flavonoides alcaloides, terpenos que son los responsables de las propiedades farmacológicas de la cola de caballo (Tamizaje fitoquímico, fenoles totales y actividad antioxidante de *citrus aurantium*., 2022).

Para verificar la actividad antimicrobiana del extracto, fue necesario realizar pruebas de sensibilidad. Entre estas pruebas, las más citadas son la prueba de difusión en disco, la prueba de concentración mínima inhibitoria (CMI) y prueba de concentración mínima bactericida (CMB) todas estas recomendadas por el Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) (antiguo National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS) (CLSI, 2014), que requiere un microorganismo con una cepa reconocida, es decir, American Type Culture Collection, o simplemente ATCC (Sood, y otros, 2008).

Al igual que las plantas, los microorganismos también presentan una gran variedad de géneros y especies, clasificados como Gram positivos, como el *Enterococcus faecalis* o Gram negativos, como *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Estos microorganismos son oportunistas, que suelen aparecer en individuos con baja inmunidad, y son más frecuentes en las infecciones hospitalarias, además pueden mutar o transferir genes y en consecuencia, volverse resistentes a los fármacos antimicrobianos, lo que dificulta el tratamiento terapéutico, razón por la cual es tan importante descubrir nuevos productos farmacoterapéuticos, ya sean sintéticos o naturales (Fariñas, y otros, 2007).

Varios estudios han demostrado que los polifenoles de las plantas pueden ser una alternativa a los antibióticos contra patógenos microbianos. A partir de estos resultados obtenidos previamente, el objetivo de esta investigación fue probar el extracto de *Equisetum giganteum* L. por su actividad antimicrobiana y por propiedades antiinflamatorias y antioxidantes contra las cepas ATCC de *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae*. La planta utilizada proviene de áreas no contaminadas del sector La Florida, ubicado en la parroquia San Miguel de Conchay, distrito de Limón Indanza, el momento de la cosecha fue en el mes de noviembre. Para tener una mejor visión del efecto del extracto se optó por utilizar cepas Gram positivas, Gram negativas mediante la prueba de difusión en disco, concentración inhibitoria mínima (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB).

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Planteamiento del problema

El uso de plantas medicinales como fuente de compuestos antimicrobianos se ha convertido en un tema de interés en la búsqueda de sustitutos para eliminar bacterias patógenas resistentes a los agentes antimicrobianos convencionales. Debido al aumento de la resistencia a los antimicrobianos, el uso de plantas medicinales con propiedades antibactericidas se ha convertido en uno de los nuevos tratamientos para las infecciones bacterianas. En este contexto, el extracto *Equisetum giganteum* L., también conocido como cola de caballo, se considera una opción prometedora debido a sus potenciales efectos antibióticos (Ríos, y otros, 2005).

La resistencia antimicrobiana es un problema de salud pública que amenaza la eficacia de los tratamientos y aumenta la morbilidad y mortalidad asociada a las infecciones (Algarate, S., et al., 2020). En este contexto, el uso de plantas medicinales, como el extracto de *Equisetum giganteum* L., proporciona una fuente potencial de compuestos antimicrobianos efectivos, por consiguiente, es fundamental realizar estudios científicos que evalúen el efecto antimicrobiano de este extracto sobre cepas específicas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae*, brindando información relevante para el desarrollo de nuevas terapias.

A nivel Nacional, el extracto de la (Cola de caballo) ha sido propuesto como un posible agente antimicrobiano, razón la cual es importante investigar y evaluar el potencial antibactericidas del extracto de *Equisetum giganteum* L, especialmente frente a las cepas ATCC de *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae*, estas bacterias representan importantes patógenos asociados a infecciones hospitalarias y presentan altos niveles de resistencia a los antibactericidas convencionales (Costa, J., et al., 2020). La identificación de nuevas opciones terapéuticas basadas en plantas medicinales podría tener un impacto significativo en el manejo de estas infecciones y contribuir a la lucha contra la resistencia antibacteriana (CLSI, 2018).

En este entorno es relevante llevar a cabo investigaciones científicas que permitan evaluar la actividad antimicrobiana del extracto de *Equisetum giganteum* L. a nivel de las cepas específicas mencionadas, por lo tanto, el presente estudio tiene como objetivo determinar el efecto antimicrobiano in vitro del extracto de *Equisetum giganteum* L, sobre el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae* utilizando cepas ATCC. La realización de este estudio experimental permitirá evaluar de manera sistemática y

científica las propiedades antimicrobianas del extracto de *Equisetum giganteum L.*, proporcionando información relevante sobre su potencial uso como agente terapéutico frente a las bacterias objeto de estudio.

1.2. Limitaciones y delimitaciones

1.2.1. Limitaciones

Limitación de cultivo in vitro: Dado que este estudio se lleva a cabo en un entorno de laboratorio "in vitro," es posible que los resultados obtenidos no se traduzcan directamente a la eficacia real en un organismo vivo. La respuesta de los microorganismos a los extractos naturales puede diferir en condiciones más complejas, como un sistema biológico.

Variabilidad de cepas: Aunque las cepas ATCC son estándar, puede haber diferencias genéticas entre ellas y las cepas clínicas de las mismas bacterias. Esto podría influir en la respuesta antimicrobiana y limitar la generalización de los resultados a situaciones clínicas reales.

Condiciones de laboratorio: La configuración de las pruebas en un laboratorio puede no representar completamente las condiciones naturales. Factores como la temperatura, el pH y la presión pueden variar, lo que podría afectar la actividad antimicrobiana del extracto.

1.2.2. Delimitaciones

Esta investigación se la realizará en el laboratorio de microbiología clínica de la Facultad de ciencias en el periodo octubre 2023- marzo 2024.

1.3. Problema General de la Investigación

¿Cuál es el efecto antimicrobiano in vitro del extracto de *Equisetum giganteum L.* (Cola de caballo) sobre el crecimiento de tres bacterias patógenas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae*?

Siendo estas bacterias muy conocidas por su capacidad de desarrollar resistencia a los antibióticos, se planteó la pregunta ¿El extracto *E. giganteum* puede ser portador de una cantidad considerable de agentes antimicóticos efectivos?

1.4. Problemas Específicos de la Investigación

¿Cuál es la susceptibilidad antimicrobiana del extracto de *Equisetum giganteum L.* frente a las cepas ATCC de *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae*?

Esto implica determinar si el extracto tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de estas bacterias y, en caso afirmativo, en qué medida.

¿Podría la Concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración Mínima Bactericida (CMB) del extracto de *E. giganteum* inhibir el crecimiento de las cepas mencionadas?

Se busca establecer la concentración mínima del extracto necesaria para prevenir el crecimiento de las bacterias y la concentración mínima que resulta en la muerte bacteriana.

¿Existe diferencias significativas en los efectos antimicrobianos del extracto de *Equisetum giganteum L.* entre las tres cepas estudiadas?

Este análisis permitirá determinar si el extracto afecta de manera similar o diferente a cada una de las bacterias y si existen diferencias estadísticamente significativas.

1.5. Objetivos de la investigación

1.5.1. Objetivo general

Determinar el efecto antimicrobiano in vitro del extracto de *Equisetum giganteum L.* (Cola de caballo) sobre el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae* utilizando cepas ATCC.

1.5.2. Objetivos específicos

- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto de *Equisetum giganteum* frente a las cepas ATCC de *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae*.
- Establecer la susceptibilidad antimicrobiana del extracto de *Equisetum giganteum L.* para cada cepa mediante el método Kirby-Bauer.

- Mostrar la relevancia de las propiedades antimicrobianas del *Equisetum giganteum* L. mediante el análisis de varianza ANOVA comparando las diferencias en las tres cepas estudiadas.

1.6. Justificación

Diversos estudios han demostrado que muchas plantas poseen compuestos bioactivos con actividad antimicrobiana, que pueden actuar inhibiendo el crecimiento bacteriano y combatiendo las infecciones. En particular, el *Equisetum giganteum* L. ha sido objeto de interés debido a sus posibles propiedades antimicrobianas, que pueden ser atribuidas a los fitoquímicos presentes en su composición (Organización Mundial de la Salud, 2014). Estos compuestos podrían interferir con los procesos vitales de las bacterias, lo que justifica la necesidad de evaluar su actividad frente a cepas específicas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae*.

Además, la identificación de compuestos antimicrobianos efectivos derivados de plantas medicinales como el *Equisetum giganteum* L. podría tener un impacto significativo en la atención médica y contribuir a la lucha contra la resistencia antimicrobiana (Huayta y Calsin, 2017). También, este estudio podría proporcionar información útil para el desarrollo de nuevos medicamentos o formulaciones basadas en extractos de plantas, ofreciendo opciones terapéuticas más seguras y potencialmente más accesibles.

1.7. Hipótesis

Hipótesis nula (H0): El extracto de *Equisetum giganteum* L. no tiene efecto antimicrobiano in vitro sobre el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae* utilizando cepas ATCC.

Hipótesis alternativa (H1): Existe efecto antimicrobiano in vitro del extracto de *Equisetum giganteum* L. sobre el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae* utilizando cepas ATCC.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de investigación

Las infecciones bacterianas representan un desafío significativo para la salud pública, y la creciente prevalencia de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos convencionales ha generado la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas. En este contexto, las plantas medicinales han sido ampliamente investigadas por su potencial actividad antimicrobiana. Existen un sinnúmero de plantas medicinales que han despertado el interés farmacológico entre ellas se encuentra el *Equisetum giganteum L.*, o más conocida con su nombre común de Cola de caballo, se han realizado estudios previos que han señalado la presencia de compuestos fenólicos, como flavonoides, cumarinas, saponinas, a los cuales se les puede atribuir la actividad antimicrobiana (Chávez, y otros, 2021). A continuación, se detalla los estudios mas relevantes:

En el estudio de Queiroz, Geisiany; Politi, Flavio; Rodrigues, Edvanio; Souza, Tatiana; Souza, Raquel; Cardoso, Cássia; Santos, Lourdes; Pietro, Rosemeire, titulada “Phytochemical Characterization, Antimicrobial Activity, and Antioxidant Potential of *Equisetum hyemale L.* (Equisetaceae) Extracts”, en el que se evaluó la actividad antimicrobiana del extracto de *Equisetum hyemale* frente a varias cepas bacterianas, incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae*. El objetivo principal de este estudio fue evaluar las habilidades antioxidantes y antimicrobianas de *Equisetum hyemale* mediante un análisis fitoquímico caracterizando los extractos etanólicos y metanólicos del 70% de *E. hyemale* a través de un análisis espectrofotométricos y cromatografía líquida de alta resolución utilizando un detector amperométrico de pulso (HPAEC-PAD). La actividad de eliminación de radicales libres fue aproximadamente del 30%, y se demostró una mayor actividad antifúngica contra hongos dermatofitos, con una concentración inhibitoria mínima y una concentración fungicida mínima de 0.62 mg/mL para *Trichophyton rubrum* y *Microsporum canis*. Debido a su actividad antifúngica y acción antioxidante, que están relacionadas con pequeñas variaciones en su composición fitoquímica, los extractos presentan un gran potencial para aplicaciones terapéuticas o el desarrollo de productos (Phytochemical Characterization, Antimicrobial Activity, and Antioxidant Potential of *Equisetum hyemale L.* (Equisetaceae) Extracts, 2015).

La investigación realizada por Rafaela Alves da Silva Alavarce “Fitoterápico *Equisetum giganteum* e estomatite protética: estudo da ação antimicrobiana, antiaderente e anti-inflamatória contra *Candida albicans*, e potencial citotóxico sobre células epiteliais do palato humano, en esta

investigación se evaluó el potencial antimicrobiano y antiinflamatorio del extracto de *E. giganteum* L. sobre *C. albicans*, y evaluó el potencial citotóxico del extracto sobre células epiteliales en palatinas humanas. El método para la preparación del extracto se realizó a partir de plantas frescas secadas a 40° C durante 48 h. La materia prima en polvo (1,3 kg) se extrajo con EtOH/H₂O (7:3 v/v) por percolación a temperatura ambiente. Para este estudio se utilizaron *Staphylococcus aureus* (ATCC 6536), *Escherichia coli* (O:124) y *C. albicans* (SC 5314). La acción antimicrobiana in vitro se analizó por el método de micro dilución en caldo. La composición química del extracto hidroetanólico del *E. giganteum* al 70% manifestó una notoria presencia de compuestos fenólicos procedentes de los ácidos cafeico y ferúlico y heterósidos, flavonoides originarios de la quercetina y el kaempferol, además de *estirilpironas*, el *E. giganteum*, mostro una actividad antimicrobiana considerable contra los microorganismos ensayados especialmente en las concentraciones altas. Adicionalmente se encontró que todas las dosis del extracto probadas expusieron una actividad antiinflamatoria y no se encontró citotoxicidad en contacto con células humanas por lo que el extracto de *E. giganteum* puede convertirse en una alternativa promisoriosa para el tratamiento tópico y la prevención de la candidiasis oral y la estomatitis de la dentadura postiza (Alves, 2015).

El estudio efectuado por Thaise Boeing, Karyne Garcia, Tafarelo Moreno, Arquimedes Gasparotto Junior, Luisa Mota da Silva, Priscila de Souza titulado “Phytochemistry and Pharmacology of the Genus Equisetum (Equisetaceae): A Narrative Review of the Species with Therapeutic Potential for Kidney Diseases” el objetivo de esta revisión fue recopilar informes científicos sobre especies de *Equisetum* con propiedades farmacológicas relevantes y/o potencial terapéutico para enfermedades renales, este estudio bibliográfico demostró que el uso tradicional más extendido de *Equisetum* es como diurético, seguido del tratamiento de enfermedades genitourinarias (enfermedades renales, uretritis, cálculos renales y otras), inflamación, cicatrización de heridas, enfermedades reumáticas, prostatitis e hipertensión. La especie más popular del género *Equisetum* con uso medicinal es *E. arvense* cuyo efecto diurético se confirmó en modelos animales y ensayos clínicos. Se concluyó que existen varias otras especies del género *Equisetum* con uso medicinal y potencial terapéutico, mostrando diferentes acciones biológicas. En cuanto a la composición química, contiene muchos componentes activos, como alcaloides, flavonoides, fenol, fitoesteros, saponinas, esteroides, ácido silícico, taninos, triterpenoides y aceites volátiles, teniendo un gran potencial en el tratamiento de los trastornos renales (Phytochemistry and Pharmacology of the Genus Equisetum (Equisetaceae): A Narrative Review of the Species with Therapeutic Potential for Kidney Diseases., 2021).

En el estudio realizado por Lida Vanessa Hernández Moreno; Ludy Cristina Pabón Baquero; Patricia Hernández Rodríguez, titulado: “Estudio fitoquímico y actividad antimicrobiana de

plantas medicinales empleadas para el control de infecciones urinarias”; se tuvo como objetivo realizar un análisis fitoquímico preliminar y evaluar la actividad antimicrobiana de doce extractos etanólicos de plantas que se utilizan en la medicina tradicional colombiana para controlar las infecciones urinarias (IU). Para realizar el estudio se recolectaron las especies *Anthoxanthum odoratum* (grama), *Urera caracasana* (ortigón), *Equisetum bogotenses* (cola de caballo), *Parietaria officinalis* (parietaria), *Achyrocline bogotensis* (vira vira), *Kohleria hirsuta* (caracola), *Taraxacum officinale* (diente de león), *Sedum praealtum* (siempre viva), *Portulaca oleracea* (verdolaga), *Petroselinum sativum* (perejil), la actividad antimicrobiana se evaluó mediante difusión en agar, micro dilución en placa y bioautografía contra *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25923). En cada uno de los tres métodos, se descubrió que los extractos inhibieron *S. aureus* y *P. aeruginosa*, mientras que *E. coli* no lo hizo. Se demostró mediante bioautografía utilizando reveladores específicos que los esteroides, triterpenoides, fenoles y flavonoides podrían ser los metabolitos que causan la actividad. El enfoque de este tipo de investigación fue el aislamiento de principios activos útiles para la creación de medicamentos para tratar la IU (Hernández, y otros, 2021).

En el trabajo de titulación realizado por Medina Bernal Milagros titulado: “Determinación del efecto antimicrobiano in vitro del extracto de *Equisetum Giganteum L.* (Cola de caballo) sobre el crecimiento de *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia Coli* y *Candida Albicans*. El estudio examinó los efectos antimicrobianos in vitro de *Equisetum giganteum L.*, sobre la propagación de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. En la Universidad Católica de Santa María de Arequipa – Perú, se realizaron extracciones mediante el método de percolación, en esta investigación se manipuló tres componentes solubles: hexano (disolvente no polar), acetato de etilo (disolvente polar aprótico) y solvente hidroalcohólico (disolvente prótico). Para la identificación de los componentes secundarios del extracto hidroalcohólico se utilizó cromatografía en capa fina (CCF), adicionalmente se realizaron pruebas antimicrobianas in vitro como el método de dilución en tubo para determinar las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) y la siembra en agar para las concentraciones bactericidas mínimas (CBM), en esta investigación contó con la manipulación de doce cepas de cada especie. El extracto hidroalcohólico tuvo un alto rendimiento del 46.8%. Se descubrieron alcaloides, terpenos, flavonoides y taninos como componentes secundarios. Los hallazgos demostraron que el extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum L.* tiene una actividad antibacteriana más fuerte contra bacterias gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Se requirió una concentración mayor en bacterias gram negativas, como *Escherichia coli*, debido a su menor sensibilidad. (Medina, 2016)

Existen varios estudios con antecedentes prometedores a nivel mundial, por lo tanto a nivel

nacional es necesario profundizar en la evaluación de la actividad antimicrobiana de *Equisetum giganteum* frente a las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae*, utilizando métodos estandarizados y determinando la CMI y CMB del extracto para cada cepa. Además, es necesario realizar análisis estadísticos adecuados para determinar la significancia de los resultados obtenidos.

2.2. Referencias teóricas

2.2.1. Plantas medicinales

El uso de plantas medicinales se había enfocado en el tratamiento en lugar de la prevención de enfermedades, sin embargo, en los últimos tiempos se ha producido un gran número de investigaciones sobre el uso de plantas medicinales y sus componentes para prevenir enfermedades. La Organización Mundial de la Salud (OMS) definió la Medicina Tradicional como el conjunto de todas las prácticas y conocimientos que pueden ser explicadas o no, utilizadas para el diagnóstico, prevención y erradicación de desequilibrios físicos, mentales o sociales, que se basan exclusivamente en la experiencia práctica y la observación, transmitidos de generación en generación, ya sea verbalmente o por escrito, las plantas medicinales están presentes en más del 90% de las recetas y remedios tradicionales (OMS, 2012).

2.2.1.1. ¿Qué es una planta medicinal?

Una planta medicinal es cualquier planta que se caracteriza por tener en uno o más de sus órganos sustancias que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o que son precursoras para la síntesis de fármacos útiles. Esta descripción permite distinguir entre plantas medicinales cuyas propiedades terapéuticas y componentes han sido establecidos científicamente, y plantas que se consideran medicinales pero que aún no han sido sometidas a un estudio científico exhaustivo (Evans, 2018).

Desde hace muchos años, diversas plantas se han utilizado en la medicina tradicional. Algunas plantas parecen ser efectivas, pero puede que no haya suficiente evidencia científica (ensayos doble ciego, por ejemplo) para confirmar su eficacia. Los farmacéuticos y farmacólogos usan el término "drogas crudas de origen natural o biológico" para describir plantas enteras o partes de plantas con propiedades medicinales. Una definición de plantas medicinales para los fines de esta investigación debe incluir lo siguiente: Plantas o partes de plantas utilizadas como medicina en preparaciones galénicas (como decocciones e infusiones, por ejemplo) (Evans, 2018).

Las plantas medicinales desempeñan un papel crucial en la prevención de enfermedades,

integrándose eficazmente en las estrategias de prevención existentes, no obstante es necesario realizar esfuerzos consientes para identificar, reconocer y posicionar a las plantas medicinales adecuadamente, ya que estas han sido aliadas de la humanidad a lo largo de los años en la búsqueda de soluciones alternativas en contra de afecciones y enfermedades, el uso de estas plantas se remonta hasta las civilizaciones más antiguas quienes descubrieron que las plantas que los rodeaba tenían propiedades curativas. En este contexto de la fitoterapia existen una gran variedad de especies vegetales que han sido reconocidas por sus beneficios terapéuticos tales como el *Equisetum giganteum* o más conocida como Cola de Caballo, que es una planta medicinal que ha generado un gran interés por sus efectos benéficos en la medicina tradicional, principalmente se encuentra vinculada a soluciones en contra de afecciones del tracto urinario y otras condiciones de salud, que la ha llevado a una creciente investigación científica de sus propiedades curativas. (Ruiz M., 2017).

2.2.2. *Equisetum giganteum* L. (Cola de caballo)

El *Equisetum giganteum* L., es una planta perenne de la familia *Equisetaceae* que se la conoce generalmente en Latinoamérica como Cola de caballo, esta ha sido utilizada tradicionalmente debido a sus propiedades medicinales, estudios científicos han identificado una variedad de compuestos fenólicos, incluidos fenoles, flavonoides, saponinas, terpenoides y minerales. (Huayta, y otros, 2017), debido a sus propiedades curativas se la ha utilizado frecuentemente en la medicina popular ya que se cree que por su variedad de compuestos bioactivos proporciona propiedades terapéuticas, el creciente interés de la actividad antimicrobiana de *Equisetum giganteum* L. se ha demostrado en investigaciones previas contra varias cepas bacterianas (Costa, J., et al., 2020).

Entre las propiedades atribuidas al *Equisetum giganteum* L. según Costa, J., et al. (2020) se encuentran:

- Es utilizado tradicionalmente como diurético, ayuda a estimular la eliminación de líquidos y promueve la salud renal
- También se le atribuyen propiedades antiinflamatorias como la reducción en la inflamación en tratamientos de artritis y gota
- Se ha utilizado como cicatrizante para acelerar la curación de heridas y promover la regeneración de tejidos
- Los compuestos bioactivos presentes en el *Equisetum giganteum* pueden ser utilizados como antioxidantes ayudando a proteger las células del daño causado por radicales libres

- Algunos estudios han demostrado que extractos de *Equisetum giganteum* L. pueden tener efectos antimicrobianos contra ciertos microorganismos como bacterias y hongos. (Costa, J., et al., 2020).

2.2.3. Descripción botánica de *Equisetum giganteum* L.

El *Equisetum giganteum* L. que generalmente es conocido como Cola de caballo gigante, pertenece a la familia *Equisetaceae*, es una planta perenne que se caracteriza por su tamaño y aspecto único e impresionante, posee un tallo erguido y hueco que crece hasta alcanzar una altura de 2 metros o más, el tallo se encuentra dividido en secciones o segmentos que se asemejan a articulaciones, lo que le da una apariencia similar a una caña de bambú, los segmentos están unidos por una vaina de color marrón y pueden variar en número dependiendo de la especie y la edad de la planta (OMS, 2012).

Las ramificaciones laterales de la planta son limitadas, distribuidas en verticilos alrededor del tallo principal, cada rama lateral está cubierta por hojas pequeñas y escamosas que se superponen entre sí, de color verde claro, con forma lanceolada o lineal. Las raíces del *Equisetum giganteum* L. son fibrosas y se extienden en el suelo, proporcionando estabilidad. La planta se muestra en la Ilustración 2-1 (Chávez, y otros, 2021).



Ilustración 2-1: *Equisetum giganteum* L.

Fuente: Catálogo de alta montaña Universidad EIA. 2023.

En cuanto a su hábitat, el *Equisetum giganteum* L. prefiere crecer en lugares húmedos y sombreados, como orillas de ríos, zonas pantanosas y bosques siendo nativo de varias regiones del mundo, incluyendo América del Norte, América Central, Sudamérica y Europa (OMS, 2012).

2.2.4. Clasificación taxonómica

La Clasificación taxonómica de la especie *Equisetum giganteum* L. se muestra en la Tabla 2-1 que se describe a continuación:

Tabla 2-1: Clasificación taxonómica de la especie *Equisetum giganteum* L.

DIVISIÓN	MONILIOPHYTA
CLASE	EQUISETOPSIDA
ORDEN	EQUISETALES
FAMILIA	<i>EQUISETACEAE</i>
GENERO	<i>Equisetum</i>
ESPECIE	<i>Equisetum giganteum</i> L.

Fuente: (Paiba, y otros, 2020).

Realizado por: Zhicay, I. 2023,

2.2.5. Componentes químicos de *Equisetum giganteum* L.

Equisetum giganteum contiene varios compuestos químicos que se cree contribuyen a sus propiedades medicinales, entre los componentes químicos identificados se encuentran los flavonoides, saponinas, ácidos fenólicos, compuestos fenilpropanoides y minerales como el silicio, estos compuestos pueden tener propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas y diuréticas (OMS, 2012).

La composición química de *Equisetum giganteum* L. es notable por su singularidad, ya que incluye componentes poco comunes, tales como ácidos, glucósidos saponínicos, flavonoides, y otros compuestos, como se detalla en la Tabla 2-2.

Tabla 2-2: Composición química de *Equisetum giganteum* L.

Familia	Compuesto químico <i>Equisetum giganteum</i> L.
Ácidos Silícico	Oxálico Malico Linonenico Gálico Vanílico
Glucósidos saponínicos	Equisetonina
Alcaloides	Nicotina
Cumarinas	Acido p-cumárico
Ácidos fenólicos	Apigenina 5-O-glucósido Metil éster del ácido 3 nonanoico Ácido dodecanoico Ácido meso tartárico dicafeoil
Flavonoides	Quercetina

	Dihidroquercetina
	Galuteolina
Vitaminas	Ácido ascórbico
	Beta-caroteno
	Riboflavina
	Niacina
Minerales	Calcio
	Cobre
	Hierro
	Magnesio
	Zinc
	Silicio

Fuente: (Paiba, y otros, 2020)

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

La mención de ácidos, glucósidos saponínicos y flavonoides resalta la diversidad y complejidad de los compuestos químicos presentes en *Equisetum giganteum L.*, lo cual puede ser un punto de interés en el estudio de sus propiedades y posibles aplicaciones.

2.2.6. *Actividad antimicrobiana de Equisetum giganteum L.*

Existen varios estudios científicos de la actividad antimicrobiana del *Equisetum giganteum L.* contra diferentes microorganismos, en donde se ha observado que el extracto de Cola de caballo puede inhibir el crecimiento de bacterias, la actividad antimicrobiana se la atribuye principalmente a la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides y otros metabolitos secundarios (Chávez, y otros, 2021).

2.2.6.1. *Actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos*

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios en las plantas y se consideran moléculas naturales importantes debido a sus propiedades bioactivas, los ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, pueden inhibir el crecimiento y la actividad de muchos microorganismos clínicamente importantes, debido a que las diferentes moléculas varían en su estructura y composición química, pueden mostrar diversos efectos antimicrobianos, como la permeabilización y desestabilización de la membrana plasmática o la inhibición de enzimas extracelulares. Además, los mecanismos de acción difieren de los de los antibióticos tradicionales, lo que podría hacer que los fenólicos vegetales sean eficaces contra los patógenos resistentes a los medicamentos. (Cushnie & Lamb, 2011).

Los mecanismos de acción antibacteriana de los compuestos fenólicos aún no están completamente descifrados, pero se sabe por varios autores que estos compuestos involucran muchos sitios de acción a nivel celular, quienes explicaron esta actividad por la modificación de la permeabilidad de las membranas celulares, los cambios en diversas funciones intracelulares inducidas por la unión de hidrógeno de los compuestos fenólicos a las enzimas o por la

modificación de la rigidez de la pared celular con pérdidas de integridad debido a diferentes interacciones con la membrana celular. Así, los flavonoides pueden unirse a proteínas solubles ubicadas fuera de las células y a las paredes celulares de las bacterias, promoviendo la formación de complejos. La literatura existente sobre Relación Cuantitativa Estructura-Actividad para la predicción de la actividad antibacteriana de compuestos fenólicos de peso molecular ligeramente mayor, como ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, cumarinas y quinonas, aún sigue siendo limitada (Cushnie & Lamb, 2011; Cushnie et al., 2014).

2.2.6.2. *Propiedades antimicrobianas de las saponinas*

La palabra 'saponina' proviene del término latino "sapo" (jabón), y tradicionalmente las plantas que contienen saponinas se han utilizado para lavar, químicamente, las saponinas son glicósidos de alto peso molecular en los cuales los azúcares están unidos a un aglicón triterpénico o esteroideo. Algunas saponinas, en general, exhiben una actividad antimicrobiana más fuerte contra las bacterias Gram positivas que contra las bacterias Gram negativas. Según Hemalatha et al. (2013). La fracción de saponinas de los pericarpios de la nuez jabonosa mostró una mayor actividad antibacteriana contra bacterias Gram-positivas que contra bacterias Gram-negativas. Por el contrario, las saponinas aisladas de la corteza del árbol de orquídeas mostraron una mayor actividad antibacteriana para las bacterias Gram negativas que para las Gram positivas en concentraciones que oscilaban entre 2,5 y 10 mg/ml. (Hemalatha et al., 2013).

2.2.6.3. *Actividad antimicrobiana de los terpenoides*

Los terpenoides son utilizados tradicionalmente por el ser humano, desde hace muchos siglos, los cuales aportan sabor y aroma característicos específicos de muchas plantas, se utilizan como agentes antimicrobianos y conservantes, estos compuestos tienen diversa composición química, naturaleza y propiedades biológicas, se los puede obtener de flores, pétalos, hojas, tallos, frutos, raíces y cortezas y las su concentración dependen de la etapa de crecimiento y las condiciones ambientales. Los terpenoides más comunes se incluyen en dos grupos químicos monoterpénicos y sesquiterpénicos, estas dos clases de terpenoides son el grupo más diversificado de bioactivos vegetales que se encuentran abundantemente en muchas plantas. (Saeed et al., 2015).

Además, son conocidos por sus fuertes actividades antimicóticas contra muchas bacterias patógenas y no patógenas, y pueden inhibir el crecimiento de bacterias patógenas Gram-positivas (*S. aureus* y *Staphylococcus epidermidis*) y Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. typhimurium*). En el estudio de Saeed et al. (2015) demostraron que los terpenoides inhibían el crecimiento de diferentes aislados clínicos de *H. pylori* con CIM que oscilaban entre 5 y 50 µg/ml.

Sin embargo, las actividades antifúngicas de estos componentes pueden verse modificadas por el pH en los medios de cultivo y la estructura y estereoquímica de estos compuestos (Saeed et al., 2015).

2.2.7. Usos tradicionales de *Equisetum giganteum* L.

La Cola de caballo ha sido utilizada en la medicina tradicional para tratar una variedad de condiciones de salud, se ha manipulado como diurético para promover la eliminación de líquidos y toxinas del cuerpo, también se la ha considerado para tratar trastornos del sistema urinario, como infecciones del tracto urinario y cálculos renales, otros usos tradicionales incluyen el tratamiento de afecciones de la piel, trastornos gastrointestinales y problemas respiratorios (Chávez, y otros, 2021).

Las aplicaciones tradicionales del género *Equisetum* son diversas y depende del país en donde se lo utiliza, en la Tabla 2-3 se describe las aplicaciones tradicionales de las plantas de este género, de acuerdo al método de preparación y parte de la planta utilizada en países latinoamericanos, además se describe el uso medicinal que se le ha dado al *Equisetum*, en donde se pudo notar que la administración oral es la vía más común para su uso, utilizando la infusión o decocción de las partes aéreas como principal método de preparación. El uso tradicional más extendido de *Equisetum* es como diurético, seguido del tratamiento de enfermedades genitourinarias (enfermedades renales, uretritis, cálculos renales y otras), inflamación, cicatrización de heridas, enfermedades reumáticas, prostatitis e hipertensión (Phytochemistry and Pharmacology of the Genus *Equisetum* (Equisetaceae): A Narrative Review of the Species with Therapeutic Potential for Kidney Diseases., 2021).

Tabla 2-3: Aplicaciones tradicionales del género *Equisetum* en países del área

País	Especies	Parte de la planta	Método de preparación	Uso medicinal
Bolivia	<i>Equisetum giganteum</i> L.	Tallo, planta entera	Decocción	Diarrea, calor de estómago, enfermedades del hígado y riñones, inflamación.
Brasil	<i>Equisetum giganteum</i> L.	Tallos ^a , partes aéreas ^b	Decocción, infusión ^a	Enfermedades reumáticas ^a Diurético, trastornos urinarios, inflamación ^b Pérdida de peso ^c
	<i>Equisetum arvense</i> L.	Partes aéreas	infusión ^{una}	Diurético ^{ab} Remineralización, inflamación ^b
México	<i>Equisetum myriochaetum</i> Schlecht y Cham	Partes aéreas	Infusión ^{ab}	Diabetes tipo 2 ^{abc} Enfermedades renales, diabetes ^d
Chile	<i>Equisetum bogotense</i> Kunth <i>Equisetum giganteum</i> L.	Partes aéreas	Infusión	Diurético
Perú	<i>Equisetum</i>	Partes aéreas	Infusión	Diarrea, diurético, emenagogo,

	<i>giganteum</i> L.				cicatrización de heridas.
Colombia	<i>Equisetum bogotense</i> Kunth	Toda planta	la	Infusión, decocción	Diurético, cálculos renales

Fuente: Boeing, T. et al. (2021).

2.3. Extractos vegetales

Los extractos vegetales son preparaciones obtenidas a partir de material vegetal, como hojas, raíces, flores o frutos, que contienen compuestos químicos de interés debido a sus propiedades terapéuticas o beneficiosas para la salud, estos extractos se utilizan en la medicina herbal, la fitoterapia y la industria farmacéutica para desarrollar medicamentos naturales y productos de cuidado personal (Evans, 2018). En la Tabla 2-4 se mencionan los métodos de extracción más comunes empleados como técnicas para separar y concentrar los compuestos deseables de las plantas.

Tabla 2-4: Métodos de extracción

Técnica	Descripción
Maceración	Consiste en remojar el material vegetal en un disolvente (como agua, alcohol o aceite) durante un período de tiempo específico para permitir que los compuestos se disuelvan en el disolvente.
Percolación	Similar a la maceración, pero con un flujo constante del disolvente a través del material vegetal, lo que permite una extracción más eficiente
Destilación	Se utiliza para extraer aceites esenciales de plantas aromáticas. La destilación por arrastre de vapor es un método común en este caso.
Extracción con CO₂ supercrítico	Este método utiliza dióxido de carbono supercrítico para extraer compuestos de las plantas, lo que permite una extracción precisa y selectiva.
Ultrasonidos	La extracción asistida por ultrasonidos utiliza ondas ultrasónicas para mejorar la extracción de compuestos de las plantas.
Soxhlet	Un método de extracción en el que el material vegetal se coloca en un cartucho y se extraen los compuestos utilizando un disolvente calentado por reflujo.

Fuente: Evans (2018).

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

2.4. Microbiología

La microbiología se define simplemente como el estudio de los microorganismos, donde "micro" significa pequeño y "biología" se refiere al estudio de los seres vivos, es decir estudia microorganismos o microbios que son un grupo diverso de formas de vida simples generalmente diminutas que incluyen bacterias, arqueas, algas, hongos, protozoos y virus, el campo de la microbiología es fundamental para los seres humanos no sólo por las enfermedades infecciosas

causadas por estos microbios sino porque los microorganismos "buenos" necesarios para que podamos vivir en el planeta (Tortora, y otros, 2019) .

El campo de la microbiología ya que los microbios no sólo pueden causar enfermedades, sino que también pueden usarse para desarrollar medicamentos para combatir otros microbios (por ejemplo, la penicilina). Algunos virus parecen causar cáncer, mientras que otros se están evaluando como una forma de combatir el cáncer. (Madigan, y otros, 2018).

La investigación en microbiología ha sido, y sigue siendo, fundamental para satisfacer muchas de las aspiraciones y desafíos mundiales actuales, como mantener la seguridad alimentaria, hídrica y energética para una población sana en una Tierra, la investigación en microbiología también ayudará a responder grandes preguntas como "¿cuán diversa es la vida en la Tierra?" y "¿existe vida en otras partes del Universo?" (Tortora, y otros, 2019) .

2.5. Cepas ATCC

Los microorganismos son una parte esencial de la vida humana y desempeñan funciones clave en el ciclo del carbono y los nutrientes, el descubrimiento de fármacos, las enfermedades humanas, la remediación ambiental, la descomposición y la salud, nuestra comprensión de estos organismos ha mejorado rápidamente con la llegada de las tecnologías de secuenciación y las herramientas bioinformáticas de próxima generación, que nos ha dado una nueva perspectiva sobre la evolución microbiana, aunque existen importantes investigaciones que han llenado numerosas brechas taxonómicas, aún no hemos comenzado a explorar profundamente la diversidad microbiana. Debido a que las cepas microbianas dentro de una especie pueden mostrar una amplia gama de diferencias genéticas, tener un punto de referencia para la identificación microbiana es de enorme ayuda para la investigación en ciencias biológicas. Las cepas tipo ATCC proporcionan esta referencia ya que se consideran el tipo nomenclatural de una especie específica en la que se basa la descripción de la especie (The American Type Culture Collection, 2020).

Debido a que las cepas microbianas dentro de una especie pueden mostrar una amplia gama de diferencias genéticas, tener un punto de referencia para la identificación microbiana es de enorme valor para la investigación en ciencias biológicas. Las cepas tipo ATCC proporcionan esta referencia ya que se consideran el tipo nomenclatural de una especie específica en la que se basa la descripción de la especie. Estas cepas son a menudo, pero no siempre, la primera cepa de una especie que se identifica. (National Library of Medicine, 2018).

El uso de cepas microbianas altamente autenticadas de la ATCC son el desafío para garantizar

que los productos farmacéuticos estén libres de microorganismos objetables, la ATCC garantiza que cada una de las cepas de control de calidad se autentique, gestione y conserve cuidadosamente mediante protocolos que mantienen el genotipo y el fenotipo. Existen tres tipos de cepas ATCC básicas: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (National Library of Medicine, 2018).

2.5.1. Uso de las cepas ATCC

De acuerdo a su uso las cepas ATCC pueden clasificarse de la siguiente manera:

- Para su manejo como cepas de referencia las cepas deben ser obtenidas directamente de una colección certificada con una reseña nacional o internacional, con una siembra o replique de máximo cuatro a partir de la cepa original.
- Para su utilización como cepas de trabajo se obtienen a partir de las cepas de referencia, cultivadas en medios sólidos, estas cepas nunca deben reemplazar a las cepas de referencia.
- Las cepas de reserva se cultivan en el entorno de un laboratorio y son obtenidas a partir de un subcultivo de las cepas de referencia (The American Type Culture Collection, 2020).

2.6. Agentes patógenos

Un agente patógeno, en el contexto de las infecciones y enfermedades, se refiere a cualquier organismo o microorganismo que tiene la capacidad de causar enfermedad en un huésped, aunque los agentes patógenos pueden incluir una variedad de organismos, en esta investigación nos centraremos exclusivamente en las bacterias como agentes patógenos (Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body, 2016).

La patogenicidad de una bacteria depende de varios factores, como su capacidad para adherirse a las células huésped, invadir tejidos, evadir el sistema inmunológico y producir toxinas dañinas, es importante destacar que no todas las bacterias son patógenas, de hecho, muchas bacterias son beneficiosas y esenciales para funciones corporales normales, como la digestión y la síntesis de vitaminas. Sin embargo, en el contexto de la salud y la medicina, es crucial comprender y combatir las bacterias patógenas para prevenir y tratar enfermedades infecciosas (Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body, 2016).

2.6.1. Bacterias

Las bacterias patógenas son bacterias que pueden causar enfermedades; la mayoría de las especies son inofensivas y comúnmente beneficiosas, pero un pequeño grupo puede causar enfermedades

infecciosas, aunque se cree que no hay más de cien especies patógenas en humanos, hay miles de especies que forman parte de la flora intestinal que se encuentra en el tracto digestivo. Nuestro cuerpo está expuesto a varias especies de bacterias como las saprofitas, estas crecen mayoritariamente en la materia en descomposición, suelo, comensales beneficiosos y partes del cuerpo que contengan los nutrientes necesarios para permitir su crecimiento. (rvskvv.net, 2020).

Las bacterias patógenas poseen mecanismos para adaptarse y eludir las defensas normales del cuerpo, permitiéndoles invadir partes del cuerpo, como la sangre, donde generalmente no se encuentran; algunos agentes patógenos se limitan a invadir solo el epitelio superficial, la piel o el cabello, porque el cuerpo humano cuenta con mecanismos de defensa que le permiten soportar la invasión microbiana de sus tejidos. En algunos casos raros los microbios patógenos pueden infectar a una persona completamente sana, porque generalmente los mecanismos de defensa se encuentran comprometidos ante la presencia de algún trauma local o una enfermedad debilitante subyacente, como heridas, intoxicación, escalofríos, fatiga y desnutrición (Bacteria harnessing complexity, 2004).

Las bacterias patógenas también son conocidas porque contribuyen a otras enfermedades de importancia mundial, como la neumonía, que puede ser causada por bacterias como *Streptococcus*, *Pneumococcus* y *Pseudomonas*, y otras enfermedades causada por alimentos como *Shigella*, *Campylobacter* y *Salmonella*, por lo que estas bacterias son la causa de las altas tasas de mortalidad infantil en los países en vías de desarrollo, la mayoría de las bacterias patógenas pueden cultivarse e identificarse mediante tinción de Gram y otros métodos. (¿Qué debemos saber sobre los animales silvestres vectores y reservorios de bacterias patógenas? Universidad Nac, 2015).

2.6.1.1. Estructura de las bacterias

Las bacterias son organismos unicelulares y procariotas, lo que significa que carecen de organelos membranosos y un núcleo definido, lo siguiente es una descripción general de las estructuras de las bacterias:

- Pared celular, las bacterias gram-positivas poseen una gruesa capa de peptidoglicano en la pared celular, mientras que las bacterias gram-negativas tienen una capa delgada de peptidoglicano y una membrana externa adicional.
- La membrana celular regula el paso de sustancias y rodea la célula.
- El citoplasma está formado por material genético (ADN), ribosomas y una variedad de inclusiones celulares.
- El núcleo del citoplasma es el lugar donde se encuentra el ADN circular de la bacteria.
- Los ribosomas son los lugares donde se produce la síntesis de proteínas.

- El flagelo es una estructura en forma de látigo que permite a algunas bacterias moverse.
- Las Fimbrias y Pili: pequeñas proyecciones que ayudan en la transferencia de material genético y la adherencia a superficies.
- La cápsula es la capa externa producida por algunas bacterias para protegerse y adherirse a superficies.
- Los plásmidos son segmentos extra cromosómicos de ADN que pueden contener otros genes.
- Algunas bacterias crean estructuras de resistencia llamadas endosporas en ambientes desfavorables (rvskvv.net, 2020).

La estructura bacteriana puede variar, y algunas bacterias pueden tener estructuras especiales para adaptarse a entornos particulares, la capacidad de las bacterias para adaptarse a una variedad de ambientes y participar en una variedad de procesos biológicos se debe a su diversidad en la estructura bacteriana (Bacteria harnessing complexity, 2004).

2.6.1.2. *Bacterias Gram positivas*

Las bacterias Gram-positivas son un grupo de bacterias que se distinguen por tener una capa gruesa de peptidoglicano en sus paredes celulares, en el cual se utiliza la coloración de Gram en laboratorio para distinguir grupos de bacterias según las características de sus paredes celulares. Las bacterias Gram positivas retienen este complejo cuando se tiñen con cristal violeta y yodo mostrando el color púrpura o azul oscuro al microscopio (Caceres, 2018).

Las características que distinguen a las bacterias Gram positivas incluyen la pared celular gruesa, la ausencia de la membrana externa, que es la característica de las bacterias Gram negativas, y la retención de cristal violeta, en comparación con las bacterias Gram negativas que son menos complejas, son sensibles a los antibióticos que afectan la pared celular y algunas bacterias Gram positivas pueden formar endosporas, estructuras de resistencia que les permiten sobrevivir en condiciones adversas. Las especies *de staphylococcus*, *streptococcus*, *bacillus* y *clostridium* son algunos ejemplos de bacterias Gram positivas, estas bacterias son útiles en muchos lugares, desde el cuerpo humano hasta el suelo y otros hábitats naturales (rvskvv.net, 2020).

2.6.1.3. *Bacterias gram negativas*

Las bacterias Gram negativas son un grupo de bacterias que se caracterizan por tener una estructura de pared celular más compleja en comparación con las bacterias Gram positivas, cuando se tiñen con cristal violeta y yodo, las bacterias Gram negativas aparecen de color rojo o rosa bajo el microscopio, algunos ejemplos de bacterias Gram negativas incluyen *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, y muchas otras. Estas bacterias desempeñan roles importantes en

la microbiología, la ecología y la salud humana, pero algunas también pueden ser patógenas y causar enfermedades (Bacteria harnessing complexity, 2004).

Las características distintivas de las bacterias Gram negativas incluyen: Tienen una capa de peptidoglicano más delgada en comparación con las bacterias Gram positivas, poseen una membrana externa adicional que contiene lipopolisacáridos (LPS) y proteínas porinas, la estructura de su pared celular es más compleja debido a la presencia de la membrana externa, son resistentes a algunos antibióticos que afectan a las bacterias Gram positivas debido a la presencia de la membrana externa, en la coloración de Gram, retienen el color rojo o rosa después de ser tratadas con alcohol yodado, muchas bacterias Gram negativas son metabólicamente versátiles y pueden prosperar en diversos entornos (rvskvv.net, 2020).

2.7. Bacterias de estudio

2.7.1. *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*

Enterococcus faecalis, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* son bacterias patógenas que pueden causar infecciones graves en humanos, estas bacterias son conocidas por su capacidad de desarrollar resistencia a múltiples antibióticos, lo que representa un desafío en el tratamiento de las infecciones asociadas a ellas indicando que la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana contra estas bacterias es de gran importancia clínica (Evans, 2018).

2.7.2. *Enterococcus faecalis*

2.7.2.1. Generalidades

Enterococcus spp. son bacterias anaeróbicas facultativas y gram positivas ubicuas comensales del tracto intestinal de los seres humanos, así como de otros mamíferos, estos microorganismos se caracterizan en gran medida por su capacidad para tolerar altas concentraciones de sal (6,5% NaCl), pero también un amplio rango de valores de temperatura (de 10 °C a 40 °C) y pH (de 4,4 a 9,6), también son capaces de hidrolizar la esculina en presencia de grandes cantidades de sales biliares (40%) (Hollenbeck, y otros, 2012).

Inicialmente, retratados como organismos de poca importancia clínica, los *enterococcus*, particularmente el *Enterococcus faecalis*, se han asociado progresivamente con un número creciente de infecciones hospitalarias (HAI) tanto en medicina humana como veterinaria, los *Enterococcus* se asocian con una amplia gama de infecciones que incluyen infecciones del tracto

urinario, bacteriemia, endocarditis, infecciones de heridas (quemaduras o incisiones quirúrgicas), infecciones del abdomen y del tracto biliar e infecciones de catéteres e implantes médicos (Antimicrobial Resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin, 2018).

2.7.2.2. Efectos sobre la salud

Las variedades de *Enterococcus* son un riesgo importante para la salud, ya que se han convertido en un patógeno nosocomial importante y cada vez más importante, pueden causar enfermedades muy graves como la endocarditis y la bacteriemia, además, pueden causar infecciones en piel, tejidos blandos, tejidos neonatales y pediátricos, septicemia, abscesos intraabdominales y pélvicos y heridas quirúrgicas, la mayoría de las infecciones provienen de la microbiota endógena, pero también pueden propagarse de persona a persona o a través del consumo de agua o alimentos contaminados (Fariñas, y otros, 2007).

Estos microorganismos suelen causar infecciones urinarias, su interacción con el tejido uroepitelial es compleja porque incluye adhesinas de superficie polisacáridas y proteicas, la frecuencia de estas infecciones aumenta significativamente, llegando a ser responsables del 16% de ellas, y aunque no es común, son la causa más frecuente de bacteriemia (Díaz, y otros, 2010). Los pacientes que han estado hospitalizados durante un período prolongado suelen experimentar bacteriemia causada por *Enterococcus faecalis*. Las bacteriemias se asocian con enfermedades malignas, cateterización uretral, dispositivos intravasculares, cirugías recientes, quemaduras y terapia antimicrobiana previa, además, la hiperalimentación, la colonización previa del tracto gastrointestinal con *Enterococcus* resistentes a la vancomicina (EVR), una o dos bacteriemias nosocomiales causadas por *Enterococcus faecalis* ocurren cada año por cada mil pacientes hospitalizados (Fariñas, y otros, 2007).

Los pacientes que reciben hemodiálisis, agentes antineoplásicos o nutrición parenteral son particularmente vulnerables a la bacteriemia causada por EVR. La severidad de la enfermedad, el método de administración de antibacterianas, la neutropenia y la mucositis son otros factores de riesgo (Sood, y otros, 2008). Los factores de riesgo más significativos para la adquisición de una infección intrahospitalaria por *Enterococcus faecalis* incluyen una variedad de enfermedades, una estadía prolongada en el hospital, la presencia de sonda vesical, catéteres vasculares y el uso de antibióticos de amplio espectro, como vancomicina, cefalosporinas de tercera generación, aminoglucósidos y Aztreonam, las endocarditis infecciosas son una de las infecciones causadas por *Enterococcus faecalis* más difíciles de tratar, también estos microorganismos se encuentran entre los factores más dañinos que provocan complicaciones después de la cirugía de cataratas (Díaz, y otros, 2010).

Estos microorganismos también causan otitis media de forma inusual y son una causa importante de septicemias en recién nacidos, el mayor número de casos se reporta en las unidades de cuidados intensivos neonatales, pediátricas y de cirugía a nivel mundial, ya que estas áreas son altamente susceptibles a la infección por estos microorganismos (Quiñones, y otros, 2008).

2.7.2.3. *Importancia clínica*

Esta capacidad de inducir infecciones se vuelve especialmente crítica cuando se considera su grado de resistencia a los antibióticos, los rasgos de resistencia intrínsecos y extrínsecos asociados con este género le permiten ser resistente a varios antibióticos, incluidos β -lactámicos, aminoglucósidos y glicopéptidos, lo que dificulta combatir estas infecciones, de hecho, la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que *Enterococcus faecalis* resistente a la vancomicina es un patógeno de alta prioridad para el que se necesitan nuevas terapias antimicrobianas (Hikmate, y otros, 2008).

Esta resistencia demasiado conocida a los antibióticos no es el único rasgo que convierte al *Enterococcus faecalis* en una amenaza para la salud humana y animal, también presentan una gran capacidad de persistir en el medio ambiente, lo que podría estar asociado con algunos informes de menor susceptibilidad a ciertos biocidas, especialmente en presencia de materia orgánica. Asimismo, tienen una formidable capacidad de formación de biopelículas, y son conocidos por la plasticidad de su genoma, lo que les permite adquirir, conservar y difundir fácilmente rasgos genéticos no solo entre los enterococos, sino también entre otras bacterias grampositivas (Quiñones, y otros, 2008).

2.7.3. *Klebsiella pneumoniae*

2.7.3.1. *Generalidades*

Klebsiella pneumoniae es una bacteria Gram negativa que puede causar infecciones respiratorias, del tracto urinario y del torrente sanguíneo, esta bacteria ha emergido como un patógeno problemático debido a su capacidad para producir enzimas de beta-lactamasa y desarrollar resistencia a múltiples antibióticos, incluyendo carbapenémicos, la resistencia de *Klebsiella pneumoniae* a los antibióticos se asocia con la presencia de plásmidos de resistencia y la producción de carbapenemasas (Evans, 2018). Las infecciones causadas por entero bacterias que producen carbapenemasas, particularmente *Klebsiella pneumoniae*, son un problema de salud pública global, los primeros brotes de infecciones por *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas (KPC) se encontraron en los Estados Unidos, pero ahora se han extendido por

todo el mundo, alcanzando características endémicas y se han encontrado este tipo de enterobacterias en 25 países en los cinco continentes (Swaminathan, y otros, 2013).

2.7.3.2. *Efectos sobre la salud*

K. pneumoniae normalmente es inofensiva., estas bacterias viven en los intestinos y las heces, pero pueden ser peligrosas cuando ingresan a otras partes del cuerpo.

Esta bacteria es la principal causante de infecciones graves en los pulmones, cerebro, vejiga, hígado, ojos, sangre y heridas, la infección se transmite por contacto de persona a persona, el riesgo es mayor si la persona tiene una condición preexistente, generalmente, no se contrae la infección por *Klebsiella* si se está sano, pero si se contrae *K. pneumoniae*, se necesita de antibióticos, lastimosamente existe algunas cepas que son resistentes a algunos medicamentos, por lo que la recuperación puede tardar varios meses, pero con un tratamiento temprano se mejora las perspectivas de las personas con una infección por *K. pneumoniae* (Trubiano, 2015).

K. pneumoniae puede causar infecciones como: neumonía, infección del tracto urinario (TU), infección intra abdominal, meningitis, absceso hepático piógeno, infección del torrente sanguíneo

- Neumonía: *K. pneumoniae* a menudo causa neumonía por bacterias o infección en los pulmones, ocurre cuando las bacterias ingresan al tracto respiratorio, la neumonía adquirida en una comunidad ocurre si se contrae en un entorno comunitario, como el metro o un centro comercial, la neumonía adquirida en un entorno de salud ocurre si se la contrae en un hospital o en un asilo de ancianos. En los países occidentales, *K. pneumoniae* causa aproximadamente 3 a 5 % de neumonía adquirida en la comunidad, también es responsable del 1,8% de neumonía adquirida en hospitales en todo el mundo.
- Infecciones del tracto urinario (TU): Si *K. pneumoniae* ingresa al tracto urinario, puede causar una infección urinaria, el tracto urinario incluye la uretra (el tubo que permite que la orina salga del cuerpo), la vejiga, uréteres (el tubo que transporta la orina desde los riñones a la vejiga), estas infecciones urinarias ocurren cuando la bacteria ingresa al tracto urinario.
- Infección de la piel o tejidos blandos: Si *K. pneumoniae* puede infectar la piel o los tejidos blandos si ingresa a través de una herida ocasionada en la piel, por lo general, esto sucede con heridas causadas por cirugía o lesión. Las infecciones de heridas por *K. pneumoniae* incluyen: celulitis, fascitis necrotizante, miositis.
- Meningitis: *K. pneumoniae* puede causar meningitis bacteriana o inflamación de las membranas que cubren el cerebro y la médula espinal en muy raros casos, generalmente cuando las bacterias infectan el líquido que rodea el cerebro y la médula espinal, la mayoría de los casos reportados de meningitis por neumonía ocurrió en entornos hospitalarios,

causando la aparición de síntomas repentinos de: dolor de cabeza, rigidez de nuca y fiebre alta.

- Endoftalmitis: Si la bacteria *K. pneumoniae* se encuentra en la sangre, puede propagarse a los ojos causando endoftalmitis, que es la infección que causa inflamación en la parte blanca del ojo y puede provocar la ceguera.
- Infecciones de la sangre: La bacteriemia o presencia de bacterias en la sangre puede ser causada por la *K. pneumoniae*, que infecta directamente al torrente sanguíneo a partir de otra infección en otra parte del cuerpo. (Trubiano, 2015).

2.7.3.3. *Importancia clínica*

En un hospital de Nueva York, un estudio demostró que tener *K. pneumoniae* resistente a carbapenems es un factor independiente de mortalidad: los pacientes infectados con este germen tienen tres veces más probabilidades de morir durante la hospitalización que si se infectan con cepas susceptibles del mismo microorganismo, en Israel, un estudio realizado entre 2003 y 2006 con adultos hospitalizados demostró que la estancia prolongada, la edad por encima de 60 años, las enfermedades pulmonares crónicas y neurológicas, los procedimientos invasivos no quirúrgicos y, principalmente, el mal estado funcional, la estancia en la UCI y el consumo previo de antibióticos, especialmente quinolonas y aminoglicósidos, son factores que predicen la adquisición de *K. pneumoniae* resistente (Bratu, y otros, 2015).

Varios estudios han demostrado que el inicio de una terapia antibiótica empírica inadecuada para la bacteriemia se asocia con mal pronóstico, se conocen informes de terapia inadecuada en el 53% de los pacientes con infecciones causadas por bacterias resistentes, un estudio prospectivo de cohorte hecho en un hospital de Missouri, EE. UU., durante 6 meses entre 2006 y 2007, se incluyeron pacientes no hospitalizados en UCI pero con bacteriemia por bacilos gramnegativos; se encontró que los antibióticos prescritos con mayor frecuencia, durante las primeras 24 horas, con actividad contra dichos bacilos, fueron cefepime (43,6%), ciprofloxacina (22,8%), piperacilina/tazobactam (15,6%), gentamicina (11,2%), ceftriaxona (8,8%), meropenem (3,6%) y ampicilina/sulbactam (2%) el 31,6% de los pacientes recibieron terapia antibiótica empírica inadecuada (Marschall, y otros, 2018).

2.7.4. *Pseudomonas aeruginosa*

2.7.4.1. *Generalidades*

Pseudomonas aeruginosa pertenece a la familia *Pseudomonaceae*, se trata de un bacilo gram

negativo recto o ligeramente curvado con un tamaño aproximado de $3 \times 0,5^{-1}$ micras y se mueve gracias al flagelo polar, su metabolismo es aerobio (aunque puede desarrollarse en condiciones anaerobias mediante el uso de nitrato), con una catalasa positiva y un oxidasa positiva, se caracteriza por producir una variedad de pigmentos, incluida la pirrubina (de color rojo), la piocianina (de color azul verdoso) y la pioverdina (de color verde amarillento fluorescente) (Paz, y otros, 2019).

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria ambiental gramnegativa y ubicua, este es un patógeno oportunista para los humanos capaz de causar una amplia gama de infecciones agudas y crónicas potencialmente mortales, particularmente en pacientes con defensas inmunes comprometidas. Ha sido de particular importancia ya que es la principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis quística (FQ) y uno de los principales patógenos nosocomiales que afectan a los pacientes hospitalizados, siendo intrínsecamente resistente a una amplia gama de antibióticos. (Evans, 2018).

2.7.4.2. Efectos sobre la salud

P. aeruginosa es un patógeno oportunista que rara vez causa enfermedad en personas sanas; en el caso de producirse, suele manifestarse de la siguiente manera:

- **Infecciones dérmicas:** Pueden provocar foliculitis, conocida como foliculitis de la bañera, que se caracteriza por la presencia de pápulas pruriginosas en las partes laterales del tronco y/o en las áreas axilar, inguinal y púbica, entre otras áreas, esta condición puede estar relacionada con el contacto prolongado con agua contaminada, también puede causar el síndrome de las uñas verdes, también conocido como cloroniquia, que es una parálisis en la que la lámina ungueal se vuelve verdosa y es causada por la exposición frecuente de las uñas dañadas en ambientes húmedos contaminados (Paz, y otros, 2019).
- **Neumonía:** La inhalación de bioaerosoles de agua o fluidos contaminados, como taladrinas o fluidos de corte, puede causar neumonía, en personas sanas, la infección es extremadamente rara y el pronóstico es muy grave (Ruiz, 2018).
- **Otitis externa (otitis del nadador):** También conocida como otitis del nadador, es una infección que se produce en el canal auditivo externo debido a la exposición prolongada al agua contaminada (Ruiz M., 2017).
- **Infección ocular:** Es principalmente causada por la contaminación del líquido utilizado para limpiar las lentes de contacto, lo que puede provocar una queratitis que puede provocar perforaciones y derretimiento corneal, infecciones de cicatrices o incluso la pérdida de visión en el ojo infectado (Ruiz, 2018).

P. aeruginosa es responsable de una gran cantidad de infecciones nosocomiales, principalmente en personas inmuno deprimidas, quemaduras graves, heridas quirúrgicas, neutropenia o infecciones pulmonares subyacentes, también puede causar enfermedades como neumonía y meningitis, sobreinfección de heridas, ectima gangrenosa, infecciones urinarias, infecciones osteoarticulares, endocarditis, infecciones oculares o septicemia (Paz, y otros, 2019).

La Tabla 2-5 proporciona información relevante sobre este agente patógeno, incluyendo su reservorio, hospedadores, dosis infectiva mínima, supervivencia ambiental, formas de resistencia, mecanismo de propagación y transmisión, vías de entrada como también su distribución geográfica. Este agente patógeno tiene una presencia global que puede encontrarse en diversos entornos, incluyendo agua, suelos húmedos, materiales húmedos y más. Su transmisión se produce principalmente a través del contacto con piel lesionada o mucosas, la misma puede ser un riesgo en entornos médicos. La información contenida en esta tabla es esencial para comprender la epidemiología como también las características de este agente patógeno.

Tabla 2-5: Viabilidad, propagación y transmisión

Reservorio	El suelo húmedo, el agua, los desechos, la vegetación, los humanos y los animales.
Hospedadores	Animales y humanos.
Dosis Infectiva Mínima (DIM)	La Dosis Infectiva Mínima (DIM) es actualmente desconocida.
Supervivencia ambiental	Se encuentra en gran cantidad en la naturaleza, en el agua (ríos, lagos, depósitos, duchas, bañeras, piscinas e hidromasaje, etc.), en los suelos húmedos, en las plantas y materiales húmedos (alimentos, fómites); también puede formar parte de la flora microbiana saprófita típica de las áreas húmedas de la piel. Su temperatura de crecimiento ideal es de 37°C, pero puede tolerar hasta 45°C – 50°C. En agua destilada, puede sobrevivir durante al menos setenta días.
Formas de resistencia	No presenta formas de resistencia.
Mecanismo de propagación y transmisión	La transmisión se produce principalmente a través del contacto del agua o de los objetos contaminados con la piel lesionada o reblandecida y las mucosas. En la industria médica, los instrumentos quirúrgicos, los respiradores, los catéteres y las manos de los trabajadores sanitarios pueden ser una fuente de infección para los pacientes. La inhalación de bioaerosoles o gotitas de agua o fluidos contaminados, así como la ingesta de agua contaminada, son otros mecanismos de transmisión. Sin embargo, este último no es una vía importante de transmisión.
Vías de entrada	Percutánea Mucosas Respiratoria Digestiva.

Distribución geográfica	Mundial.
-------------------------	----------

Fuente: (Ruiz M., 2017)

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

2.7.4.3. Importancia clínica

P. aeruginosa también se asocia en gran medida con infecciones adquiridas en hospitales, incluida la neumonía asociada a la ventilación, la infección del torrente sanguíneo asociada a la vía central, la infección relacionada con el catéter urinario y las infecciones quirúrgicas o de trasplantes (Pseudomonas aeruginosa: Pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics., 2022).

El Consorcio Internacional para el Control de Infecciones Nosocomiales informó que las infecciones nosocomiales por *P. aeruginosa* se han convertido en un problema de atención sanitaria mundial. Un estudio de cohorte informó que *P. aeruginosa* tenía la mayor carga de infecciones adquiridas en la atención sanitaria que en las unidades de cuidados intensivos europeas. *P. aeruginosa* prevalece en entornos de atención médica porque es un compañero común de los pacientes bajo atención médica y también puede sobrevivir en superficies abióticas y bióticas, como equipos médicos, resistiendo los métodos de desinfección y siendo transmisible de paciente a paciente (Russotto, y otros, 2015).

Las infecciones por *P. aeruginosa* son cada vez más difíciles de tratar porque esta bacteria es naturalmente resistente a muchos antibióticos y el número de cepas multi resistentes y pan resistentes está aumentando en todo el mundo, se han informado cepas que son resistentes a casi todas las clases de antibióticos de uso común, incluidos aminoglucósidos, cefalosporinas, fluoroquinolonas y carbapenémicos (Trubiano, 2015). Debido a la existencia de un arsenal de mecanismos moleculares que confieren resistencia a múltiples clases de antibióticos, las opciones terapéuticas para el tratamiento de las infecciones son cada vez más limitadas, mientras que el número de incidencias de infecciones y de cepas de resistencia a múltiples fármacos está aumentando (Russotto, y otros, 2015).

2.8. Determinación de la actividad antimicrobiana in vitro

La actividad antimicrobiana in vitro

2.8.1. Concepto de actividad antimicrobiana in vitro

La actividad antimicrobiana in vitro se refiere a la capacidad de un compuesto o sustancia para

inhibir o matar microorganismos en condiciones de laboratorio, las pruebas de actividad antimicrobiana in vitro son utilizadas para evaluar el potencial de agentes antimicrobianos en el tratamiento de infecciones (Canut, A., et al., 2020).

2.8.2. Métodos de determinación de la susceptibilidad antimicrobiana in vitro

Los métodos utilizados para evaluar la actividad antimicrobiana in vitro incluyen pruebas de susceptibilidad, como la difusión en agar (método de Kirby-Bauer) y la dilución en caldo (método de micro dilución), estas pruebas permiten medir la inhibición o muerte de los microorganismos expuestos al agente antimicrobiano como también determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) (Canut, A., et al., 2020).

2.8.3. Interpretación de los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana in vitro:

Los resultados de las pruebas de actividad antimicrobiana in vitro se interpretan en función de los valores de CMI y CMB obtenidos, la CMI es la concentración mas baja con la que un agente antimicrobiano inhibe el crecimiento visible de un microorganismo, mientras que la CMB es la concentración más baja que mata al microorganismo, los valores de CMI y CMB permiten determinar la eficacia del agente antimicrobiano y su potencial para el tratamiento de infecciones (Canut, A., et al., 2020).

2.8.4. Importancia de la actividad antimicrobiana in vitro

La actividad antimicrobiana in vitro juega un papel fundamental en la investigación y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos, se refiere a la evaluación de la capacidad de una sustancia para inhibir o matar microorganismos en un entorno de laboratorio controlado, fuera del organismo vivo, esta evaluación es crucial para determinar el potencial de una sustancia como agente terapéutico o como herramienta para el control de infecciones (Canut, A., et al., 2020). La importancia de la actividad antimicrobiana in vitro según Canut, A., et al radica en los siguientes aspectos:

- **Descubrimiento de nuevos agentes antimicrobianos:** La realización de pruebas de actividad antimicrobiana in vitro permite identificar compuestos naturales o sintéticos con capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos, esto puede conducir al descubrimiento de nuevos antibióticos, antifúngicos u otros agentes antimicrobianos que sean efectivos contra cepas resistentes a los tratamientos convencionales.
- **Evaluación de la eficacia de tratamientos existentes:** Las pruebas de actividad

antimicrobiana in vitro también se utilizan para evaluar la eficacia de los tratamientos antimicrobianos existentes. Esto ayuda a determinar si un fármaco conserva su actividad frente a cepas resistentes o si existen nuevas variantes de microorganismos que podrían ser más difíciles de tratar.

- **Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y mínima bactericida (CMB):** mediante la utilización de las pruebas in vitro se puede determinar el CMI, que es la concentración más baja con la que un agente antimicrobiano inhibe el crecimiento del microorganismo y CMB que es la concentración más baja que resulta en la muerte de un microorganismo. Estos valores son fundamentales para establecer las dosis adecuadas de un agente antimicrobiano en tratamientos clínicos.

Las pruebas in vitro proporcionan información sobre los mecanismos de acción de los agentes antimicrobianos, esto ayuda a comprender cómo actúan las sustancias frente a los microorganismos, ya sea mediante la inhibición de la síntesis de proteínas, la interferencia en la replicación del ADN o la alteración de la membrana celular, entre otros mecanismos (Canut, A., et al., 2020).

2.9. Métodos de Dilución

Los métodos de dilución se utilizan para determinar la concentración inhibidora mínima de un antimicrobiano para inhibir o matar bacterias/hongos y es la referencia para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos (Montalvão, y otros, 2014).

Para los métodos de dilución en caldo inicialmente, se preparan diluciones en serie del agente antimicrobiano y, una vez listo, se inoculan en tubos con un número conocido de bacterias/hongos analizados, se elabora por separado un conjunto de cepas de control con susceptibilidad conocida, los tubos se incuban a una temperatura específica, dependiendo de la temperatura óptima de crecimiento de bacterias u hongos, y durante un período de tiempo, los puntos finales se toman como MIC (concentración inhibidora mínima, es decir, cantidad de agente antimicrobiano necesaria para inhibir el crecimiento) o MBC (concentración bactericida mínima, es decir, cantidad de agente antimicrobiano necesaria para matar las bacterias) (Eucast, y otros, 2020).

Otro método de dilución es la micro dilución en caldo, que se realiza en placas de micro dilución de 96 pocillos (capacidad: 200 μ l), generalmente, existe un control positivo (PC; es decir, antibiótico), un MAX (crecimiento máximo de bacterias/hongos) y un MIN (crecimiento mínimo de bacterias/hongos con presencia de antibiótico) como controles (Montalvão, y otros, 2014). De igual forma, el ensayo de dilución en agar se realiza en cajas de Petri, teniendo la posibilidad de probar

varios organismos en cada placa y los resultados sólo se aceptan si la placa de control muestra un buen crecimiento, la ausencia de crecimiento del organismo de prueba indica que existe susceptibilidad a la concentración antimicrobiana incorporada en el medio (Eucast, y otros, 2020).

2.10. ANOVA

ANOVA significa Análisis de Varianza. Este análisis es una técnica estadística que se utiliza para comprobar si las medias (o promedios) de dos o más grupos son significativamente diferentes entre sí. ANOVA verifica el impacto de uno o más factores comparando las medias de diferentes muestras. Podemos usar ANOVA para probar/desmentir si todos los tratamientos con medicamentos fueron igualmente efectivos (Análisis de Varianza, 2014).

2.10.1. Cuando se utiliza la prueba estadística ANOVA

El análisis de varianza ANOVA se la utiliza cuando se obtuvo más de tres grupos de interés y se quiere comparar si las medias o promedios son estadísticamente diferentes entre sí. Este método se utiliza generalmente cuando se utiliza varios escenarios de investigación, a continuación, se muestra varios ejemplos:

- Comparación de grupos: Este ANOVA permite comparar el desempeño de más de dos grupos por ejemplo se desea probar la efectividad que tuvo sobre los estudiantes diferentes métodos de enseñanza utilizados.
- Evaluación de interacciones: en un ANOVA factorial o de dos vías, puede probar un efecto de interacción. Esto significa que no sólo le interesa el efecto de cada factor individual, sino también si el efecto de un factor depende del nivel de otro factor.
- Medidas repetidas: si ha medido los mismos sujetos en diferentes condiciones o en diferentes momentos, puede utilizar ANOVA de medidas repetidas para comparar las medias de estas medidas repetidas teniendo en cuenta la correlación entre medidas del mismo sujeto.
- Diseños experimentales: ANOVA se utiliza a menudo en diseños de investigación experimental cuando los sujetos se asignan aleatoriamente a diferentes condiciones y el objetivo es comparar las medias de las condiciones (Análisis de Varianza, 2014)..

2.10.2. Supuestos que se deben cumplir para utilizar ANOVA

- Normalidad: los datos deben tener una distribución aproximadamente normal.
- Homogeneidad de las variaciones: las variaciones de los grupos que está comparando deben

ser aproximadamente iguales. Esta suposición se puede comprobar mediante la prueba de Levene o la prueba de Bartlett.

- Independencia: Las observaciones deben ser independientes entre sí. Esta suposición se cumple si los datos se recopilan de manera adecuada sin grupos relacionados (p. ej., gemelos, parejas emparejadas, medidas repetidas) (Análisis de Varianza, 2014)..

2.10.3. Terminologías relacionadas con ANOVA

Estas algunas terminologías comunes utilizadas en el ANOVA.

2.10.3.1. Gran media

La media es un promedio simple o aritmético de un rango de valores. Hay dos tipos de medias que se utiliza en los cálculos de ANOVA, que son medias de muestras separadas y la media general. La gran media es la media de las medias muestrales o la media de todas las observaciones combinadas, independientemente de la muestra (Valderrama, 2021).

2.10.3.2. Hipótesis

Al igual que cualquier otro tipo de hipótesis que se haya estudiado en estadística, ANOVA también utiliza una hipótesis nula y una hipótesis alternativa. La hipótesis nula en ANOVA es válida cuando todas las medias muestrales son iguales o no tienen ninguna diferencia significativa. Por tanto, pueden considerarse parte de un conjunto más amplio de población. Por otro lado, la hipótesis alternativa es válida cuando al menos una de las medias muestrales es diferente del resto de las medias muestrales. En forma matemática, se pueden representar como:

Hipótesis nula e hipótesis alternativa en ANOVA

En otras palabras, la hipótesis nula siempre establece que no hubo ningún efecto significativo en los resultados o todas las medias muestrales, al contrario, la hipótesis alternativa o experimental establece que al menos una de las medias muestrales es diferente de otra. Pero todavía no podemos decir cuál fue específicamente. Para eso, se usa otros métodos que se discutirá más adelante (Valderrama, 2021).

2.10.3.3. Distribución de variabilidad

Esta variabilidad entre las distribuciones se denomina variabilidad entre grupos. Se refiere a

variaciones entre las distribuciones de grupos (o niveles) individuales a medida que los valores dentro de cada grupo difieren. Examina cada muestra y calcula la diferencia entre su media y su media general para calcular la variabilidad. Si las distribuciones se superponen o son cercanas, la media general es similar a las medias individuales, mientras que, si las distribuciones están muy separadas, la diferencia entre las medias y la media general sería grande (Valderrama, 2021).

2.10.3.4. Cociente F

El estadístico cociente F , que se puede expresar como la relación entre la variabilidad del grupo y la variabilidad dentro del grupo.

$$F = \frac{\text{Variabilidad entre grupos}}{\text{Variabilidad dentro del grupo}}$$

Esta fórmula anterior es bastante intuitiva. El término numerador en el cálculo del estadístico F define la variabilidad entre grupos. Es decir, la muestra pretende separarse más a medida que aumenta la variabilidad entre grupos. En otras palabras, es más probable que las muestras pertenezcan a poblaciones diferentes.

En valor cociente F siguiendo la creencia de que H_0 es verdadera debería ser aproximadamente igual a uno. Por lo tanto, cuanto mayor sea el estadístico F , mayor será la evidencia de que existe una diferencia entre las medias del grupo (Valderrama, 2021)..

2.10.3.5. Valor P en ANOVA

Otra medida para ANOVA es el valor p . El valor p calculado en el análisis ANOVA debe ser menor que el nivel alfa seleccionado (que generalmente es $\alpha=0,05$). Si este valor p es menor que $\alpha = .05$, rechazamos la hipótesis nula del ANOVA y concluimos que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tres grupos, caso lo contrario, si el valor p no es menor que $\alpha = 0,05$ entonces no rechazamos la hipótesis nula y concluimos que no tenemos evidencia suficiente para decir que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tres grupos (Valderrama, 2021)..

2.10.3.6. Grados de libertad

Los grados de libertad son el número máximo de valores lógicamente independientes, que pueden variar en una muestra de datos, en otras palabras, los grados de libertad son el número de datos

independientes que se usaron en el experimento para calcular la estimación, eso no quiere decir que es igual al número de elementos de la muestra utilizada. Para obtener el GI de la estimación, se debe restar 1 del número de elementos, por ejemplo, en un estudio se está buscando la pérdida de peso media con una dieta baja en carbohidratos se podría usar 6 personas, dando 5 grados de libertad ($6 - 1 = 5$), o puede ser cien mil personas con $GL = 99.000$ (Valderrama, 2021)..

2.10.4. Tipos de ANOVA

- **ANOVA unidireccional:** es un tipo de prueba estadística que compara la varianza en las medias del grupo dentro de una muestra considerando solo una variable o factor independiente. Es una prueba basada en hipótesis, lo que significa que tiene como objetivo evaluar múltiples teorías mutuamente excluyentes sobre los datos.

En un ANOVA unidireccional las variables independientes están organizadas en grupos categóricos. Por ejemplo, si los investigadores observaran el peso de las morsas en diciembre, enero, febrero y marzo, habría cuatro meses analizados y, por lo tanto, cuatro grupos para el análisis.

En un ANOVA unidireccional hay dos hipótesis posibles:

La hipótesis nula (H_0) es que no existe diferencia entre los grupos e igualdad entre medias (por ejemplo: las morsas pesan lo mismo en distintos meses).

La hipótesis alternativa (H_1) es que existe una diferencia entre las medias y los grupos (las morsas tienen diferentes pesos en diferentes meses) (Valderrama, 2021)..

- **ANOVA de dos vías:** Un ANOVA de dos factores es, al igual que un ANOVA de un factor, una prueba basada en hipótesis. Sin embargo, en el ANOVA de dos factores cada muestra se define de dos maneras y, como resultado, se divide en dos grupos categóricos. Siguiendo el ejemplo de las morsas, los investigadores podrían usar un ANOVA de dos factores si su pregunta es: "¿Son las morsas más pesadas al comienzo o al final de la temporada de apareamiento y eso depende del sexo de la morsa?" En este ejemplo, tanto el "mes de la temporada de apareamiento" como el "sexo de la morsa" son factores, es decir, en total, hay dos factores. Una vez más, se debe considerar el número de grupos de cada factor: para "sexo" sólo habrá dos grupos "masculino" y "femenino".

Por lo tanto, el ANOVA de dos factores examina el efecto de dos factores (mes y sexo) sobre una variable dependiente (en este caso, el peso) y también examina si los dos factores se afectan entre sí para influir en la variable continua (Valderrama, 2021)..

2.10.5. *Métodos para encontrar dos poblaciones diferentes*

Existen varias pruebas post hoc potenciales que podemos utilizar después de un ANOVA, pero las más populares incluyen:

Prueba de Tukey

Prueba de Bonferroni

Prueba de Scheffe

2.10.5.1. *El método Tukey*

La prueba post-hoc de Tukey se la utiliza cuando se va hacer comparaciones por pares entre medias de grupos, el término "por pares" significa que solo queremos comparar dos medias de grupos a la vez, además los tamaños de la muestra deben ser iguales para cada grupo, si se tiene tamaños de muestra diferentes se puede utilizar la versión modificada conocida como prueba de Tukey-Kramer.

Por ejemplo, supongamos que tenemos tres grupos: A1, A2, A3. Se quiere utilizar la prueba post-hoc de Tukey que permitirá realizar las siguientes comparaciones por pares:

$$\mu_{A1} = \mu_{A2}$$

$$\mu_{A2} = \mu_{A3}$$

$$\mu_{A1} = \mu_{A3}$$

Para k grupos, hay un total de $k(k-1)/2$ posibles comparaciones por pares (Valderrama, 2021)..

2.10.5.2. *El método Scheffe*

La prueba post-hoc de Scheffe se la utiliza cuando se desea hacer todas las combinaciones posibles entre medias de grupos, es decir esta prueba permite comparar mas de dos medidas a la vez a diferencia de la prueba de Tukey.

Tomemos el ejemplo anterior, solo que se aumentó un grupo: A1, A2, A3, A4, esta prueba post-hoc permitirá realizar comparaciones complejas como:

$$\mu_{A1} + \mu_{A2} = \mu_{A3} + \mu_{A4}$$

$$\mu_{A1} - \mu_{A2} = \mu_{A3} - \mu_{A4}$$

además de realizar comparaciones complejas, la prueba de Scheffe es más flexible y produce

intervalos de confianza más amplios, siendo esta una debilidad ya que tiene una baja capacidad para detectar diferencias reales entre grupos. Cabe mencionar que esta prueba no requiere que los tamaños muestrales de los grupos sean iguales. (Valderrama, 2021)..

2.10.5.3. El método Bonferroni

La prueba post-hoc de Bonferroni se la utiliza cuando ya se tiene de antemano un conjunto de comparaciones planificadas, es decir que solo nos interesa realizar algunas comparaciones entre grupos y no todas las que se pueda generar como en el caso de la prueba de Tukey.

Por ejemplo, si se tiene tres grupos (A1, A2, A3) y se quiere solo comparar:

$$\mu_{A1} = \mu_{A2}$$

$$\mu_{A2} = \mu_{A3}$$

Es decir que en nuestra investigación no se requiere comparar todas las posibles combinaciones generadas por los grupos, sino que se sabe con anticipación cuales son las comparaciones que nos sirve, la prueba post-hoc de Bonferroni es la ideal, además produce intervalos de confianza más estrechos, lo que representa que tiene una mayor capacidad para detectar diferencias reales entre los grupos de interés. Al igual que la prueba Scheffe, Bonferroni también acepta diferentes tamaños muestrales. (Valderrama, 2021).

CAPÍTULO 3

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Enfoque de la investigación

El enfoque de la investigación fue cuantitativo porque se recolectaron y analizaron datos numéricos para obtener resultados y conclusiones. Se realizó pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y se midió las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y mínimas bactericidas (CMB) del extracto de *Equisetum giganteum L.* Posteriormente los datos se procesaron estadísticamente para determinar la efectividad del extracto como agente antimicrobiano.

3.2. Modalidad de la investigación

Esta investigación fue clasificada como aplicada ya que se utilizó el conocimiento teórico adquirido en las aulas y en la revisión bibliográfica para abordar el problema específico de esta investigación que fue la susceptibilidad antimicrobiana del extracto de *Equisetum giganteum L.* frente al crecimiento de las cepas ATCC mencionadas.

3.3. Diseño de la investigación

3.3.1. Según la manipulación o no de la variable independiente

Esta investigación se consideró experimental debido a que involucró la manipulación de la variable independiente para evaluar su posible efecto antibiótico sobre el crecimiento de microorganismos específicos, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae*. En este diseño experimental, se tuvo el control sobre la variable independiente, que en este caso corresponde al extracto de *Equisetum giganteum L.* (Cola de Caballo), y se pueden realizar experimentos para determinar su impacto en las cepas mencionadas.

En este estudio, se determinó si el extracto de *Equisetum giganteum L.* tuvo un efecto antimicrobiano sobre estas cepas bacterianas, para hacerlo, se aplicaron diferentes concentraciones del extracto (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), lo que constituyó la manipulación de la variable independiente, se observó cómo estas concentraciones afectan el crecimiento de las bacterias, luego, se analizó los resultados para determinar si existen diferencias significativas en el crecimiento bacteriano y establecer si el extracto de *Equisetum giganteum L.* tiene propiedades antimicrobianas y, de ser así, en qué concentraciones es más efectivo.

3.3.2. Según la perspectiva temporal

La parte práctica fue la manipulación la concentración del extracto de *Equisetum giganteum L.* sobre las diferentes cepas bacterianas y se observó su efecto en el crecimiento de las bacterias *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae*, esta manipulación y observación controlada se lleva a cabo en un entorno de laboratorio, lo que implica la realización de experimentos y la medición de resultados en un determinado tiempo, lo que se alinea con la investigación de tipo transversal.

3.4. Tipo de estudio

Este estudio buscó determinar el efecto antimicrobiano in vitro que tuvo el extracto de *Equisetum giganteum L.* sobre el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae* utilizando cepas ATCC, es principalmente un estudio de laboratorio, lo que lo clasifica como un estudio de campo. En este contexto, se llevan a cabo experimentos en un entorno controlado de laboratorio donde se manipulan variables y recopilan datos.

3.5. Método de investigación

El método utilizado en este estudio fue el método analítico sintético, este método consiste en la investigación de los componentes o partes de un fenómeno (en este caso, el extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum L.* y su efecto sobre las cepas de bacterias *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae*). Una vez analizado y comprendido el experimento, los resultados se combinaron para llegar a una conclusión general.

También se consideró como una fase analítica, el método de dilución y observación de la actividad bactericida a diferentes concentraciones del extracto 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} mientras se determinaba la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB). para cada cepa bacteriana, y la fase sintética fue al evaluar los resultados y extraer conclusiones

3.6. Diseño experimental

Se realiza un análisis estadístico ANOVA de un factor para cada cepa, siendo la variable independiente la concentración del extracto y las variables dependientes son los resultados de crecimiento de cada cepa. Si el ANOVA indica diferencias significativas, se realizan pruebas post hoc (específicamente la prueba de Tukey) para identificar qué concentraciones son significativamente diferentes entre sí.

Los grupos Experimentales a tratar son:

Grupo 1: *Pseudomonas aeruginosa* con diferentes concentraciones del extracto.

Grupo 2: *Enterococcus faecalis* con diferentes concentraciones del extracto.

Grupo 3: *Klebsiella pneumoniae* con diferentes concentraciones del extracto.

Utilizando diferentes concentraciones del extracto de *Equisetum giganteum L.* y para aumentar la robustez de tus resultados se realizará 3 repeticiones para cada combinación de cepa y concentración.

3.6.1. Metodología para realizar la prueba estadística ANOVA

- Definir las hipótesis:
Hipótesis nula (H0): Las medias de todos los grupos son iguales.
Hipótesis alternativa (H1): Al menos la media de un grupo es diferente de los demás.
- Elegir un nivel de significancia:
El nivel de significancia (a menudo denominado α) suele fijarse en 0,05. Esto implica que está dispuesto a aceptar un 5% de posibilidades de equivocarse al rechazar la hipótesis nula.
- Recopilar y organizar los datos:
Se deben recopilar datos para cada grupo bajo estudio. Asegúrese que los datos cumplan con los supuestos de un ANOVA: normalidad, independencia y homogeneidad de varianzas.
- Calcular la estadística de prueba ANOVA en el programa estadístico Spss:
Calcular la suma de cuadrados entre los grupos (SCE), la suma de cuadrados dentro (SCD) y la suma de cuadrados total (SCT).
Calcular los grados de libertad (GL) para cada suma de cuadrados (GLE, GLD, GLT).
Calcular los cuadrados medios entre (CME) y los cuadrados medios dentro (CMD) dividiendo la suma de cuadrados por los grados de libertad correspondientes.
Calcular el estadístico F como la relación entre CME y CMD.
- Comparar estadísticamente el valor F
Determinar el valor crítico F usando los grados de libertad entre grupos, dentro de los grupos y total. Establecer si el valor F calculado es mayor que el F crítico aceptado entonces se acepta la hipótesis alternativa
- Examinar el valor p:
Si el valor p asociado con el estadístico F calculado es menor que el nivel de significancia (normalmente 0,05), se rechaza la hipótesis nula.
- Pruebas post hoc:
Si rechazó la hipótesis nula, realizar la prueba post hoc (HSD de Tukey) para determinar qué

medias de grupos específicos (si tiene más de dos grupos) son diferentes entre sí.

- Información de resultados:

Independientemente si los resultados fueron favorables o no para la investigación, se debe informar los hallazgos de manera comprensible, mostrando el valor F calculado, el valor p obtenido y si se aceptó o no la hipótesis nula.

3.7. Población y planificación, selección y cálculo del tamaño de la muestra

3.7.1. Población y planificación

La población objeto de estudio abarca a las cepas las cepas ATCC de *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae*, obtenidas mediante donaciones por entidades externas para el desarrollo de la presente investigación.

3.7.2. Selección y cálculo de la muestra

La muestra corresponde al total de la población objeto de estudio.

Criterios de inclusión:

- Cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae* de referencia ATCC.
- Muestras del extracto de *Equisetum giganteum L.* (Cola de caballo).

Criterios de exclusión:

- Cepas diferentes a *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae*.
- Extractos de *Equisetum giganteum L.* que no cumplan con los estándares de calidad o pureza requeridos.

3.8. Métodos, técnicas e instrumentos de investigación

3.8.1. Equipos, materiales, reactivos e insumos

Tabla 3-1: Equipos, materiales, reactivos e insumos utilizados

Equipos	Materiales	Reactivos	Insumos
<ul style="list-style-type: none">• Autoclave• Estufa	<ul style="list-style-type: none">• Agitadores de vidrio	<ul style="list-style-type: none">• Reactivo de Liebermann	<ul style="list-style-type: none">• Algodón• Asa de kolle

<ul style="list-style-type: none"> • Balanza analítica • Baño maría • Cocina eléctrica • Refrigerador • Mechero Bunsen 	<ul style="list-style-type: none"> • Capilares • Pipetas Pasteur • Probetas • Tubos de ensayo • Cajas Petri • Luna de reloj • Vasos de precipitado • Balones • Matraz Erlenmeyer • Cubetas cromatográficas 	<ul style="list-style-type: none"> • Burchard • Reactivo de cloruro férrico 	<ul style="list-style-type: none"> • Espátula • Guantes quirúrgicos • Pinzas • Papel aluminio • Gradilla para tubos de ensayo
---	--	---	--

Fuente: (Medina, 2016)

Realizado por: Zhicay, I. 2023.

3.8.2. Metodología del experimento

3.8.2.1. Recolección y procesamiento de la materia vegetal *Equisetum giganteum L.* (Cola de caballo)

El material vegetal fue colectado a principios de noviembre en el sector La Florida, ubicado en la parroquia San Miguel de Conchay, distrito de Limón Indanza, Morona Santiago, Ecuador, para garantizar la autenticidad de los ejemplares la recolección se la realizó manualmente y posteriormente fueron colocadas cuidadosamente en bolsas papel para prepararlos, identificarlos y depositarlos en la Escuela Politécnica Superior de Chimborazo, una vez en el laboratorio las muestras fueron lavadas para eliminar posible contaminaciones de la materia prima, inmediatamente después se dividieron en pequeñas porciones para favorecer un secado uniforme. La etapa de desecación se llevó a cabo en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica a una temperatura constante de 50 °C durante 14 horas, este minucioso proceso tiene como objetivo preservar la composición química de la materia vegetal.

Finalmente, para asegurar una mejor absorción de los solventes en los procedimientos posteriores las muestras fueron trituradas, con este procedimiento no solo hizo que las muestras recolectadas fueran de calidad, sino que también proporcionó una preparación apropiada para investigaciones posteriores, lo que es de gran importancia en investigaciones farmacéutica donde la composición química de las plantas es fundamental para su mejor análisis.

3.8.3. Análisis fisicoquímico de *Equisetum giganteum L.*

El objetivo de esta fase es caracterizar el extracto a partir de sus características físicas y químicas para obtener una comprensión más profunda de su composición. El análisis físico químico destaca

los componentes esenciales de los extractos y sus efectos terapéuticos en el enfoque bioquímico.

3.8.4. *Obtención del extracto de Equisetum giganteum L. (cola de caballo)*

3.8.4.1. *Extracción por el método de percolación*

1. Preparar los sistemas de percolación de 1000 ml con el sujetador y papel filtro
2. Pesar y colocar 30 gramos de ramas de *Equisetum giganteum L*
3. Colocar 300 ml de solvente (alcohol al 96%)
4. Dejar la llave abierta para iniciar la extracción
5. Limpiar y esterilizar el matraz donde se colocará el extracto
6. Recoger el extracto del percolador a un flujo de 20 gotas por minuto
7. Almacenar en un lugar adecuado el extracto
8. Finalizar el procedimiento de extracción

3.8.4.2. *Características organolépticas del extracto hidroetanólico de Equisetum giganteum L.*

La evaluación de las características organolépticas del extracto hidroetanólico de *Equisetum giganteum L.* (Cola de caballo), se las realizó tomando en cuantas percepciones sensoriales como el color, olor, sabor, etc. Esta evaluación proporcionó información valiosa para esta investigación sobre la composición y la calidad del extracto, la evaluación del extracto tuvo las siguientes consideraciones:

Tabla 3-2: Características organolépticas del extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum L.*

Característica	Descripción
Color	Observe visualmente el color del extracto y describirlo utilizando términos como "verde oscuro".
Olor	Oler el aroma del extracto y describa los aromas como "vegetal", "floral", "terroso", etc.
Sabor	Hacer una pequeña prueba de sabor, asegúrese de mantenerlo seguro y describir el sabor en términos de "amargo", "dulce", "ácido", etc.
Textura	Comprobar la textura del producto, si es líquido o si está pastoso, viscoso, etc.
Claridad	Verificar la claridad del extracto si es transparente, turbio u opaco
Impurezas	Examinar si hay impurezas visibles

Fuente: (Medina, 2016)

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

3.8.4.3. Determinación del rendimiento de la extracción

Procedimiento para determinar el rendimiento del extracto:

1. Llevar el extracto al matraz de fondo plano
Colocar el extracto hidroetanólico de *Equisetum giganteum L.* (Cola de caballo) en un matraz previamente tarado, utilizando técnicas que minimicen la pérdida del material.
2. Secado completo
Colocar sobre una estufa a una temperatura de 40 a 50° C durante una hora hasta eliminar el solvente y deje solo el extracto
3. Enfriado
Dejar las muestras a temperatura ambiente
4. Pesado
Las muestras secas colocar en una balanza de precisión y registrar los pesos
5. Calcular el porcentaje de rendimiento
6. Con los datos obtenidos para los pesos finales se procedió a determinar los rendimientos porcentuales aplicando la ecuación

$$\%RE = \frac{\text{peso extracto seco}}{\text{peso planta seca}} \times 100$$

7. Registrar los datos
En el cuaderno de laboratorio registrar los datos de los cálculos obtenidos
8. Análisis de resultados
Interpretar y analizar los resultados para evaluar la eficiencia del proceso de extracción.

3.8.4.4. Separación e identificación por cromatografía en capa fina (ccf).

1. Colocar un volumen adecuado de fase móvil en las cubas cromatográficas, esperar 30 minutos.
2. Sembrar el extracto en las placas de sílica gel (fase estacionaria), poner en contacto con la fase móvil hasta su acenso aproximadamente de 1 cm del extremo de las placas.
3. Una vez secas llevar las placas a la luz UV e identificar con reveladores químicos.

Identificación de terpenos:

- Fase móvil: Tolueno de acetato de etilo (90:10)
- Revelador: Liebermann-burchard

Identificación de taninos

- Fase móvil: Metanol y agua (90:10)

- Revelador: Cloruro Férrico al 5% en etanol

Identificación de flavonoides

- Fase móvil: acetato de etilo, ácido acético, ácido fórmico y agua (100:11:11:24)
- Revelador: cloruro de aluminio al 5%; longitud de onda 254 nm

Identificación de alcaloides

- Fase móvil: Ácido acético, metanol, agua (70:10:20)
- Revelador: Dragendorf

3.8.4.5. *Determinación del factor de referencia (rf)*

Fórmula: $RF = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra}}{\text{Distancia recorrida por la fase móvil}}$

3.8.5. *Determinación del efecto antimicrobiano in vitro*

3.8.5.1. *Procesamiento de las cepas clínicas en estudio*

Tabla 3-3: Medios de cultivo a utilizarse

Medios de cultivo	Composición	Propósito
Agar nutritivo	El agar nutritivo es un medio generalmente compuesto de extracto de carne y peptona, con la adición de agar como agente solidificante.	Este medio es rico en nutrientes y proporciona condiciones de crecimiento generales. Es útil para observar el crecimiento general de bacterias.
Agar de soja tróptico	Este medio combina extracto de soja, caseína peptónica y digestión de tejido animal, junto con agar para solidificación.	Es utilizado en la investigación para propósitos generales y puede ser adecuado para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana.
Agar Mueller-Hinton	Compuesto principalmente por caseína hidrolizada, almidón y carne de res en polvo, este medio incluye agar para solidificación.	es especialmente diseñado para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, La composición equilibrada de este medio permite una difusión uniforme de los agentes antimicrobianos, proporcionando resultados precisos y reproducibles.

Fuente: (Medina, 2016)

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

Conservar y replicar las cepas ATCC utilizando diferentes medios de cultivo como se detalla en la tabla 3-4.

Tabla 3-4: Procesamiento de las cepas clínicas en estudio

<i>Cepa ATCC</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Medios de comunicación	Agar de soja tríptico (agar de digestión de caseína de soja), agar de sangre de oveja no selectivo, agar de métodos estándar (agar de recuento en placa) o agar nutritivo	Agar de soja tríptico (agar de digestión de caseína de soja), agar de sangre de oveja no selectivo, agar de métodos estándar (agar de recuento en placa) o agar nutritivo	Agar de soja tríptico (agar de digestión de caseína de soja), agar de sangre de oveja no selectivo, agar de métodos estándar (agar de recuento en placa) o agar nutritivo
Temperatura	35°C	35°C	35°C
Atmósfera	Aerobio	Aerobio	Aerobio
Tiempo de crecimiento	24 a 48 horas	24 a 48 horas	24 a 48 horas

Fuente: (Medina, 2016)

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

3.8.5.2. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

Difusión en Disco (Kirby-Bauer)

Este método consiste en inocular bacterias previamente aisladas en una placa Petri con agar Mueller- Hinton (AMH), seguido por la colocación de discos de papel impregnados con la materia vegetal en la superficie del agar. La susceptibilidad antimicrobiana se evalúa al medir el diámetro de las zonas de inhibición bacteriana alrededor de los discos que contienen el extracto para luego compararlos con los criterios de interpretación de resultados utilizados para este método.

Medio de Cultivo: Agar Mueller-Hinton (AMH)

Procedimiento del medio de cultivo

1. Preparar el AMH de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Este medio debe ser preparado con agua destilada o des ionizada
2. Hervir el agar ya preparado agitando constantemente hasta que esté completamente disuelto, luego esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos.
3. Verificar que el pH de la preparación esté entre 7,2-7,4 a temperatura ambiente.
4. Enfriar el agar a 40-50 °C, luego verter el agar en las cajas Petri previamente esterilizadas
5. Dejar que el agar solidifique

6. Secar las placas a 30-37 °C en incubadora, con las tapas ligeramente abiertas hasta que la humedad se evapore.

Diluciones del extracto

1. Pesar 3 gramos de extracto y diluir en 0.1 ml DMSO (3000 mg/ml). Realizar diluciones del extracto hasta obtener una concentración de 187.5 mg/ml.
2. Las concentraciones a colocar en los discos serán: 3000 mg/ml, 1500 mg/ml, 750 mg/ml, 375 mg/ml y 187,5 mg/ml

Preparación del inóculo

- 1 Tomar 1000 ul de bacteria previamente inoculado en caldo. Añadir 9 ml de agua de peptona hasta lograr la comparación al estándar Mcfarland.
- 2 Realizar diluciones 10^{-3}
- 3 Sembrar la dilución 10^{-3} en las cajas Petri anteriormente preparadas. Añadir los discos en blanco.
- 4 Colocar las diluciones del extracto.
- 5 Reportar los resultados midiendo los halos de inhibición

3.8.5.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria

Método de Micro dilución en Caldo

El medio de cultivo a utilizarse es el Caldo Nutritivo que al igual que lo mencionado anteriormente se tiene que preparar según las indicaciones del fabricante con el objetivo de determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto de *Equisetum giganteum* L. frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae* utilizando el método de micro dilución en caldo para ello se lo realizará de la siguiente manera:

1. Preparación del Caldo Nutritivo:
 - Preparar el caldo nutritivo según las indicaciones del fabricante.
 - Asegurarse de que la preparación cumpla con los estándares de calidad y sea estéril.
2. Preparación de la Suspensión Bacteriana:
 - Cultivar las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae* en agar soya tripticaseina.
 - Suspende las colonias en 2 ml de caldo Nutritivo y dejar incubar por 18 horas a 37 °C.
3. Dilución del Extracto:
 - Preparar la muestra madre del extracto: 1,5 g de extracto en 1 ml de DMSO

4. Siembra en los pocillos
 - En cada uno de los pocillos colocar 150 µl de caldo nutritivo.
 - Colocar en el primer pocillo 150 µl del extracto previamente preparado y realizar las diluciones seriadas, excepto en el último pocillo el cual será el control positivo
 - Por último colocar en todos los pocillos 150 µl del inóculo de la bacteria
5. Determinación de la CMI:
 - La CMI es la concentración más baja del extracto que inhibe el crecimiento visible de las bacterias.
6. Registro de Resultados:
 - Registrar la concentración del extracto en el tubo más bajo donde no se observa crecimiento bacteriano.

3.8.5.4. Determinación de la concentración mínima bactericida

Para determinar la concentración mínima bactericida del extracto de *Equisetum giganteum* L. frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae* se lo realizará de la siguiente manera:

7. Preparación del Caldo Nutritivo:
 - Preparar el caldo Mueller-Hinton Cation según las indicaciones del fabricante.
 - Asegurarse de que la preparación cumpla con los estándares de calidad y sea estéril.
8. Preparación de la Suspensión Bacteriana:
 - Cultivar las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae* en agar soya tripticaseína.
 - Suspender las colonias en 2 ml de caldo Nutritivo y dejar incubar por 18 horas a 37 °C.
9. Dilución del Extracto:
 - Preparar la muestra madre del extracto: 1,5 g de extracto en 1 ml de DMSO
10. Siembra en los pocillos
 - En cada uno de los pocillos colocar 150 µl de caldo nutritivo.
 - Colocar en el primer pocillo 150 µl del extracto previamente preparado y realizar las diluciones seriadas, excepto en el último pocillo el cual será el control positivo
 - Por último, colocar en todos los pocillos 150 µl del inóculo de la bacteria
11. Diluciones de los pocillos
 - Elegir 4 pocillos en el cual no se presente turbidez incluido el control positivo y realizar 3 diluciones.
 - Sembrar en agar soya tripticaseína mediante la técnica de gota cada una de las

diluciones y dejar incubar por 18 horas a 37 °C.

12. Determinación de la CMB:

- La CMB es la concentración más baja del extracto que no permite el crecimiento visible de las bacterias.

13. Registro de Resultados:

- Registrar la concentración del extracto en el tubo más bajo donde no se observa crecimiento bacteriano.

3.8.6. Metodología para Tamizaje Fitoquímico de *Equisetum giganteum* L. (Cola de Caballo)

El tamizaje fitoquímico es una técnica que se utiliza comúnmente para identificar y evaluar la presencia de diferentes compuestos fenólicos presentes en los extractos de las plantas medicinales, para lo cual se utiliza una serie de ensayos con técnicas fundamentadas que se basan en reacciones químicas específicas que permiten visualizar o no la presencia de los diferentes grupos de compuestos bioactivos como: flavonoides, alcaloides, terpenos, entre otros. Estos ensayos cualitativos se muestran a través de cambios de color, formación de precipitados o reacciones químicas particulares, proporcionando una visión general de la composición química de la muestra vegetal, pero no cuantifica la cantidad presente, ni identifica los tipos específicos de compuestos, es decir solo identifica la presencia de compuestos bioactivos con potencial terapéutico.

Procedimiento

1. Preparación de Extractos:

- Recolectar y secar adecuadamente las muestras de *Equisetum giganteum* L.
- Obtener el extracto mediante el método de percolación utilizando alcohol al 96 % como solvente.

2. Aplicación de Ensayos Específicos:

- Flavonoides: Ensayo de Shinoda y Antocianidinas
- Cumarinas: Ensayo de Baljet
- Quinonas/Antraquinonas: Ensayo de Borntrager
- Alcaloides: Ensayos de Dragendorff, Mayer y Wagner
- Triterpenos o Esteroles: Ensayo de Liebermann-Burchard
- Saponinas: Ensayo de Espuma.
- Glicósidos Cardiotónicos: Ensayo de Kedde.

- Aminoácidos libres: Ensayo de Ninhidrina.
 - Compuestos Fenólicos y/o Taninos: Ensayo de Cloruro Férrico.
 - Azúcares Reductores: Ensayo de Fehling.
 - Resinas: Ensayo de Resinas.
3. Registro y Análisis de Resultados:
- Registrar los resultados obtenidos para cada prueba.
 - Analizar y comparar los resultados para determinar la presencia o ausencia de cada compuesto fitoquímico en la muestra de *Equisetum giganteum L.*

CAPITULO IV

4. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1. Control de calidad realizada a la materia vegetal

4.1.1. Determinación de cenizas totales de *Equisetum giganteum L* crudo

Tabla 4-1: Cenizas totales de *Equisetum giganteum L*. crudo

Muestra vegetal	% de cenizas Réplica 1	% de cenizas Réplica 2	% de cenizas Promedio	Valor referencial
<i>Equisetum giganteum L</i>	12,32 %	10,40 %	11,36 %	10% al 20%

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

La tabla 4-1 muestra los valores obtenidos de las muestras 1 y 2 que son del 12,32% y del 10,40%, respectivamente. El promedio de ambas muestras arroja un valor de 11,36% que corresponde al contenido de cenizas totales presentes en la muestra *Equisetum giganteum L*. Al realizar un análisis comparativo de los resultados obtenidos con el trabajo de titulación realizado por (Medina, 2016) titulado “*Determinación del efecto antimicrobiano in vitro del extracto de Equisetum Giganteum L. (cola de caballo) sobre el crecimiento de staphylococcus aureus, escherichia coli y candida albicans*”, Arequipa, 2015, donde obtiene un porcentaje de cenizas totales de 24,79%, se comprueba que este valor se encuentra distante a este trabajo, pero comparando estos valores con el valor referencial citado en el trabajo de titulación realizado por (Gutierrez, y otros, 2018) titulado: “Efecto Anticancerígeno de Extractos de *Equisetum Giganteum L.* “cola de caballo” en líneas celulares HeLa y HepG2, Arequipa – Boston, 2017 – 2018”, en donde menciona que las cenizas totales en esta especie de planta es del 10% al 20%, se deduce que los resultados se encuentran dentro del rango establecido, esto indica que en términos generales, las muestras analizadas tienen un contenido de cenizas totales que se alinea con lo reportado en la literatura. Cabe recalcar que las cenizas totales en plantas como *Equisetum giganteum L.* puede variar dependiendo de varios factores, como las condiciones de crecimiento, el suelo, la época de la cosecha, entre otros (Debenedetti, y otros, 2017).

4.1.2. Determinación de humedad de *Equisetum giganteum L.*

Tabla 4-2: Humedad de *Equisetum giganteum L.*

Muestra vegetal	Contenido de humedad % Réplica 1	Valor referencial
<i>Equisetum giganteum L</i>	5.022%	4% al 15%

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

La tabla 4-2 muestra el contenido de humedad del *Equisetum giganteum L.* realizado en el laboratorio, esta determinación fue una pieza esencial para saber si la conservación y el procesamiento del material vegetal es óptimo para su posterior análisis fitoquímico y farmacéutico, un contenido de humedad superior al límite máximo puede influir en la estabilidad y la calidad del extracto, ya que los niveles elevados de humedad podrían afectar la durabilidad y facilitar la proliferación microbiana, lo que eventualmente alteraría las propiedades químicas de las muestras (Chávez, y otros, 2021).

El valor calculado de 5.022% para contenido de humedad del extracto del *Equisetum giganteum L.*, se situó dentro del rango referencial de 4 al 15% mencionado por Peláez y Pereda (2018), así también se observó que este valor se encuentra cerca del límite inferior, este resultado contrasta con el estudio realizado por Mendoza y Aguirre (2022), donde se indicó un valor de 11,6% de humedad, al igual que la investigación de Medina (2016) donde el valor calculado de humedad fue de 15,68% que es un valor superior al referencial, según Mendoza y Aguirre (2022) el valor de la humedad en el *E. giganteum L.* crudo puede variar por varios factores, como son: el ambiente en el que crece la planta, las condiciones climáticas, la temporada de cosecha y el proceso de almacenamiento.

4.2. Extracto de *Equisetum giganteum L.*

4.2.1. Obtención del extracto de *Equisetum giganteum L.* (cola de caballo)

Tras la recolección de la materia vegetal, se procedió a obtener el extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum L.*, utilizando como solvente alcohol al 96%, para la obtención del extracto se utilizó el método de percolación, que aseguró obtener los componentes deseados de la planta.



Ilustración 4-1: Sistemas de percolación
usando solvente hidroalcohólico.

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

Luego de obtener el extracto, se procedió a desecarlo utilizando un rotavapor hasta que el solvente se evaporó casi por completo, posteriormente, se trasladó el extracto a una estufa a 30 °C, donde se mantuvo durante 48 horas para asegurar la completa evaporación del solvente con este proceso se garantizó la obtención de un extracto semi sólido y estable, listo para los análisis y ensayos pertinentes en el estudio.

4.2.2. *Características organolépticas del extracto hidroalcohólico de Equisetum giganteum L.*

El extracto hidroalcohólico derivado de la planta *Equisetum giganteum L.* (cola de caballo) se exhibe en la ilustración 4-2, donde se destaca su apariencia y propiedades organolépticas, la tabla 4-3 detalla específicamente estas características, proporcionando un análisis detallado de sus atributos sensoriales. Estas cualidades fueron de gran ayuda al momento de entender la percepción sensorial de este extracto.



Ilustración 4-2: Extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum L.*

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

Tabla 4-3: Características organolépticas del extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum L.*

Característica	Descripción
Color	Verde oscuro
Olor	Suigeneris
Sabor	Amargo
Textura	Líquido
Claridad	Claro
Impurezas	No hay presencia de impurezas.

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

En la Tabla 4-3 se muestra una descripción detallada de las características organolépticas del extracto: él se color presenta con un tono verde oscuro, y se lo describe como "Suigeneris", lo que indica un olor particular, singular o único, es decir con propiedades distintivas y específicas para el extracto de *Equisetum giganteum* L., también se percibió un sabor amargo además la textura es líquida y claro, lo que implica que no tiene turbidez ni opacidad, no se detectó la presencia de impurezas.

El tono verde oscuro indicó la presencia de ciertos compuestos específicos, como clorofila u otros pigmentos naturales que pueden estar presentes en la planta de *Equisetum giganteum*, la singularidad en el aroma podría ser relevante en términos de identificación y evaluación de la autenticidad del extracto, el sabor amargo podría ser un indicativo de la presencia de ciertos compuestos bioactivos, como alcaloides o flavonoides, que a menudo presentan esta característica, la consistencia líquida y la claridad indican que es extracto homogéneo y libre de partículas sólidas o impurezas, la falta de impurezas es un aspecto positivo y resalta la pureza del extracto.

Las características organolépticas del extracto de *Equisetum giganteum* L. se compararon con investigaciones previas similares realizadas por Cáceres (2018) y Debenedetti & Stoliar (2017), mostrando ciertas similitudes, los autores de los estudios mencionaron un extracto de tono verde oscuro que se asemeja a los resultados obtenidos en esta investigación. En relación al olor, encontramos un perfil único, que se describe como "suigeneris". Esta particularidad en el olor no se ha mencionado previamente en investigaciones relacionadas con *Equisetum*, por lo que se dedujo una composición química distintiva o una variabilidad genética entre especies, el sabor amargo observado en nuestro estudio coincide con los resultados de Mendoza & Aguirre (2022), quienes también identificaron un sabor amargo en extractos de *Equisetum giganteum* L. Sin embargo, Paiba & Pérez (2019) informaron un sabor ligeramente dulce en sus muestras de *Equisetum robustum*, lo que contrasta con nuestro hallazgo.

La textura, del extracto se presentó líquida con una claridad notable, sin presencia de impurezas visibles, hallazgos que concuerdan con la mayoría de los estudios mencionados anteriormente, las diferencias entre algunas características organolépticas podrían deberse a variaciones en la especie, las condiciones de cultivo, el método de extracción o incluso a factores ambientales, las discrepancias resaltan la necesidad de investigaciones adicionales para comprender mejor la variabilidad en las características organolépticas y su posible relación con la composición química y las propiedades medicinales de *Equisetum giganteum* L. En general, los resultados de esta investigación se alinean con la mayoría de los estudios previos en términos de color, textura y

ausencia de impurezas, se observó discrepancias en el olor y el sabor, lo que sugiere posibles variaciones en la composición química de los extractos de *Equisetum giganteum L.*

4.2.3. Determinación del rendimiento del extracto de *Equisetum giganteum L.*

Tabla 4-4: Rendimiento de los extractos de *Equisetum giganteum L.*

SOLVENTE	EXTRACTOS	MATERIA VEGETAL (g)	EXTRACTO SECO (g)	RENDIMIENTO (%)
HIDROALCOHÓLICO	MUESTRA 1	30	3,94	13,13
	MUESTRA 2	30	3,85	12,83

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

La tabla 4-4 muestra los rendimientos obtenidos de las dos muestras de *Equisetum giganteum L.* mediante el uso del solvente hidroalcohólico. La Muestra 1 produjo un extracto seco de 13.13% a partir de 30 gramos de materia vegetal, mientras que la Muestra 2 generó un extracto seco de 12.83% con la misma cantidad de materia vegetal, esto sugiere un rendimiento ligeramente mayor en la Muestra 1 en comparación con la Muestra 2.

Al comparar estos resultados con investigaciones similares, se observan variaciones en los rendimientos de extractos de *Equisetum giganteum L.*, en un estudio de (Mendoza, y otros, 2022), utilizando un método de extracción similar, obtuvieron un rendimiento promedio de 11.5%, en contraste, Paiba & Pérez (2020) reportaron rendimientos que oscilaban entre el 14% y el 16%, empleando el mismo solvente, estas diferencias en los rendimientos podrían atribuirse a múltiples factores, como las condiciones de cultivo, el estado y la parte de la planta utilizada, la técnica de extracción, y la variabilidad inherente a la especie de *Equisetum giganteum L.*

4.2.3.1. Análisis estadístico descriptivo del rendimiento (%) del extracto de *Equisetum giganteum l. (cola de caballo)*

Tabla 4-5: Análisis estadístico descriptivo del rendimiento (%)

Extracto	Materia vegetal (g)	Extracto seco (ES)(g)	Media del ES	Desviación estándar del ES	Rendimiento(R) (%)	Media del R	Desviación estándar del R
Muestra 1	30	3,94	3,895	0,045	13,13	12,98	0,15
Muestra 2	30	3,85			12,83		

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

En la tabla 4-5 se muestra los valores estadísticos descriptivos del rendimiento (%), en donde el peso del extracto seco (ES) está dado en gramos y para la Muestra 1 (M1) es de 3,94 y 3,85 para

la Muestra 2 (M2), la media general calculada para del ES es de 3,895 con una desviación estándar de 0,045, en cuanto al rendimiento (R), para la M1 es de 13,13% y para la M2 12,83% con una media general de 12,98% y una desviación estándar de 0,15 entre las muestras. Con estos datos se puede deducir que existe una pequeña variación entre las muestras M1 y M2 en cuanto al extracto seco y al rendimiento, la desviación estándar demuestra que existe una consistencia con los resultados obtenidos.

4.2.4. Tamizaje fitoquímico del extracto hidroetánolico de *Equisetum giganteum L.*

El análisis fitoquímico del extracto hidroetánolico de *Equisetum giganteum L.* reveló la presencia de diversos metabolitos, según diferentes ensayos. Se destacan la presencia de flavonoides, cumarinas, alcaloides, y triterpenos, indicando una composición química rica y diversa en compuestos bioactivos. Se observó ausencia de quinonas, saponinas, glicósidos cardiotónicos, aminoácidos libres, y azúcares reductores.

La Tabla 4-6 proporciona una visión general de los resultados obtenidos durante el tamizaje fitoquímico del extracto de *Equisetum giganteum L.* (cola de caballo). Esta evaluación proporcionó una descripción detallada de la composición química del extracto, ayudando a comprender su potencial bioactivo.

Tabla 4-6: Tamizaje fitoquímico del extracto hidroetánolico de *Equisetum giganteum L.*

Metabolitos	Ensayo	Indicadores	Resultado
Flavonoides	Shinoda	Amarillo, naranja, carmelita o rojo	(+)
	Antocianidinas	Rojo a marrón en la fase amfílica	(+)
Cumarinas	Baljet	Coloración o precipitado rojo	(+)
Quinonas/ Antraquinonas	Borntrager	Coloración rosada (++)	(-)
		Coloración roja (+++)	(-)
Alcaloides	Dragendorff	Opalescencia (+)	(++)
	Mayer	Turbidez definida (++)	(+)
	Wagner	Precipitado (+++)	(+)
Triterpenos o Esteroles	Liebermann- Burchard	Esteroles (Violeta, verde o azul)	(+)
		Esteroides (Azul o verde)	(-)
		Triterpenos (Rosa, rojo o magenta)	(-)
Saponinas	Espuma	Presencia de espuma por más de 2 minutos	(-)
Glicósidos cardiotónicos	Kedde	Violáceo	(-)

Aminoácidos libres	Ninhidrina	Azul violáceo	(-)
Compuestos fenólicos y/o taninos	Cloruro férrico	Compuestos fenólicos en general (rojo-vino)	(+)
		Taninos del tipo pirocatecólicos (verde intenso)	(-)
		Taninos del tipo pirogalotánicos (azul)	(-)
Azúcares reductores	Fehling	Rojo	(-)
Resinas	Resinas	Precipitado	(+)

Realizado por: Zhicay, I. 2023.

Los flavonoides son compuestos fenólicos, estos compuestos tienen estructuras que proporcionan propiedades antioxidantes y habilidades de captación de radicales, por lo tanto, se han utilizado como agentes antiinflamatorios, anticancerígenos y fotoprotectores en diversos sistemas biológicos. (Phytochemical Characterization, Antimicrobial Activity, and Antioxidant Potential of *Equisetum hyemale* L. (Equisetaceae) Extracts, 2015) Al aplicar el ensayo de Shinoda para revelar la presencia de flavonoides y antocianidinas en el extracto hidroetanólico de *Equisetum giganteum* L., se pudo observar la presencia de estos compuestos, evidenciado por la coloración que iba desde amarillo hasta rojo y marrón, dando por lo tanto resultado positivo (+).

Los fenoles son compuestos que comprenden una amplia variedad de moléculas representadas en la mayoría de las clases de metabolitos secundarios. Los flavonoides tienen estructuras que proporcionan propiedades antioxidantes y habilidades de captación de radicales. Por lo tanto, se han utilizado como agentes antiinflamatorios, anticancerígenos y fotoprotectores en diversos sistemas biológicos.

Según Cartaya, O. & Reynaldo, I. (2011) los flavonoides son ricos en antioxidantes, lo que proporciona a nuestro cuerpo protecciones inmunes naturales contra las toxinas ambientales y endógenas diarias, las diferentes clases de flavonoides tienen varias actividades biológicas importantes, como anticancerígenas, antibacterianas, antifúngicas, antidiabéticas, antipalúdicas, neuroprotectoras, cardioprotectoras y antiinflamatorias. En cuanto a la acción antimicrobiana, aunque a concentraciones elevadas en comparación con los antibióticos, algunos flavonoides han demostrado actividad frente a microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Bacillus typhosus*. (Flavonoides: Características químicas y aplicaciones, 2011)

El ensayo de Baljet para analizar cumarinas dio un resultado positivo, como lo demuestra el

precipitado obtenido de coloración rojo. Esta manifestación indica que las cumarinas estaban presentes en la muestra de *Equisetum giganteum L.* examinada. Las cumarinas, son compuestos orgánicos que con frecuencia exhiben propiedades farmacológicas.

Los hallazgos de cumarinas en el extracto hidroetanólico de *Equisetum giganteum L.* adquieren una relevancia significativa a la luz de la extensa gama de propiedades farmacológicas asociadas a estos metabolitos secundarios.

Las quinonas, son productos de la oxidación de compuestos aromáticos, se dividen en benzoquinonas, naftoquinonas y antraquinonas, que son las más comunes en la naturaleza. Según Leyva, et al. (2017) Las quinonas son una clase de compuestos naturales y sintéticos que tienen varios efectos beneficiosos. Las quinonas presentan una clase de moléculas que previenen y tratan varias enfermedades como la osteoporosis y las enfermedades cardiovasculares, por su actividad antioxidante, mejoran las condiciones generales de salud. Muchos de los medicamentos clínicamente aprobados o aún en ensayos clínicos contra el cáncer son compuestos relacionados con las quinonas. En el ámbito farmacéutico, se observó la vitamina K1, que se deriva de las antraquinonas, contribuye a la coagulación sanguínea y exhibe actividad anticancerígena. La lawsona, la juglona y la plumbagina, que se sintetizan en plantas, tienen efectos antibacterianos. (Importancia química y biológica de las quinonas. Revisión bibliográfica, 2017)

Los resultados del ensayo Dragendorff, Mayer y Wagner para detectar alcaloides revelaron opalescencia (+), turbidez definida (++) y un precipitado de intensidad considerable (+++), lo que indica la presencia de alcaloides en el extracto hidroetanólico de *Equisetum giganteum L.* Los resultados positivos con diversas intensidades sugieren una diversidad en la concentración de alcaloides en la muestra analizada.

Según Castillo et al. (2021) la detección los alcaloides puede tener implicaciones farmacológicas y terapéuticas importantes, ya que estos compuestos orgánicos nitrogenados tienen propiedades biológicas en la prevención y control de dolencias relacionadas con cáncer e inflamaciones. Estos resultados muestran la riqueza química que posee el extracto, proporcionando información beneficiosa para su uso potencial en el campo de la farmacología. (Identificación de alcaloides en corteza de uncaria tomentosa y discusión sobre su potencial farmacológico., 2021)

Los resultados del ensayo de Liebermann-Burchard para la detección de triterpenos o esteroides mostró una reacción positiva (+) para esteroides, indicando una coloración en tonos violeta, verde o azul, sin embargo, la reacción fue negativa (-) para esteroides y triterpenos porque no hubo un cambio de color hacia azul o verde ni a color rosa, rojo o magenta. La ausencia de cambio de color en la prueba de esteroides y triterpenos manifiesta que estos compuestos no están presentes

en la muestra o la concentración es inferior al umbral de detección.

Según Figueroa (2019) la importancia farmacológica de los triterpenos, en particular del ácido oleanólico y sus derivados, como agentes son notables propiedades antiinflamatorias, estas sustancias han sido evaluadas en ensayos in vivo e in vitro, evidenciando su capacidad para inhibir la inflamación dérmica, suprimir la producción de compuestos inflamatorios clave como el óxido nítrico y la prostaglandina E2, y mostrar una actividad más robusta que algunos fármacos de referencia. Además, se destaca el potencial anticancerígeno del ácido 2-ciano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oico (CDDO), que presenta una potencia antiinflamatoria significativamente mayor que su precursor, el ácido oleanólico, sugiriendo aplicaciones prometedoras en la prevención y tratamiento de enfermedades inflamatorias y neoplásicas. (Figueroa, 2019)

El ensayo de Espuma para la detección de Saponinas arrojó un resultado negativo (-), indicando la ausencia de estos compuestos en el extracto hidroetanólico de *Equisetum giganteum L.* (cola de caballo). La prueba consiste en evaluar la formación de espuma, y en este caso, no se observó la presencia de espuma por más de 2 minutos.

Cardozo et al. (2020) menciona que las saponinas son compuestos orgánicos anfifílicos que se encuentran presentes en diversas plantas y se destacan por su notable importancia farmacológica, debido a su estructura única que les concede propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y anticancerígenas son usadas generalmente en tratamientos antimicrobianos, antiinflamatorios y fármacos contra el cáncer, además por su capacidad para modular la respuesta inmune sus aplicaciones se amplían hacia el campo del tratamiento de enfermedades autoinmunes, existen varios estudios en donde se ha observado que algunas saponinas pueden contribuir a la reducción del colesterol, lo que posibilita su uso en el manejo de condiciones cardiovasculares. Su uso en industria farmacéutica se debe a que estas moléculas son tan versátiles para la búsqueda de nuevos compuestos y el desarrollo de medicamentos innovadores, en conclusión, las saponinas presentan una rica fuente de posibilidades terapéuticas y son objeto de interés en el campo biomédico. (Cardozo, y otros, 2020)

El resultado obtenido para la detección de Glicósidos cardiotónicos con el ensayo de Kedde fue negativo, ya que no se dio una coloración violácea, por lo que deduce la ausencia o una concentración muy baja de este compuesto en el extracto hidroetanólico de *Equisetum giganteum L.*

Según Lobaton y Márquez (2022), los glicósidos cardiotónicos son una clase de compuestos químicos que afectan al sistema cardiovascular, estos compuestos son conocidos por sus

propiedades sobre la función cardíaca, la falta de glicósidos cardiotónicos, según estos resultados, podría indicar que la cola de caballo carece de estos compuestos específicos en concentraciones detectables por la metodología utilizada. Estos compuestos se encuentran mayoritariamente en las hojas de diversas familias de plantas, incluidas *Scrofulariaceae*, *Apocynaceae*, *Liliaceae*, *Ranunculaceae* y *Moraceae*, además, se han identificado bufanólidos en ranas del género *Bufus* y en las alas de las mariposas monarca. Estos compuestos han captado la atención debido a sus posibles propiedades anticancerígenas, la importancia farmacológica de los glicósidos cardiotónicos es en el tratamiento de enfermedades cardíacas y su relevancia potencial en el campo de la oncología. (Lobaton, y otros, 2022)

Camba et al. (2022) mencionan que los compuestos fenólicos generalmente conocidos son el ácido fenólico, taninos, estilbenos y lignanos y se encuentran en los tejidos, paredes celulares y compartimentos subcelulares de las plantas, además poseen actividades biológicas importantes, incluidas propiedades antioxidantes, quimiopreventivas, neuroprotectoras, cardioprotectoras e inmunomoduladoras (Tamizaje fitoquímico, fenoles totales y actividad antioxidante de *citrus aurantium.*, 2022)

En el ensayo de resinas aplicado al extracto hidroetanólico de *E. giganteum L.* dio como resultado positivo ya que existió la presencia de un precipitado, lo que sugiere que existe resinas en la muestra proporcionada. Chávez y Ramos (2021) mencionan que las resinas son sustancias orgánicas insolubles en agua, pero solubles en solventes orgánicos, la presencia de estos compuestos es relevante desde el punto de vista farmacológico y terapéutico ya que estas sustancias a menudo contienen propiedades resinosas y se utilizan en diversas aplicaciones como: la preparación de tinturas o extractos con implicaciones medicinales. El hallazgo de resinas en el extracto proporcionó información importante sobre la composición química del extracto de *Equisetum giganteum L.*, así como su uso potencial en investigaciones farmacológicas (Chávez, y otros, 2021).

4.2.5. Separación e identificación por cromatografía en capa fina (CCF).

Una vez obtenido el extracto se procedió a realizar un análisis por cromatografía en capa fina, obteniéndose los siguientes resultados:

4.2.5.1. Identificación de terpenos

Para la identificación de este compuesto se utilizó como fase móvil tolueno: acetato de etilo (90:10) y como revelador Liebermann-Burchard. Las medidas de la placa para cromatografía que se utilizó fueron de 10 cm de largo y 4 cm de ancho. En la Ilustración 4-3

se observa colores característicos según el ensayo utilizado. Medina (2016) menciona que el color violeta, verde o azul pertenecen a la presencia de terpenos. También se realizó el análisis bajo la luz UV a 254nm y presentó fluorescencia con un anillo violeta – azulado dando un resultado Rf igual a 0,94.

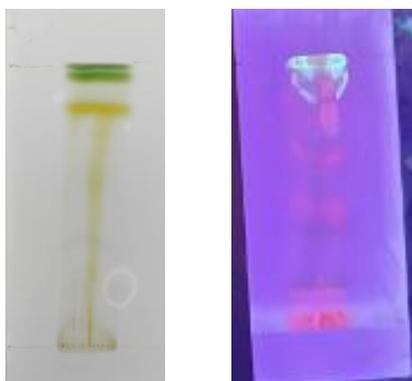


Ilustración 4-3: Identificación de terpenos

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

Los terpenos en general han atraído mucha atención debido a sus importantes funciones fisiológicas como hormonas, anclajes de membranas alifáticas, mantenimiento de la estructura de la membrana además de sus funciones ecológicas como compuestos de defensa, atrayentes de insectos/animales. Así también sus amplios usos en aplicaciones farmacéuticas e industriales que van desde sabores y fragancias hasta medicamentos (Figueroa, 2019).

Masyita et al. (2022) han informado que los terpenos ejercen actividades antimicrobianas contra bacterias tanto susceptibles como resistentes a los antibióticos, principalmente a través de su capacidad para promover la ruptura celular y la inhibición de la síntesis de proteínas y ADN. Carvacrol, carvona, eugenol, geraniol y timol se encuentran entre los terpenos que demostraron acción antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, además, se ha demostrado que los terpenoides son uno de los metabolitos secundarios producidos por plantas aromáticas y medicinales que desempeñan un papel clave en la resistencia a las enfermedades.

4.2.5.2. Identificación de flavonoides

Para la identificación de flavonoides se utilizó una fase móvil acetato de etilo: acético: ácido fórmico: agua (100:11:11:24) y como revelador cloruro de aluminio al 5 % en etanol. Las medidas de la placa para cromatografía que se utilizó fueron de 10 cm de largo y 4 cm de ancho. En la Ilustración 4-4 se observa colores característicos del ensayo. Según Medina

(2016) pertenecen a la presencia de flavonoides, bajo la luz UV a 254nm se presenta fluorescencia verde – amarillenta y azulada con un resultado Rf igual a 0,41.



Ilustración 4-4: Identificación de flavonoides

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

Los flavonoides se encuentran en una variedad de formas estructurales en los extractos de plantas, estos se dividen en seis clases: flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavanoles y antocianidinas. Además, los flavonoides son antioxidantes naturales (polifenoles) que están presentes en extractos de plantas; desempeñan un papel clave en los mecanismos de defensa antioxidantes en los sistemas biológicos y actúan como agentes eliminadores de radicales libres. (Flavonoides: Características químicas y aplicaciones , 2011)

4.2.5.3. *Identificación de taninos*

Para la identificación de taninos se utilizó la fase móvil metanol: agua (90:10) y como revelador cloruro férrico al 5 % en etanol. Las medidas de la placa para cromatografía que se utilizó fueron de 10 cm de largo y 4 cm de ancho. En la Ilustración 4-5 en se observa colores característicos del ensayo. Según Medina (2016) pertenecen a la presencia de taninos (color verde a marrón) con un resultado Rf igual a 0,78.

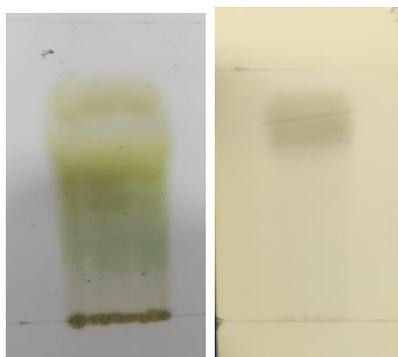


Ilustración 4-5: Identificación de taninos

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

Los taninos son componentes esenciales en la fisiología de muchas plantas, protegiéndolas de eventos físicos y biológicos dañinos, también tienen importantes propiedades nutraceuticas porque son sustancias bioactivas capaces de producir efectos beneficiosos en el organismo si se ingieren en la dieta durante largos periodos de tiempo. Los taninos son moléculas útiles para la salud humana debido a sus propiedades antioxidantes. Tienen la capacidad de proteger los tejidos de la acción de los radicales libres debido a los procesos de envejecimiento celular (Tamizaje fitoquímico, fenoles totales y actividad antioxidante de citrus aurantium., 2022).

4.2.5.4. *Identificación de alcaloides*

Para la identificación de alcaloides se utilizó una fase móvil ácido acético: metanol: agua (70:10: 20) y como revelador al reactivo de Dragendorff. Las medidas de la placa para cromatografía que se utilizó fueron de 10 cm de largo y 4 cm de ancho. En la Ilustración 4-6 se muestra los colores característicos del ensayo. Medina (2016) menciona que los indicadores pertenecen a la presencia de alcaloides, bajo la luz UV a 254nm se presenta fluorescencia naranja – amarillo con un resultado Rf igual a 0.61.

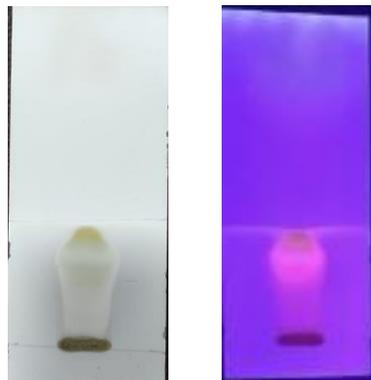


Ilustración 4-6: Identificación de alcaloides

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

Los alcaloides son compuestos químicos importantes que sirven como una rica reserva para el descubrimiento de fármacos. Varios alcaloides aislados de hierbas naturales exhiben efectos antiproliferativos, antibacterianos, antivirales, insecticidas y antimetastásicos en varios tipos de cánceres tanto *in vitro* como *in vivo* (*Pseudomonas aeruginosa*: Pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics., 2022).

4.3. Actividad antimicrobiana del extracto

4.3.1. Preparación de la muestra madre

A partir del extracto, se extrajo una muestra de 1,5 g, a la cual se le añadió 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) para lograr una solución completamente homogénea.

4.3.2. Activación de las cepas bacterianas

Se seleccionaron las cepas bacterianas motivos de estudio: *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis*. Luego, se agregó una colonia de cada cepa a 2 ml de caldo soya triptocaseína (TSB), se homogeneizó la muestra mediante una escala de turbidez de 1 de Mc Farland, que equivalió a 1×10^8 UFC/ ml, esto con el objetivo de obtener la concentración adecuada de bacterias para su crecimiento. Los tubos con las muestras se incubaron en la estufa a 37 °C durante 18 horas.

4.3.3. Preparación del pre inóculo

Se tomaron 500 uL de cada muestra bacteriana y se colocaron en tubos previamente preparados con 4,5 ml de solución salina (S.S). A continuación, se realizaron tres diluciones (10^{-3}). A partir de la dilución 10^{-3} , se tomaron 500 uL y se colocaron en dos tubos con caldo nutritivo, repitiendo este proceso para obtener dos diluciones adicionales. La dilución 10^{-2} se consideró como el pre inóculo de trabajo. Este procedimiento permitirá llevar a cabo la evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto contra las cepas bacterianas seleccionadas.

4.3.4. Determinación del CMI / Concentración Mínima Inhibitoria

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) es la concentración más baja que debe tener un antimicrobiano para inhibir el crecimiento bacteriano después de su incubación.

Se tomaron a consideración 3 pocillos debido a que estos se encuentran en el rango de inhibición, los 9 pozos de la micro placa se consideran positivos debido a la presencia de turbidez, mientras que en los pocillos que no existió turbidez se consideraron como negativos.

4.3.4.1. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum* (Cola de Caballo).

Tabla 4-7: Determinación de la CMI del extracto de *Equisetum giganteum* sobre *Enterococcus faecalis*

Cepa bacteriana	<i>Enterococcus faecalis</i>			
Pocillos/concentración	Pozos sin turbidez Diluciones			Control positivo
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
B5 (187.5 mg/ml)	+	+	+	+
B3 (375 mg/ml)	+	-	-	+
B1 (750 mg/ml)	+	-	-	+

Positivo (+), Negativo (-)

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

La Tabla 4-7 refleja los resultados de la concentración mínima inhibitoria del extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum* sobre *Enterococcus faecalis* para lo cual se realizó diluciones seriadas a partir de 750 mg/ml hasta llegar a concentraciones más bajas. Se registró crecimiento bacteriano en todas las diluciones del pocillo B5 y en las diluciones 10⁻¹ de los pocillos B3 y B1, mientras que las diluciones 10⁻² y 10⁻³ de las concentraciones de los pocillos B3 y B1 mostraron resultados negativos, indicando la inhibición del crecimiento bacteriano en esas condiciones. Como la CMI, es la concentración más baja que inhibe el crecimiento bacteriano está entre el pocillo B5 (187.5 mg/ml) y el pocillo B3 con la concentración de 375 mg/ml.

No existen estudios previos de determinación de la CMI del extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum* sobre *Enterococcus faecalis*, pero comparando los resultados obtenidos en la esta investigación de Medina (2016), titulada “*Determinación del efecto antimicrobiano in vitro del extracto de Equisetum Giganteum L. (Cola de caballo) sobre el crecimiento de Staphylococcus Aureus, Escherichia Coli y Candida Albicans*”, se observan similitudes ya que en ambos casos se trabaja con entero bacterias y la concentración del extracto que inhibe las mismas es mayor. Estos resultados sugieren una tendencia consistente en la capacidad inhibitoria del extracto, respaldando la efectividad potencial del mismo contra *Enterococcus faecalis*.

Tabla 4-8: Determinación de la CMI del extracto de *Equisetum giganteum* sobre *Klebsiella pseudomoniae*

Cepa bacteriana	<i>Klebsiella pneumoniae</i>			
Pocillos/concentración	Pozos sin turbidez Diluciones			Control positivo
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
A5 (187.5 mg/ml)	+	-	-	+
A3 (375 mg/ml)	+	+	-	+
A1 (750 mg/ml)	+	-	-	+

Positivo (+), Negativo (-)

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

En la tabla 4-8 se muestra el análisis del extracto frente a la cepa bacteriana *Klebsiella pneumoniae*, la misma que registró crecimiento bacteriano en todas las diluciones de 10^{-1} de los pocillos A5, A3, y A1 de las concentraciones del extracto, mientras que las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} de los pocillos A5, A3, y A1 presentaron resultados negativos a excepción de la dilución 10^{-2} del pocillo A3(375 mg/ml) que resulto positivo, en las diluciones de 10^{-3} de todos los pocillos indicó inhibición del crecimiento bacteriano. El punto de corte de crecimiento y no crecimiento está entre el pocillo A5 y A3 correspondientes a las concentraciones 187.5 mg/ml y 375 mg/ml, siendo la CMI la concentración 187.5 mg/ml, es decir que este pocillo contiene la concentración más baja que inhibe el crecimiento bacteriano.

Estos resultados coinciden con los resultados de Radulović et al. (2016), quienes encontraron propiedades inhibitoras en extractos de *Equisetum arvense* contra *Klebsiella pseudomoniae*. Esto da la idea que el uso del extracto podría ser efectivo contra ciertos tipos de bacterias. En el caso de *K. pneumoniae*, los resultados indican un efecto inhibitor en concentraciones más altas (375 mg/ml y 750 mg/ml), estos resultados son consistentes con las observaciones de Gutierrez y Sánchez (2018), quienes sugirieron que los extractos de plantas a concentraciones altas pueden tener un impacto inhibitor en algunas cepas bacterianas.

Tabla 4-9: Determinación de la CMI del extracto de *Equisetum giganteum* sobre *Pseudomonas aeruginosa*

Cepa bacteriana	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
	Pozos sin turbidez/ Diluciones			Control positivo
Pocillos/concentración	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	
				+
B5 (187.5 mg/ml)	+	+	+	+
B3 (375 mg/ml)	+	+	+	+
B1 (750 mg/ml)	+	-	-	+

Positivo (+), Negativo (-)

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

En la tabla 4-9 se presenta la CMI el extracto frente a la cepa bacteriana *Pseudomonas aeruginosa*, la misma que registró crecimiento bacteriano en el pocillo B5 y B3 en todas sus diluciones, para la concentración 750 mg/ml en la dilución 10^{-1} también se registró crecimiento bacteriano, pero para las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} no presentó crecimiento, siendo esta la concentración mínima que inhibe la cepa bacteriana.

Estos resultados concuerdan con el estudio de Queiroz et al. (2015), quienes también encontraron que las concentraciones más altas del extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum* presentaban propiedades inhibitoras frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

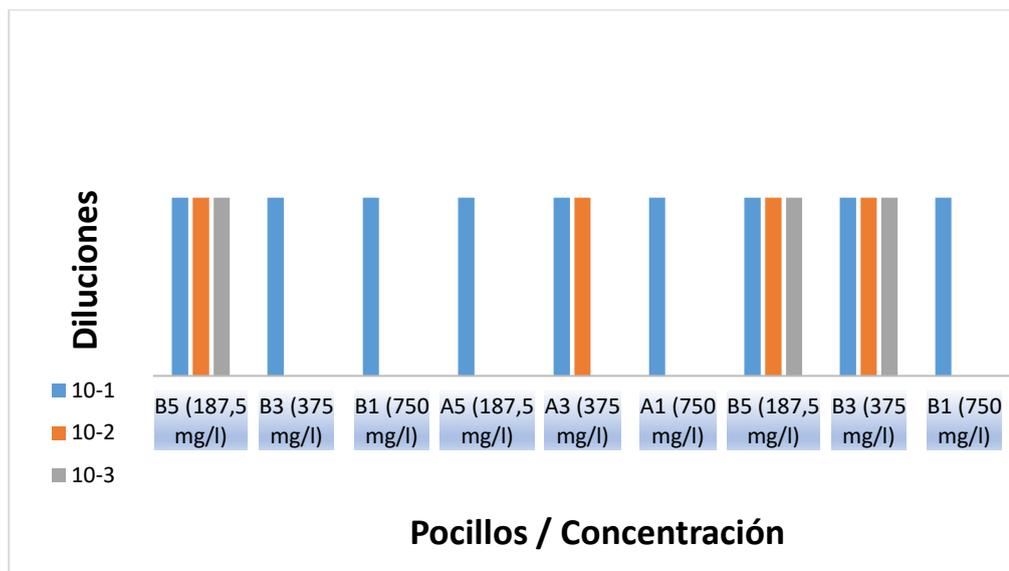


Ilustración 4-7: Crecimiento bacteriano (CMI)

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

La Ilustración 4-7, muestra el crecimiento bacteriano en los pocillos según las diluciones de las bacterias en estudio, las barras muestran en que pocillos y en qué concentraciones hubo crecimiento bacteriano.

4.3.5. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Se realizó el procedimiento según la técnica expuesta que se basa en establecer la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de las cepas bacterianas en estudio, se tomaron los distintos tubos de diluciones a diferentes concentraciones de los pocillos y se sembró en agar soya tripticaseina dejando en incubación por 18 horas a 37 °C para la posterior lectura de resultados.

4.3.5.1. Concentración Mínima Bactericida (CMB) del extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum* (Cola de Caballo).

Tabla 4-10: Determinación de la CMB del extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum* sobre *Enterococcus faecalis*

Cepa bacteriana	Pocillos/ concentración	Pozos sin turbidez UFC			Control positivo
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
<i>Enterococcus faecalis</i>	B5 (187.5 mg/l)	300	300	300	300
	B3 (375 mg/l)	1	0	0	300
	B1 (750 mg/l)	1	0	0	300

UFC (Unidades Formadoras de Colonias)

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

En la tabla 4-10 se presenta el análisis de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del extracto de *Equisetum giganteum* frente a *Enterococcus faecalis*. Registrando que en las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} del pocillo B5 donde la concentración del extracto es de (187.5 mg/l) se evidenció un crecimiento bacteriano, indicando una alta capacidad para formar colonias y, por lo tanto, una baja capacidad para inhibir el desarrollo bacteriano. Con este resultado se deduce que la concentración utilizada en el pocillo B5 para las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} no lograron ejercer un efecto bactericida sobre la cepa estudiada.

En contraparte las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} de los pocillos B3 y B1 presentaron una ausencia de desarrollo bacteriano, indicando que estas concentraciones específicas han alcanzado la Concentración Mínima Bactericida (CMB). En este contexto, estas diluciones específicas, 10^{-2} y 10^{-3} del pocillo B3, representan el umbral en el cual el extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum* logra ejercer un efecto bactericida eficiente sobre *Enterococcus faecalis*, inhibiendo su crecimiento total.

Tabla 4-11: Determinación de la CMB del extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum* sobre *Klebsiella pseudomoniae*

Cepa bacteriana	Pocillos/ concentración	Pozos sin turbidez UFC			Control positivo
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A5 (187.5 mg/l)	300	0	0	300
	A3 (375 mg/l)	30	4	0	300
	A1 (750 mg/l)	1	0	0	300

UFC (Unidades Formadoras de Colonias)

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

En la tabla 4-11 se muestra los resultados de la determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum* contra *Klebsiella pneumoniae*. Se observó que la concentración del pocillo A5 no logró inhibir el crecimiento bacteriano en las diluciones 10^{-1} , indicando que esta concentración era insuficiente para ejercer un efecto bactericida, este hecho queda confirmado por un considerable número de unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en las diluciones.

El pocillo A3 que contienen 375 mg/l muestran una notable reducción de desarrollo bacteriano en la mayoría de las diluciones, pero el pocillo A1 con una concentración de 750 mg/l logró un efecto bactericida, alcanzando la Concentración Mínima Bactericida (CMB) para *Klebsiella pneumoniae*, lo que significa que esta concentración es suficiente para inhibir completamente el crecimiento de la cepa bacteriana.

Tabla 4-12: Determinación de la CMB del extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum* sobre *Pseudomonas aeruginosa*

Cepa bacteriana	Pocillos/ concentración	Pozos sin turbidez UFC			Control positivo
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	B5 (187.5 mg/l)	300	300	300	300
	B3 (375 mg/l)	300	300	300	300
	B1 (750 mg/l)	2	0	0	300

UFC (Unidades Formadoras de Colonias)

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

Los resultados de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum* frente a *Pseudomonas aeruginosa* se muestran en la tabla 4-12, se divisa que en los pocillos B5 y B3, para las diluciones 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³; tienen un elevado número de unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en todas las diluciones, recalcando que estas concentraciones eran insuficientes para inhibir completamente el crecimiento de la cepa. Sin embargo, el pocillo B1 que perteneció a la concentración 750 mg/l, muestra una ausencia completa de desarrollo bacteriano, esto indica que la concentración utilizada en esta dilución ha alcanzado la Concentración Mínima Bactericida (CMB) para *Pseudomonas aeruginosa*. La dilución 10⁻¹ del pocillo B1 muestra un crecimiento mínimo, pero las diluciones subsiguientes (10⁻² y 10⁻³) han logrado inhibir eficazmente el crecimiento bacteriano.

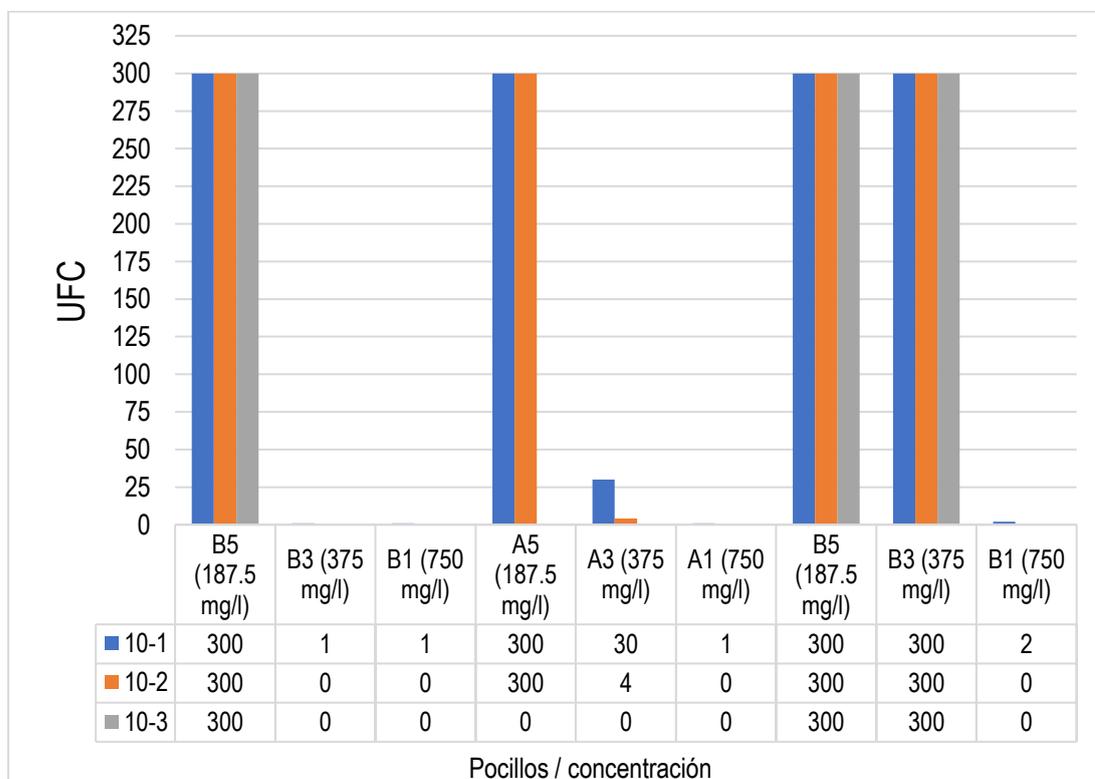


Ilustración 4-8: Comparación de las CMB de las cepas estudiadas.

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

La Ilustración 4-8 muestra los resultados que demuestran la capacidad que tiene el extracto de *Equisetum giganteum* para actuar como agente bactericida contra las cepas bacterianas en estudio, destacando su potencial aplicación en infecciones asociadas a cada cepa bacteriana estudiada en esta investigación. La determinación de la CMB ofreció información de gran validez para percibir cuales son las concentraciones adecuadas para lograr un efecto bactericida. Además, se muestra el crecimiento bacteriano considerado por el número de unidades formadoras de colonias (UFC) para cada concentración y diluciones de los diferentes pocillos.

4.3.6. Antibiograma (Método de Kirby Bauer)

La prueba de difusión en disco (también conocida como prueba de difusión en agar, prueba de Kirby-Bauer, prueba de susceptibilidad de los organismos patógenos a los antibióticos por difusión en disco, prueba de sensibilidad a los antibióticos por difusión en disco y prueba KB; es un ensayo de microbiología basado en cultivos que se utiliza en laboratorios de diagnóstico y descubrimiento de fármacos.

A continuación, se muestran los resultados de los antibiogramas realizados en el laboratorio, este estudio proporcionó información valiosa para determinar la eficacia de las diferentes concentraciones del extracto frente a las cepas bacterianas es estudio.

4.3.6.1. Antibiograma *Enterococcus faecalis*

Para este antibiograma se cultivó *Enterococcus faecalis* en agar Mueller-Hinton y se expuso a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico *Equisetum giganteum* empezando desde 3000 mg/ml hasta 187 mg/ml para la cual se realizaron 3 mediciones, también se la expuso a la Penicilina G que es un antibiótico muy potente contra esta bacteria según lo menciona (Treatment of *Enterococcus faecalis* infective endocarditis with penicillin G plus ceftriaxone , 2020)

Tabla 4-13: Antibiograma *Enterococcus faecalis*

CEPA	<i>Enterococcus faecalis</i>			
	HALO DE INHIBICIÓN (mm)			
Concentraciones del extracto hidroalcohólico (mg/ml)	N			X
	1	2	3	
3000 (mg/ml)	10,1	10,0	10,3	10,13
1500 (mg/ml)	9,0	9,6	10,0	9,53
750 (mg/ml)	8,4	9,0	8,5	8,63
375 (mg/ml)	8,2	8,7	8,1	8,33
187.5 (mg/ml)	-	-	-	-
Antibiótico (Penicilina G)	21,0	20,8	20,2	20,67

N: número de ensayos microbiológicos; X: promedio
Realizado por: Zhicay, I., 2023.

En la tabla 4-13 se presenta el antibiograma de *Enterococcus faecalis* en la cual se observa que a medida que la concentración del extracto disminuye, también disminuye el tamaño del halo de inhibición, con esto se dedujo que la capacidad que tiene el extracto para inhibir el crecimiento de la bacteria *E. faecalis* está estrechamente relacionada con la concentración que se usa. También se pudo visualizar que para la concentración 187.5 mg/ml no hubo halo de inhibición. En general se concluye que la acción microbicida del extracto de *E. giganteum* fue evidente por lo que se la cataloga como SENSIBLE, especialmente en las concentraciones de 3000 mg/ml y 1500 mg/ml, con halos de inhibición en el rango de 9.53 a 10.13 mm. Según Marques (2017) los halos de inhibición considerados para que un antimicrobiano sea eficaz deben superar los 9mm para inhibir el crecimiento bacteriano, aunque en este caso son menos efectivos que la penicilina G (PG) que presenta un halo promedio de 20.67 el cual está dentro del rango sugerido por (CLSI , 2018). La penicilina G es un antibiótico muy potente contra el *E. faecalis*, según (Treatment of Enterococcus faecalis infective endocarditis with penicillin G plus ceftriaxone , 2020) la PG es un régimen alternativo para *E. faecalis*, basado en su estudio retrospectivo que mostró pacientes sensibles a ampicilina/resistentes a penicilina G. En esta investigación describieron cuatro pacientes de *E. faecalis* que fueron tratados exitosamente con PG sin recurrencia en seis meses.

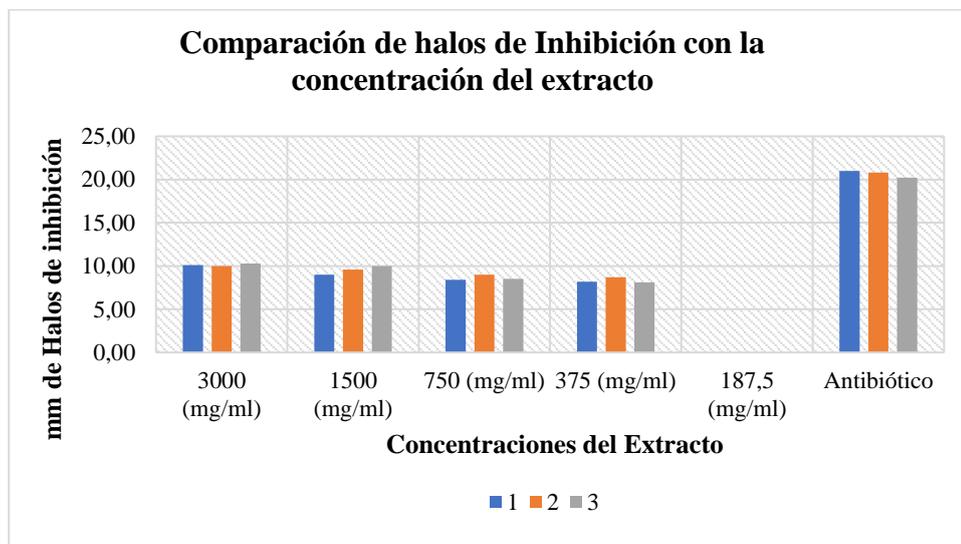


Ilustración 4-9: Comparación de halos de Inhibición del *Enterococcus faecalis*

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

En la ilustración 4-9 se expone los halos de inhibición medidos en mm contra el extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum*, que van desde 3000 mg/ml hasta 187.5 mg/ml, se puede observar que a medida que la concentración del extracto disminuye, también disminuye el tamaño del halo de inhibición, también se puede visualizar como el uso de la Penicilina G como antibiótico de referencia representa que los halos de inhibición sustancialmente mayores que los observados para el extracto hidroalcohólico en todas las concentraciones evaluadas, lo que indica

que la penicilina G tiene una mayor actividad antimicrobiana contra *E. faecalis* en comparación con el extracto de *Equisetum giganteum L.*

Como existió una estrecha relación entre los halos de inhibición y la concentración del extracto, se quiso establecer si en verdad existe una diferencia estadísticamente significativa en la media del extracto utilizada y el promedio de los halos de inhibición para lo cual se utilizó la técnica estadística ANOVA, que determinó si la varianza entre los grupos es mayor es decir los halos de inhibición depende de la concentración del extracto, o simplemente son datos que se deben al azar. Los valores que se analizó fueron el valor F y los grados de libertad que se utilizaron juntos para calcular el valor p; El valor p se utilizó para determinar si las diferencias entre los grupos se deben al azar o no, si este valor p es inferior al valor Alpha establecido que fue de $\alpha = 0,05$ resultando estadísticamente significativos, lo que significa que es poco probable que se deban al azar.

Tabla 4-14: ANOVA *Enterococcus faecalis*

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig. (p valor)
Concentraciones del extracto	Entre grupos	29,000	11	2,900	11,600	,015
	Dentro de grupos	1,000	4	,250		
	Total	30,000	14			

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

Para realizar esta prueba se estableció las siguientes hipótesis:

H0 ó hipótesis nula = No hay variación en los halos de inhibición del *Enterococcus faecalis* si cambiamos la concentración del extracto.

H1 ó la hipótesis experimental = Existe diferencias significativas en la utilización de la concentración del extracto y halos de inhibición del *E. faecalis*.

Mediante el análisis ANOVA realizado en el programa estadístico SPSS que se muestra en la tabla 4-14 se encontró diferencias estadísticamente significativas en concentraciones del extracto, con un tamaño de $F=11,60$, este valor tiene que ser mayor a 1 y la significancia menor a $\alpha= 0,05$, en este caso el p valor es de 0,015, por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa o experimental, es decir que si existen diferencias significativas en la utilización de la concentración del extracto y halos de inhibición del *E. faecalis*., esto significa que, al cambiar la concentración del extracto, también cambian los halos de inhibición.

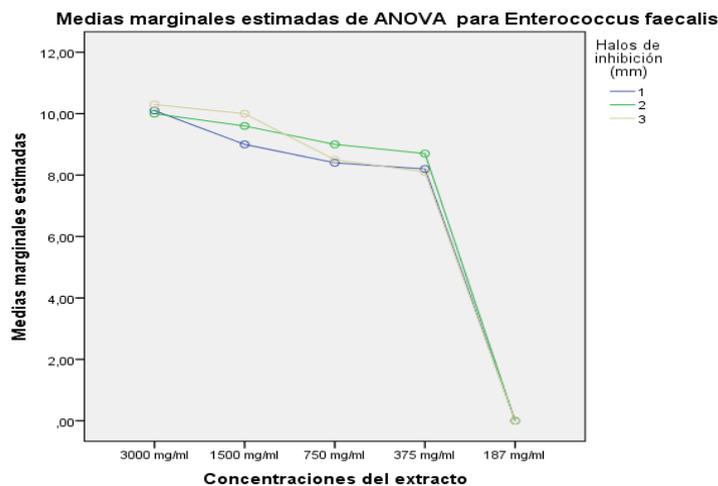


Ilustración 4-10: Comportamiento variables concentración del extracto y halos de inhibición en el *Enterococcus faecalis*

Realizado por: Zhicay, I. (2023)

La Ilustración 4-10 muestra como interaccionan las concentraciones del extracto a concentraciones de 3000 mg/ml, 1500 mg/ml, 750 mg/ml, 375 mg/ml y 187,5 mg/ml y los halos de inhibición medidos en las 3 repeticiones, todas las líneas se muestran hacia arriba es decir, si aumenta la concentración del extracto también aumentan los halos de inhibición lo que indica que existe una diferencia entre la eficacia antibacteriana contra la concentración del extracto hidroalcohólico del *E. giganteum*.

4.3.6.2. Antibiograma *Klebsiella pneumoniae*

Este antibiograma se lo realizó por triplicado con la bacteria *Klebsiella pneumoniae* expuesta a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico *E. giganteum* empezando desde 3000 mg/ml hasta 187 mg/ml, y un antibiótico potente contra esta bacteria como lo es la Ampicilina.

Tabla 4-15: Antibiograma *Klebsiella pneumoniae*

CEPA Concentraciones del extracto hidroalcohólico (mg/ml)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> HALOS DE INHIBICIÓN (mm)			
	N			X
	1	2	3	
3000 (mg/ml)	13,8	11,9	14,4	13,37
1500 (mg/ml)	12,4	12,6	14,3	13,10
750 (mg/ml)	10,0	10,5	12,9	11,13
375 (mg/ml)	8,6	9,9	10,4	9,63
187.5 (mg/ml)	-	-	-	
Antibiótico (Ampicilina)	19,4	19,2	19,6	19,40

N: número de ensayos microbiológicos; X: promedio

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

En la tabla 4-15 se muestra los resultados de los halos medidos en el antibiograma para *Klebsiella pneumoniae*, se pudo observar que a medida que la concentración del extracto disminuye, también disminuye el tamaño del halo de inhibición, concluyendo que la capacidad que tiene el extracto para inhibir el crecimiento de la bacteria *K. pneumoniae* está estrechamente relacionada con la concentración de extracto hidroalcohólico de *E. giganteum* que se usa. Además, se visualizó que no existe halo de inhibición para la concentración 187.5 mg/ml, es decir que ha concentraciones bajas el extracto no inhibe la bacteria. En general se concluye que la acción microbicida del extracto del *E. giganteum* fue indiscutible y se la cataloga como SENSIBLE, especialmente en las concentraciones de 3000 mg/ml y 1500 mg/ml, con halos de inhibición en el rango de 9,63 a 13,37 mm. Según (Lectura interpretada del antibiograma: una necesidad clínica, 2019) los halos de inhibición de la *K. pneumoniae* 10 mm para inhibir el crecimiento bacteriano, aunque son menos efectivos que la Ampicilina que presenta un halo promedio de 19,40 que está dentro del rango sugerido por (CLSI, 2018). La ampicilina es un antibiótico generalmente utilizado contra las enterobacterias como la *K. pneumoniae* Navarro et al. (2012) menciona que el uso indiscriminado de antibióticos está directamente relacionado con el aumento de la resistencia de los agentes infecciosos, resultando en altas tasas de morbimortalidad, un patrón generalmente observado en el antibiograma de la *K. pneumoniae* contra la ampicilina es la resistencia esto debido a que el mecanismo de resistencia a los betalactámicos y aminoglicósidos de las enterobacterias como el *K. pneumoniae* es el enzimático, por lo que tener unos halos de inhibición del extracto de hasta 14,4 comparado a la ampicilina de 19,6 es muy prometedor (Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias, 2012).

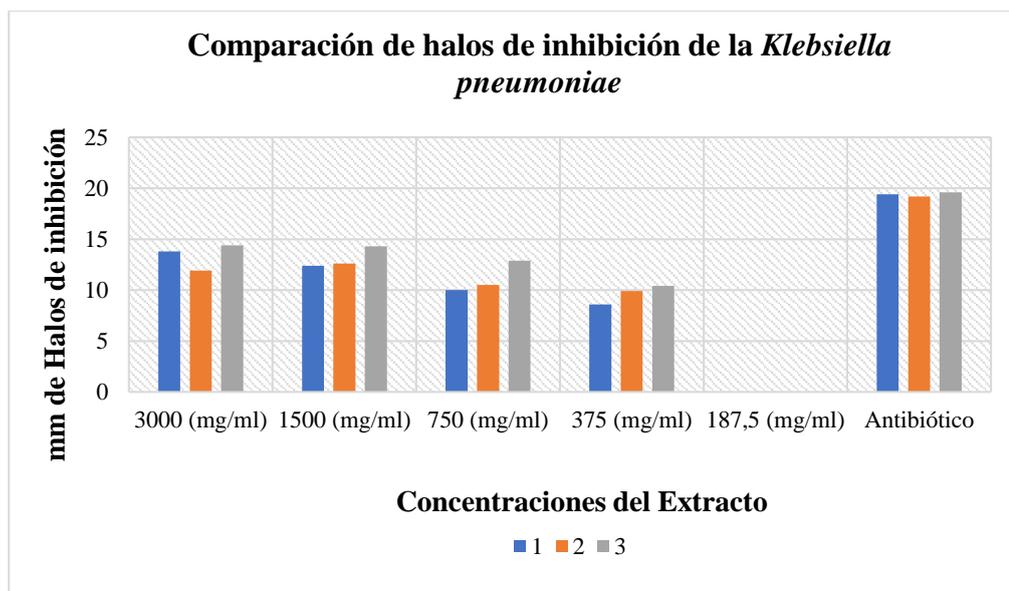


Ilustración 4-11: Comparación de halos de Inhibición del *Klebsiella pneumoniae*

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

En la ilustración 4-11 se expone los halos de inhibición medidos en mm contra el extracto

hidroalcohólico de *Equisetum giganteum*, que van desde 3000 mg/ml hasta 187.5 mg/ml, se puede observar que a medida que la concentración del extracto disminuye, también disminuye el tamaño del halo de inhibición, también se puede visualizar como el uso de la Ampicilina como antibiótico de referencia representa que los halos de inhibición próximos a los observados para el extracto hidroalcohólico en todas las concentraciones evaluadas, lo que indica que la Ampicilina tiene una mayor actividad antimicrobiana pero no muy lejana en comparación con el extracto de *Equisetum giganteum*.

Al existir una estrecha relación entre los halos de inhibición y la concentración del extracto, se estableció una interrogante ¿Existe una diferencia verdaderamente significativa en la media del extracto utilizada y el promedio de los halos de inhibición? Para despejar esta interrogante se utilizó la técnica estadística ANOVA, que determinó si la varianza entre los grupos es mayor es decir los halos de inhibición depende de la concentración del extracto, o simplemente son datos que se deben al azar.

Tabla 4-16: ANOVA *Klebsiella pneumoniae*

		Suma de cuadrados	gl	Cuadrados medios	F	Sig.
Concentraciones del extracto	Entre grupos	30,000	12	2,500	56,05	,035
	Dentro de grupos	,000	2	,000		
	Total	30,000	14			

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

Para realizar esta prueba se estableció las siguientes hipótesis:

H0 ó hipótesis nula = No hay variación en los halos de inhibición del *Klebsiella pneumoniae*, si cambiamos la concentración del extracto.

H1 ó la hipótesis experimental = Existe diferencias significativas en la utilización de la concentración del extracto y halos de inhibición del *Klebsiella pneumoniae*.

Los valores analizados fueron el valor F, los grados de libertad y el valor p; El valor p se utilizó para determinar si las diferencias entre los grupos se deben al azar o no, si este valor p es inferior al valor Alpha establecido que fue de $\alpha = 0,05$ se deduce que los resultados son estadísticamente significativos, lo que significa que es poco probable que se deban al azar.

Mediante el análisis ANOVA realizado en el programa estadístico Spss que se muestra en la tabla 4-16 se encontró diferencias estadísticamente significativas en concentraciones del extracto, con un tamaño de F=56,05, este valor tiene que ser mayor a 1 y la significancia menor a $\alpha = 0,05$, en este caso el p valor es de 0,035, por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa o experimental es decir que si existe diferencias significativas en la utilización de la

concentración del extracto y halos de inhibición del *Klebsiella pneumoniae*., esto significa que, al cambiar la concentración del extracto, también cambian los halos de inhibición.

La Ilustración 4-12 muestra como las concentraciones del extracto en el eje x con las fracciones de 3000 mg/ml, 1500 mg/ml, 750 mg/ml, 375 mg/ml y 187,5 mg/ml interaccionan con los halos de inhibición medidos en las 3 repeticiones, las líneas se muestran de forma ascendente lo que indica que si aumenta la concentración del extracto también aumenta los halos de inhibición es decir existe una diferencia entre la eficacia antibacteriana según la concentración del extracto hidroalcohólico de *E. giganteum* que se utilice.

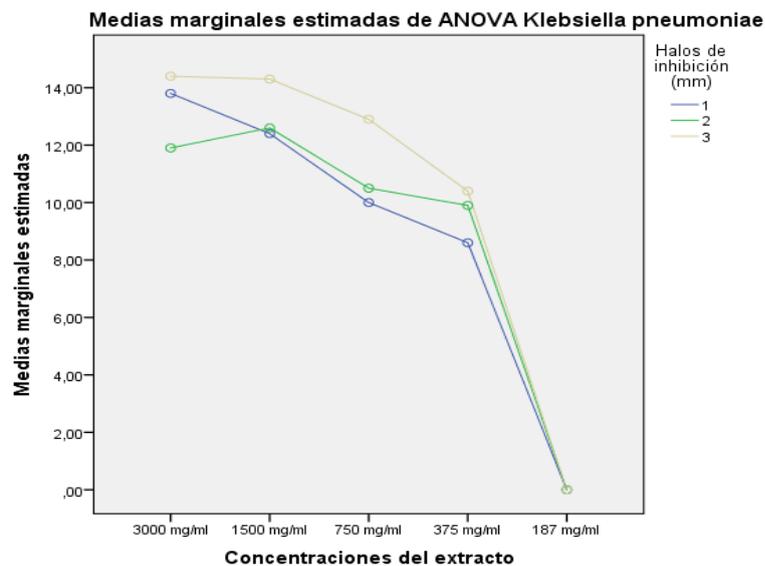


Ilustración 4-12: Comportamiento de las variables concentración del extracto y halos de inhibición en la *Klebsiella pneumoniae*

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

4.3.6.3. Antibiograma *Pseudomonas aeruginosa*

El antibiograma de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* se la realizó cultivando esta bacteria por triplicado y se la expuso a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico *Equisetum giganteum* empezando desde 3000 mg/ml hasta 187 mg/ml, el antibiótico utilizado fue la Ceftriaxona por ser una nueva cefalosporina comúnmente usada debido a su amplio espectro de actividad antimicrobiana contra esta bacteria según lo menciona (Estudio de sensibilidad de los bacilos gramnegativos a la ceftriaxona, 2018)

Tabla 4-17: Antibiograma *Pseudomonas aeruginosa*

CEPA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
Concentraciones del extracto hidroalcohólico (mg/ml)	HALOS DE INHIBICIÓN (mm)			
	N			X
	1	2	3	
3000 (mg/ml)	10,1	11,3	13,8	11,73
1500 (mg/ml)	10,0	10,8	11,4	10,73
750 (mg/ml)	8,7	10,0	8,5	9,06
375 (mg/ml)	8,2	8,2	8,3	8,23
187.5 (mg/ml)	-	-	-	
Antibiótico (Ceftriaxona)	20,4	19,0	20,3	19,9

N: número de ensayos microbiológicos; X: promedio

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

En la tabla 4-13 se exhibe el antibiograma de la *Pseudomonas aeruginosa* en la cual se observa que a medida que la concentración del extracto disminuye, también disminuye el tamaño del halo de inhibición, con estos hallazgos se pudo conjeturar que la capacidad que tiene el extracto para inhibir el crecimiento de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* está estrechamente relacionada con la concentración que se usa. También se pudo visualizar que para la concentración 187.5 mg/ml no hubo halo de inhibición. En general se concluye que la acción microbicida del extracto del *E. giganteum* fue evidente por lo que se la cataloga como MEDIANAMENTE SENSIBLE, especialmente en las concentraciones de 3000 mg/ml y 1500 mg/ml, con halos de inhibición en el rango de 10.73 a 11.73 mm. Según Tapia et al. (2014) los halos de inhibición considerados para que un antimicrobiano sea eficaz deben superar los 10mm para inhibir el crecimiento bacteriano, aunque son menos efectivos que la Ceftriaxona que presenta un halo promedio de 19,9 que está dentro del rango sugerido por (CLSI , 2018). Ceftriaxona es un antibiótico muy potente contra el *P. aeruginosa*, según Richards et al. (2014) La ceftriaxona es una nueva cefalosporina semi sintética de "tercera generación", tiene un amplio espectro de actividad contra bacterias aeróbicas Gram positivas y Gram negativas como la *P. aeruginosa* y algunas anaeróbicas, generalmente es más activo contra bacterias Gram-negativas que las cefalosporinas de "primera" y "segunda generación. (Ceftriaxone. A review of its antibacterial activity, pharmacological properties and therapeutic use, 2014)

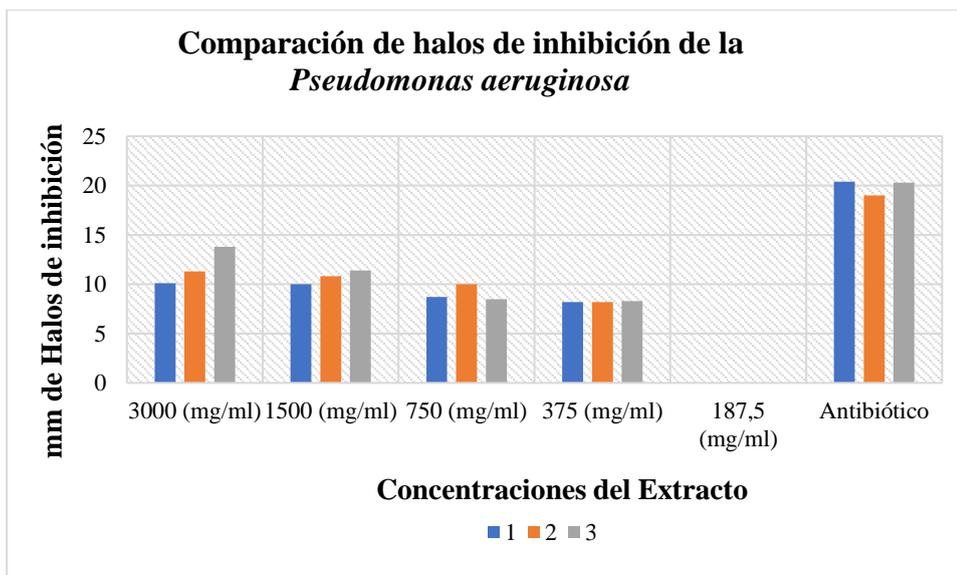


Ilustración 4-13: Comparación de halos de Inhibición del *Pseudomonas aeruginosa*

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

En la ilustración 4-13 se expone los halos de inhibición medidos en mm contra el extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum*, que van desde 3000 mg/ml hasta 187.5 mg/ml, se puede observar que a medida que la concentración del extracto disminuye, también disminuye el tamaño del halo de inhibición, también se puede visualizar como el uso de ceftriaxona como antibiótico de control representa halos de inhibición más grandes que los observados para el extracto hidroalcohólico en todas las concentraciones evaluadas, lo que indica que la ceftriaxona tiene una mayor actividad antimicrobiana contra la cepa ATCC de *P. aeruginosa*, en comparación con el extracto de *Equisetum giganteum*.

Como se notó una estrecha relación entre los halos de inhibición y la concentración del extracto, se estableció la pregunta ¿Existe una diferencia estadísticamente significativa en la media del extracto utilizada y el promedio de los halos de inhibición? para resolver esta interrogante se utilizó la técnica estadística ANOVA, que determina la varianza entre los grupos es decir comprueba si los halos de inhibición depende de la concentración del extracto, o simplemente son datos que se deben al azar, al igual que en los anteriores estudios el valor Alpha establecido fue de $\alpha = 0,05$, el cual nos servirá para establecer si los resultados son estadísticamente significativos, lo que significa que es poco probable que se deban al azar.

H0 ó hipótesis nula = No hay variación en los halos de inhibición del *P. aeruginosa*, si cambiamos la concentración del extracto.

H1 ó la hipótesis experimental = Existe diferencias significativas en la utilización de la concentración del extracto y halos de inhibición del *P. aeruginosa*,

Tabla 4-18: ANOVA *Pseudomonas aeruginosa*

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig. P valor
Concentraciones del extracto	Entre grupos	29,500	11	2,950	23,600	,004
	Dentro de grupos	,500	4	,125		
	Total	30,000	14			

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

Mediante el análisis ANOVA realizado en el programa estadístico SPSS que se muestra en la tabla 4-18 se encontró diferencias estadísticamente significativas en concentraciones del extracto, con un tamaño de $F=23,60$, este valor tiene que ser mayor a 1 y la significancia menor a $\alpha=0,05$, en este caso el p valor es de 0,004, por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa o experimental es decir que si existe diferencias significativas en la utilización de la concentración del extracto y halos de inhibición de la *P. aeruginosa*, esto significa que, al cambiar la concentración del extracto, también cambian los halos de inhibición, por lo tanto la inhibición de la bacteria depende de la concentración del extracto que se use.

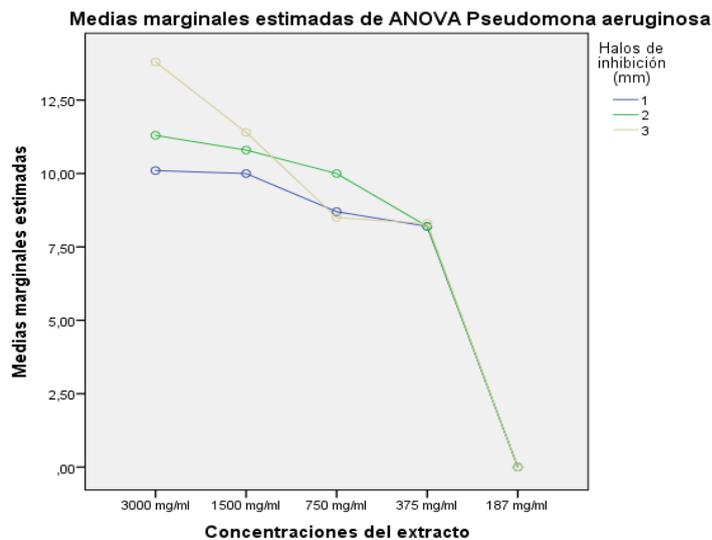


Ilustración 4-14: Comportamiento de las variables concentración del extracto y halos de inhibición en el *Pseudomonas aeruginosa*

Realizado por: Zhicay, I., 2023.

La Ilustración 4-14 muestra como interaccionan las concentraciones del extracto en el eje x sus niveles de 3000 mg/ml, 1500 mg/ml, 750 mg/ml, 375 mg/ml y 187,5 mg/ml y los halos de inhibición medidos en las 3 repeticiones, todas las líneas se muestran hacia arriba es decir si aumenta la concentración del extracto también aumenta los halos de inhibición lo que indica que existe una diferencia entre la eficacia antibacteriana según la concentración del extracto hidroalcohólico del *E. giganteum* que se utilice.

CONCLUSIONES

El estudio fitoquímico del extracto hidroalcohólico de *E. giganteum* reveló la presencia de flavonoides, cumarinas, alcaloides, y triterpenos, que constituyen un gran grupo de compuestos fenólicos, que son metabolitos secundarios producidos por las plantas, con conocidos beneficios en la defensa contra infecciones, enfermedades cardiovasculares, cáncer y otras, estos compuestos presentes en la composición de *E. giganteum* analizados en esta investigación son los constituyentes responsables de los efectos microbicidas observados, ya que tuvieron la capacidad de inactivar las adhesinas y las proteínas de transporte microbiano, así como de romper las membranas microbianas, demostradas en los estudios de la CMI y la CMB.

Como se expuso en los resultados, la mayoría de fracciones del extracto *E. giganteum* mostraron una actividad antimicrobiana significativa y fueron capaces de evitar el crecimiento de bacterias, las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana revelaron la capacidad del extracto de *Equisetum giganteum* L. para inhibir el crecimiento de las cepas ATCC de *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, y *Klebsiella pneumoniae*, los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias variaron según la fracción probada, donde la concentración del extracto de 750 mg/ml fue la más potente, y el valor de concentración más bajo capaz de inhibir el crecimiento de microorganismos (CMI) fue el de 375 mg/ml.

La prueba de difusión en disco Kirby Bauer realizada con el extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum* para inhibir *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* es evidente, catalogado según los antibiogramas como sensible y moderadamente sensible, pero su eficacia depende de la concentración utilizada, es decir a concentraciones más bajas como 750 mg/ml y 375 mg/ml, los halos de inhibición son más pequeños, sugiriendo una menor eficacia del extracto en estas concentraciones.

En general, basándose en los resultados obtenidos, se concluye que *E. giganteum* es un excelente antimicrobiano con gran potencial, en este estudio realizado contra las bacterias gram positivas como el *Enterococcus faecalis* y gram negativas como la *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* mostro actividad antimicrobiana ante estas cepas ATCC, mostrando una inhibición a las bacterias de acuerdo a la concentración del extracto utilizada, por lo que, estos hallazgos experimentales sugieren que el *Equisetum giganteum* L. administrado en dosis bajas no podría tener los efectos necesarios para inhibir el crecimiento de bacterias.

RECOMENDACIONES

El tratamiento de enfermedades infecciosas se está volviendo cada vez más desafiante debido al desarrollo de resistencia de las bacterias a múltiples clases de antibióticos. Por lo que se recomienda evaluar los metabolitos secundarios de importancia medicinal que incluyen alcaloides, flavonoides, taninos, terpenos y compuestos fenólicos de manera cuantitativa para establecer cuales se estos componentes activos poseen una actividad farmacológica eficaz.

Realizar una búsqueda de extractos naturales confiables que remplacen a los antibióticos comunes en infecciones graves que ocurren en huéspedes inmunocomprometidos utilizando disolventes de diferentes polaridades para comprobar si su eficacia se debe al uso del disolvente utilizado.

Evaluar la toxicidad que pueden tener los extractos vegetales de algunas plantas conocidas como nocivas utilizando células peritoneales de ratón.

Indagar sobre cepas ATCC resistentes a diferentes tipos de antibióticos que hoy en día se comercializan en el mercado frente a extractos naturales con el fin de garantizar la efectividad del extracto frente a cepas con resistencias y multirresistencias, para la posterior formulación de fármacos a base de extractos de plantas que tengan diferentes actividades farmacológicas con el objetivo de proporcionar a la sociedad una alternativa menos agresiva de tratamientos frente a diagnósticos médicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. **ALAVARCE, Rafaela; et al.** *The Beneficial Effect of Equisetum giganteum L. against Candida Biofilm Formation: New Approaches to Denture Stomatitis.* [En línea]. Hindawi Publishing Corporation, págs. 1-9. 2015. [Consulta: 2023-09-09] Disponible en: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2015/939625>
2. **ALGARATE, S.; et al.** *Efecto antibacteriano de Equisetum giganteum (cola de caballo), frente a Escherichia coli productora de betalactamasas de espectro extendido y Escherichia coli ATCC.* [En línea] I.S.S.N.: 1576-3080 : MEDICINA NATURISTA; Vol. 15 . N° 2, 2020. [Consulta: 2023-10-12]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/7998122.pdf>
3. **ALVES, Rafaela.** *Fitoterápico Equisetum giganteum e estomatite protética: estudo da ação antimicrobiana, antiaderente e anti-inflamatória contra Candida albicans, e potencial citotóxico sobre células epiteliais do palato humano.* [En línea]. Universidade de. São Paulo : Faculdade de Odontologia de Bauru, 2015. [Consulta: 2023-07-29] Disponible en: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/25/25150/tde-09092014-162243/pt-br.php>
4. **BEN, Jacob, Aharonov, Y y Shapira, Y** *Bacteria harnessing complexity.* [En línea]. Issue 04, 2004, Biofilms, Vol. Volume 1 , págs. pp 239 - 263. [Consulta: 2023-10-27] Disponible en: <https://doi.org/doi:10.1017/S1479050505001596>
5. **BOEING, Thaise, y otros.** *Phytochemistry and Pharmacology of the Genus Equisetum (Equisetaceae): A Narrative Review of the Species with Therapeutic Potential for Kidney Diseases.* [En línea]. Article ID 6658434, s.l. : Medicina Complementaria y Alternativa , vol. 2021, artículo ID 6658434, 17 páginas, 2021, Hindawi, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, págs. 1-17. [Consulta: 2023-08-12] Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2021/6658434>
6. **BOLEK, M.; et al.** *The role of damselflies (Odonata: Zygoptera) as paratenic hosts in the transmission of Halipegus eccentricus (Digenea: Hemiuridae) to anurans.* [En línea]. J Parasitol;96(4):724-35.PMID: 20738199, 2010. [Consulta: 2023-12-15] Disponible en: <https://doi.org/doi:10.1645/GE-2365.1>.
7. **BRATU, S.; et al.** *Rapid spread of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in New York City: A new threat to our antibiotic armamentarium.* [En línea]. Arch Intern Med, ; 165: 1430-1435., 2015. [Consulta: 2024-01-15] Disponible en: <https://doi.org/doi:10.1001/archinte.165.12.1430>

8. **CACERES, Katerin. 2018.** *Efecto antibacteriano in vitro del extracto de Equisetum arvense (Cola de caballo) sobre el Streptococcus mutans, Puno – 2018.* [En línea]. Puno – Perú : Universidad Nacional del Altiplano, 2018. Disponible en: https://tesis.unap.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14082/9628/Caceres_Lupaca_Katerin.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=Por%20tanto%20el%20extracto%20de,mayor%20ser%20C3%A1%20su%20efecto%20antibacteriano
9. **CAMBA, W., et al.** *Tamizaje fitoquímico, fenoles totales y actividad antioxidante de citrus aurantium.* [En línea]. 3, 2022, RECIAMUC, Vol. 6, págs. 470-479. [Consulta: 2024-01-11] Disponible en: [https://doi.org/https://doi.org/10.26820/reciamuc/6.\(3\).julio.2022.470-479](https://doi.org/https://doi.org/10.26820/reciamuc/6.(3).julio.2022.470-479)
10. **CANTÓN, Rafael.** *Lectura interpretada del antibiograma: una necesidad clínica.* [En línea]. 6, 2019, Enferm Infecc Microbiol Clin, Vol. 28, págs. 375-385. [Consulta: 2024-12-01] Disponible en: <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.eimc.2010.01.001>
11. **CANUT, A., et al.** *Métodos microbiológicos para la determinación in vitro de la actividad de combinaciones de antimicrobianos.* Madrid : SEIMC, 2020.
12. **CARDOZO, Carlos, et al.** *La Saponina, más que un desperdicio, una oportunidad de emprendimiento para la provincia de Uvate.* [En línea] Ciencias Administrativas Económicas y Contables. [En línea]. Universidad de Cundinamarca, 2020. Trabajo de grado. [Consulta: 2024-01-08] Disponible en: <https://repositorio.ucundinamarca.edu.co/handle/20.500.12558/4400>
13. **CARLSON, Jennifer & MATSUMOTO, Eiyu.** *Infectious Diseases.* [En línea]. Vol. 52, págs. 135-138. Disponible en: <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/23744235.2019.1672888>
14. **CARTAYA, Omar & REYNALDO, Inés.** *Flavonoides: Características químicas y aplicaciones.* [En línea]. 2, La Habana, Cuba : Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas , 2011, Cultivos Tropicales, Vol. 22, págs. 5-14. [Consulta: 2023-12-02] Disponible en: <https://doi.org/https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193215009001>
15. **CASTILLO, Ó., et al.** *Identificación de alcaloides en corteza de uncaria tomentosa y discusión sobre su potencial farmacológico.* [En línea] , 2021, InvestFarma, Vol. 1, págs. 1-7. [Consulta: 2024-03-12] Disponible en: <https://doi.org/https://www.unibe.ac.cr/ojs/index.php/InvestFarma/article/view/98/130>
16. **CHÁVEZ, Walter & RAMOS, Yohana.** *Efecto antibacteriano del extracto acuoso Equisetum Giganteum L. “Cola de Caballo”, frente a Staphylococcus Epidermidis ATCC N° 12228”.* [En línea]. Facultad de Ciencias de la Salud Escuela Profesional de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica. Huancayo, Perú : Universidad Roosevelt , 2021. Tesis de grado. Disponible en: <https://repositorio.uroosevelt.edu.pe/handle/20.500.14140/442>

17. **CLSI . 2018.** *Normas de funcionamiento para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos.* [En línea]. s.l. : Clinical and Laboratory Standards Institute, supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute., 2018.
18. **CLSI. 2014.** *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.* [En línea]. Twenty-Fourth Informational Supplement, CLSI document M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.
19. **CÓRDOVA, Ángel.** *Determinación del perfil de aminoácidos libres en órganos vegetativos de chile habanero (Capsicum chinense Jacq.) bajo distintas fuentes de nitrógeno y en frutos de diferente grado de desarrollo.* [En línea] Posgrado en ciencias biológicas. Mérida, Yucatán, México : Centro de investigación científica de Yucatán, 2021. Tesis de grado Maestro en Ciencias. Disponible en: <https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1003/2052>
20. **COSTA, J., et al.** *Actividad antimicrobiana de extractos de Equisetum giganteum L. contra bacterias multirresistentes.* [En línea] s.l. : Molecules, 25(16), 3594., 2020.
21. **DAGNINO, Jorge.** *Análisis de Varianza.* [En línea] 2014, Rev Chil Anest, Vol. 43, págs. 306-310. Disponible en: <https://doi.org/https://revistachilenadeanestesia.cl/PII/revchilanestv43n04.07.pdf>
22. **DEBENEDETTI, Silvia & STOLIAR, Carolina.** *Parámetros botánicos y cromatográficos para la monografía farmacopeica de “cola de caballo”, Equisetum Giganteum L.* [En línea] Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Belgrano. Buenos aires, Argentina : Universidad de Belgrano, 2017. Disponible en: <https://doi.org/DOI:10.13140/RG.2.1.3102.6807>
23. **DÍAZ, Marilyn, et al.** *Aspectos fundamentales sobre el género Enterococcus como patógeno de elevada importancia en la actualidad.* [En línea] s.l. : Revista Cubana de Higiene y Epidemiología, 48(2), 147-161., 2010. [Consulta: 2023-01-09] Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032010000200006&lng=es&tlng=es.
24. **ECHEVERRI, Lina & CATANO, Juan.** *Klebsiella pneumoniae como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia.* s.l. : Iatreia [En línea], vol.23, n.3, pp.240-249. ISSN 0121-0793, 2010.
25. **EUCAST & ESCMID.** *Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution.* [En línea] s.l. : Clin. Microbiol. Infect. 6 (2020) 509–515, 2020. Disponible en: DOI:<https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2000.00142.x>
26. **EVANS, W.** *Farmacognosia de Trease y Evans.* 16ª edición. Londres : WB Saunders Company Ltd;, 2018.

27. **FARIÑAS, M. & TORRES, C.** *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica. Enterococo ¿un patógeno emergente en nuestros hospitales?* [En línea] s.l. : Enferm Infecc Microbiol Clin ;25(4):500-2., 2007. [Consulta: 2023-12-23] Disponible en: <https://doi.org/DOI: 10.1157/13109985>
28. **FIGUEROA, Magdala.** *Actividad antiinflamatoria y antihistamínica de los triterpenos aislados de *Bursera cuneata*.* [En línea] Facultad de farmacia, Tesis doctoral. Cuernavaca : Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 2019. [Consulta: 2024-03-16] Disponible en: <http://riaa.uaem.mx/xmlui/handle/20.500.12055/2531>
29. **GUTIERREZ, Luis & SÁNCHEZ, José.** *Efecto Anticancerígeno De Extractos De *Equisetum Giganteum L.* “cola de caballo” en líneas celulares HeLa y HepG2, Arequipa – Boston, 2017 – 2018.* [En línea] Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas , Universidad Católica de Santa María. Arequipa – Perú : Universidad Católica de Santa María, 2018. pág. 21, Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico. [Consulta: 2024-01-25] Disponible en: <https://repositorio.ucsm.edu.pe/items/0d82a72c-3338-4076-bb3c-b2a88e203f4e>
30. **HERNÁNDEZ, Lida, et al.** *Estudio fitoquímico y actividad antimicrobiana de plantas medicinales empleadas para el control de infecciones urinarias.* [En línea] s.l. : Editorial Neogranadina, Rev. Fac. Cienc. Básicas, vol. 16, n.º 1., 2021. Disponible en: <https://doi.org/https://doi.org/10.18359/rfcb.4896>
31. **HERNANDEZ, Roberto.** *Metodología de la Investigación Científica.* México : Mc Graw Hill Education, 2017.
32. **HIKMATE, Abriouel, et al.** *La doble faceta del género *Enterococcus*, y su importancia en alimentos.* s.l. : Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental, 2008.
33. **HOLLENBECK, B & Rice, L.** *Mecanismos de resistencia intrínsecos y adquiridos en *Enterococcus* . .* s.l. : Virulencia; 3 : 421–433., 2012.
34. **HUAYTA, Mariela & CALSIN, Yudith.** *Actividad antimicrobiana “In vitro” del aceite esencial y extracto etanólico de *Equisetum arvense* “cola de caballo” frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans uropatógenas*.* [En línea] Puno, Perú : Universidad Nacional Del Altiplano, 2017. [Consulta: 2024-03-23] Disponible en: <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/5321>
35. **KUMAR, Vinay, et al.** *Robbins. Patología humana.* [En línea] 10ma. s.l. : Elseiver, 2018. Disponible en: https://www.academia.edu/45418404/Patologia_Robbins
36. **LEYVA, E., et al.** *Importancia química y biológica de las quinonas. Revisión bibliográfica.* [En línea] 577, 2017, Afinidad. Journal of Chemical Engineering Theoretical and Applied Chemistry., Vol. 74, págs. 36-50. [Consulta: 2024-04-08] Disponible en: <https://doi.org/https://raco.cat/index.php/afinidad/article/view/320755>.

- 37. LOBATON, D. & MÁRQUEZ, A.** *Estudio fitoquímico, antibacteriano, antifúngico y determinación de metabolitos secundarios mayoritarios por CG-EM del látex de la especie dioica Clusia multiflora Kunth (Clusiaceae).* [En línea] Facultad del Medio Ambiente y Recursos Naturales, Proyecto curricular Ingeniería Forestal. Bogotá, Colombia : Universidad Distrital Francisco José de Caldas , 2022. [Consulta: 2024-02-22] Disponible en: <https://doi.org/https://repository.udistrital.edu.co/bitstream/handle/11349/30132/LobatonDeisyKatherine2022.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- 38. MADIGAN, Michael, et al.** *Brock Biology of Microorganisms.* [En línea] 15th. s.l. : Pearson, 2018. ISBN: 9781292235103. [Consulta: 2024-03-07] Disponible en: https://doi.org/https://www.pearson.com/nl/en_NL/higher-education/subject-catalogue/biology/Brock-Biology-of-Microorganisms-Madigan.html
- 39. MARQUES, Jailma.** *Avaliação fitoquímica, microbiológica e citotóxica da Cavalinha (Equisetum arvense).* s.l. : Universidade Federal de Alagoas – UFAL, 2017.
- 40. MARSCHALL, J., et al.** *Gram-negative bacteraemia in non-ICU patients: factors associated with inadequate antibiotic therapy and impact on outcomes.* [En línea] s.l. : Antimicrob Chemother; 61: 1376-1383., 2018. Disponible en: <https://doi.org/DOI:10.1093/jac/dkn104>
- 41. MASYITA, Ayu, et al.** *Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives.* [En línea] 10, 2022, Food Chemistry, Vol. 13. [Consulta: 2024-02-12] Disponible en: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.10021>
- 42. MEDINA, Milagros.** *Determinación del efecto antimicrobiano in vitro del extracto de Equisetum Giganteum L. (Cola de caballo) sobre el crecimiento de Staphylococcus Aureus, Escherichia Coli y Candida Albicans.* [En línea] Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas y Biotecnológicas, Universidad Católica de Santa María. Arequipa – Perú : Universidad Católica De Santa María, 2016. Tesis de grado. [Consulta: 2024-01-11] Disponible en: <https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/5770>
- 43. MENDOZA, Paul & AGUIRRE, Diane.** *Efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroalcohólico de Equisetum giganteum L. (cola de caballo) frente a cepas de Salmonella enteritidis Y Shigella dysenteria.* [En línea] Escuela Profesional de Farmacia Y Bioquímica, Universidad maría Auxiliadora. Lima – Perú : Universidad maría Auxiliadora, 2022. [Consulta: 2024-02-14] Disponible en: <https://repositorio.uma.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12970/749/TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- 44. MONTALVÃO, Sofia, et al.** *Chapter 5 - Bioassays for Bioactivity Screening.* [En línea] s.l. : Elsevier, Volumen 65, ISBN 9780444633590,, 2014. págs. 79-114. [Consulta: 2024-03-12] Disponible en: <https://doi.org/doi.org/10.1016/B978-0-444-63359-0.00005-7>.

45. **MONTÚFAR, Franco, et al.** *Experiencia clínica con infecciones causadas por Klebsiella pneumoniae productora de carbapenemasa, en una institución de enseñanza universitaria en Medellín, Colombia.* [En línea] s.l. : Elsevier España, S.L.U., 2015. [Consulta: 2024-02-12] Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.infect.2015.07.003>
46. **NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE.** *Resource Sharing in Biomedical Research.* s.l. : The National Academy of Sciences, 2018.
47. **NAVARRO, Ferran, et al.** *Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias.* [En línea] 5, 2012, Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Vol. 20, págs. 225-234. Disponible en: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(02\)72796-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0213-005X(02)72796-1)
48. **OMS.** *Estadísticas de Salud.* [En línea] Ginebra, Suiza: : Organización Mundial de la Salud, 2012. [Consulta: 2024-02-14] Disponible en: <https://doi.org/10.1080/09505438809526230>
49. **ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.** *Resistencia a los antimicrobianos: informe mundial sobre vigilancia.* Ginebra : OMS, 2014.
50. **PAIBA, Jose & PÉREZ, Karina.** *Actividad antibacteriana de un jarabe elaborado con extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de Equisetum Giganteum L. (cola de caballo) frente a cepas clínicas de Staphylococcus aureus.* [En línea] Lima – Perú : Universidad Inca Garcilaso De La Vega, 2020. [Consulta: 2024-03-06] Disponible en: http://repositorio.uigv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.11818/4943/TESIS_PAIBA%20MARIN%20Y%20PEREZ%20MIRANDA.pdf?sequence=2&isAllowed=y
51. **PAZ, Victor, et al.** *Pseudomonas aeruginosa: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria.* [En línea] s.l. : Revista chilena de infectología, 36(2), 180-189., 2019. [Consulta: 2024-02-15] Disponible en: <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182019000200180>
52. **PLAZA, Pablo.** *¿Qué debemos saber sobre los animales silvestres vectores y reservorios de bacterias patógenas? Universidad Nac.* [En línea]. 2015, Grupo de Investigaciones en Biología de la Conservación, Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medio Ambiente (INIBIOMA),
53. **PELÁEZ, Y. & PEREDA, O.** *Estudio farmacognóstico de las ramas laterales de Equisetum giganteum L. “cola de caballo” proveniente del sector Chambuc provincia de Santiago de Chuco, región La Libertad.* [En línea] Trujillo- Perú : Universidad Nacional de Trujillo, 2018. Tesis de Farmacia. [Consulta: 2024-03-22] Disponible en: <https://dspace.unitru.edu.pe/items/bf783941-d2a9-4952-a8d5-50dbec28ea7d>
54. **QUEIROZ, Geisiany, et al.** *Phytochemical Characterization, Antimicrobial Activity, and Antioxidant Potential of Equisetum hyemale L. (Equisetaceae) Extracts.* [En línea] 7, s.l. : Epub, 2015, Journal of Medicinal Food, Vol. 18, págs. 830–834. Disponible en: <https://doi.org/10.1089/jmf.2014.0089>
55. **QIN, S., et al.** *Pseudomonas aeruginosa: Pathogenesis, virulence factors, antibiotic*

resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. [En línea] 1, 2022, Signal transduction and targeted therapy,, Vol. 7, págs. 189-199. [Consulta: 2024-04-02] Disponible en:<https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41392-022-01056-1>

56. **QUIÑONES, D, et al.** Susceptibilidad antimicrobiana y factores de virulencia en especies de *Enterococcus* causantes de infecciones pediátricas en Cuba. *Rev Cubana Med Trop* [En línea], 2008. [Consulta: 2024-03-04] Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602008000200004&lng=es
57. **RADULOVIĆ, Niko, et al.** *Composition and antimicrobial activity of Equisetum arvense L. Essential oil.* [En línea] 8, 2016, Phytotherapy research, Vol. 20, págs. 85-88. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/ptr.1815>
58. **RICHARDS, D., et al.** *Ceftriaxone. A review of its antibacterial activity, pharmacological properties and therapeutic use.* [En línea] 6, 2014, PubMed, Vol. 27, págs. 469-527. [Consulta: 2024-01-13] Disponible en: <https://doi.org/doi:10.2165/00003495-198427060-00001>
59. **RÍOS, J. & RECIO, M.** *Plantas medicinales y actividad antimicrobiana.* s.l. : Journal of Ethnopharmacology, 2005. 100(1-2), 80-84.
60. **RUIZ, Lidia.** *Pseudomonas aeruginosa: Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos.* [En línea] s.l. : Universidad de Barcelona, Unidad de Microbiología, Departamento de patología y terapéutica experimental, 2017. Disponible en: https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2521/LRM_TESIS.pdf?se
61. **RUIZ, Lidia.** *Resistencia a antimicrobianos y virulencia en cepas noclínicas.* [En línea] s.l. : Universidad de la Rioja, Facultad de Ciencia y Tecnología, 2018. [Consulta: 2024-01-16] Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/tesis/184761.pdf>
62. **RUSSOTTO, V., et al.** *Contaminación bacteriana de superficies inanimadas y equipos en la unidad de cuidados intensivos.* [En línea] s.l. : Cuidados Intensivos 3, 54., 2015. <https://doi.org/doi:10.1186/s40560-015-0120-5>
63. **RVSKVV.NET.** *Introduction to Bacteriology and Bacterial Structure/Function.* [En línea] s.l. : www.rvskvv.net, 2020. [Consulta: 2024-01-12] Disponible en: https://doi.org/https://www.rvskvv.net/images/INTRODUCTION-TO-BACTERIOLOGY_23.04.2020.pdf
64. **SALAS, José, et al.** *Estudio de sensibilidad de los bacilos gramnegativos a la ceftriaxona.* 3, [En línea] 2018, BINASSS.SA, Vol. 7, págs. 7-10. [Consulta: 2024-03-13] Disponible en: <https://doi.org/https://www.binasss.sa.cr/revistas/rccm/v7n3/art7.pdf>
65. **SALDANHA, Luiz, et al.** 25, 2015, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Vol. 2. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2015/939625>

66. **SÁNCHEZ, Ángeles, et al** *¿Qué son los microbios?* s.l. [En línea] : Ciencia; volumen 68; número 2 abril-junio de 2017. [Consulta: 2024-03-26] Disponible en: https://www.amc.edu.mx/revistaciencia/images/revista/68_2/PDF/QueSonMicrobios.pdf
67. **SENDER, Ron, et al.** *Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body.* PMID: 27541692; PMCID: PMC4991899., s.l. : PLoS Biol. ;14(8):e1002533, 2016, PLOS Biology, págs. 1-17. Disponible en: <https://doi.org/DOI:10.1371/journal.pbio.1002533>
68. **SOOD, R., et al.** *Capsular serotyping of Enterococcus faecalis: Isolation, characterization, and immunogenicity of capsular polysaccharide isolated from E. faecalis type 1.* . s.l. : Abstracts of the 98th General Meeting of the American Society for Microbiology. Washington D.C.: American Society for Microbiology; p. 238., 2008.
69. **SWAMINATHAN, M., et al.** *Prevalence and risk factors for acquisition of carbapenem resistant enterobacteriaceae in the setting of endemicity.* s.l. : Infect Control Hosp Epidemiol ; 34 (8): 809-817. , 2013.
70. **TAPIA, Joel, et al.** *Identificación y Antibiograma de Pseudomonas aeruginosa y Staphylococcus aureus en el Pabellón Infantil de Quemados del Hospital Viedma Agosto-2013.* [En línea] [Consulta: 2024-02-08] Disponible en: https://doi.org/http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1817-743320140001000062014.1, 2014, Revista Científica Ciencia Médica, Vol. 17, págs. 19-22.
71. **THE AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. ATCC.ORG.** *ATCC Bacteriology Culture Guide.* [En línea] 2020. Disponible en: <https://www.atcc.org/resources/culture-guides/bacteriology-culture-guide>. <https://www.atcc.org/resources/culture-guides/bacteriology-culture-guide>
72. **TORRES, Carmen, et al.** *Antimicrobial Resistance in Enterococcus spp. of animal origin.* [En línea] s.l. : Microbiol, Espectro ; 6 : 185–227., 2018, Microbiol Spectr. [Consulta: 2024-03-10] Disponible en: <https://doi.org/DOI:10.1128/microbiolspec.ARBA-0032-2018>
73. **Tortora, G.J., et al.** *Microbiology: An Introduction.* 13th. s.l. : Pearson, 2019. ISBN-13: 9780135789377. [En línea] [Consulta: 2024-01-24] Disponible en: <https://doi.org/https://www.pearson.com/en-us/subject-catalog/p/microbiology-an-introduction/P200000006850/9780135789377>
74. **TRUBIANO, JA. & Padiglione, A.** *Infecciones nosocomiales en la unidad de cuidados intensivos.* [En línea] . s.l. : Anest. Cuidados Intensivos 16, 598–602., 2015. [Consulta: 2024-03-14] Disponible en: <https://doi.org/doi:10.1016/j.mpaic.2015.09.010>
75. **VALDERRAMA, Mariano.** *Manual de Estadística Farmacéutica.* s.l. [En línea] : Universidad de Granada, 2021. [Consulta: 2024-03-17] Disponible en: <https://doi.org/https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/69366/Manual%20EF.pdf?sequence=1>

76. VALENCIA, Sebastian. *Síntesis de híbridos cumarina-chalcona y evaluación de la actividad antiparasitaria in vitro.* [En línea] Facultad de Ciencias, Tesis doctoral. Medellín, Colombia : Universidad Nacional de Colombia, 2023. [Consulta: 2024-01-01] Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/85629/1022097116.2024.pdf?sequence=5&isAllowed=y>



ANEXOS

ANEXO A: OBTENCIÓN DE LA MATERIA VEGETAL EN EL SECTOR LA FLORIDA, UBICADO EN LA PARROQUIA SAN MIGUEL DE CONCHAY, LIMÓN INDANZA- MORONA SANTIAGO



ANEXO B: PREPARACIÓN DE MATERIA VEGETAL PARA EL PROCESO DE SECADO



ANEXO C: PREPARACIÓN DE MATERIA VEGETAL PARA EL PROCESO DE PULVERIZACIÓN



ANEXO D: PREPARACIÓN DE LA MATERIA VEGETAL PARA EL PROCESO DE PERCOLACIÓN



ANEXO E: OBTENCIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *EQUISETUM GIGANTEUM* L. (COLA DE CABALLO)

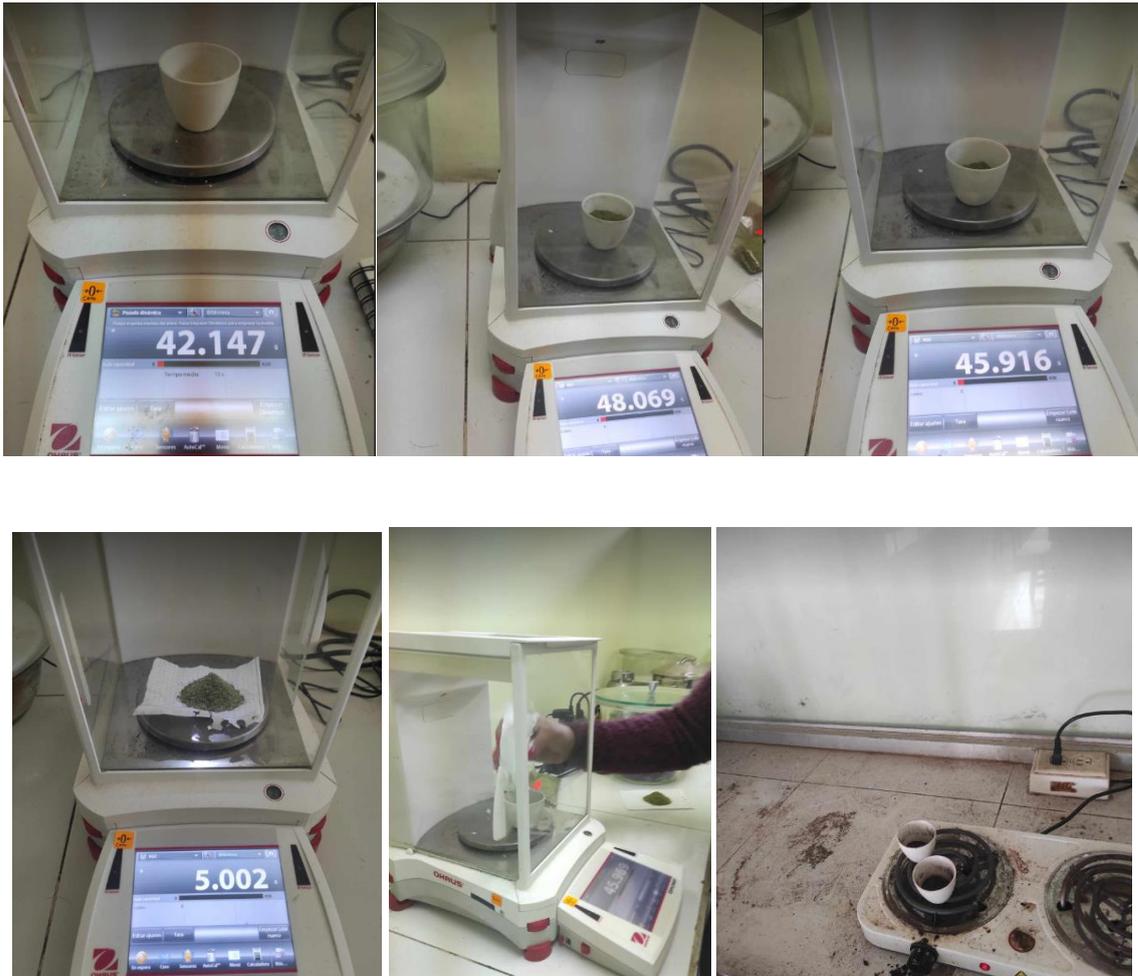


**ANEXO F: RESULTADOS DE CONTROL DE CALIDAD DE LA MATERIA VEGETAL,
DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD Y CENIZAS
TOTALES**

DETERMINACIÓN HUMEDAD

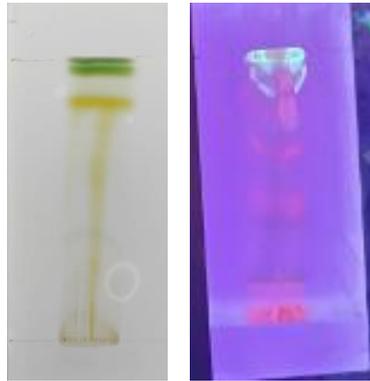


DETERMINACIÓN CENIZAS



**ANEXO G: RESULTADOS DE LA CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DEL EXTRACTO
HIDROALCOHÓLICO DE *EQUISETUM GIGANTEUM* L. (COLA DE
CABALLO)**

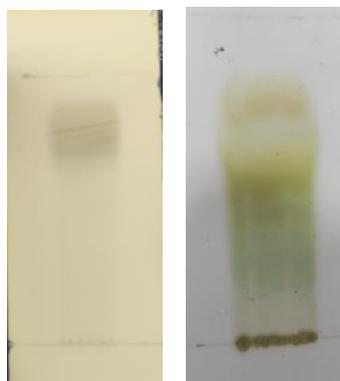
Identificación de terpenos



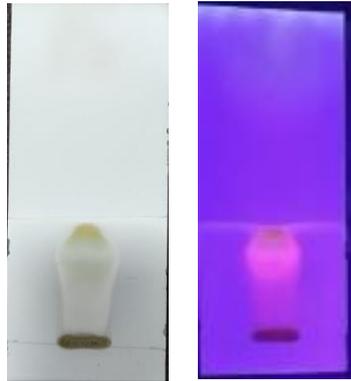
Identificación de flavonoides



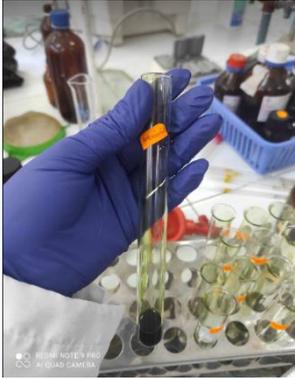
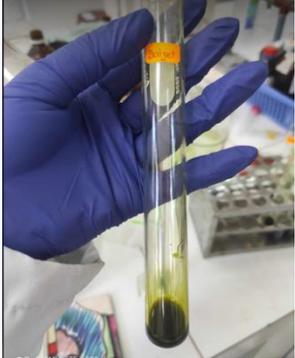
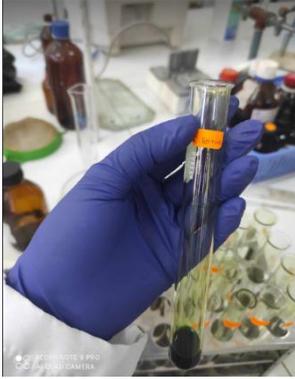
Identificación de taninos



Identificación de alcaloides



**ANEXO H: RESULTADOS DEL TAMIZAJE DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE
EQUISETUM GIGANTEUM L. (COLA DE CABALLO)**

TAMIZAJE FITOQUÍMICO	
PRUEBAS QUÍMICAS POSITIVAS	
IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES	
<p>Shinoda</p>  <p>Amarillo, naranja, carmelita o rojo</p>	<p>Antocianinas</p>  <p>Rojo a marrón</p>
IDENTIFICACIÓN DE CUMARINAS	
<p>Baljet</p>  <p>Color rojo</p>	
IDENTIFICACIÓN DE FENOLES	
<p>Cloruro férrico</p>  <p>Rojo- vino</p>	

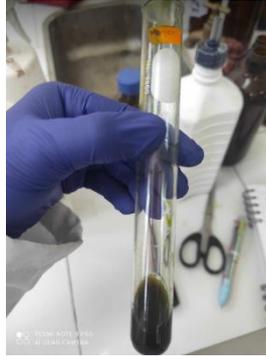
IDENTIFICACIÓN ALCALOIDES

Dragendorff



Opalescencia

Mayer



Turbidez definida

Wagner



Precipitado

IDENTIFICACIÓN TRITERPENOS O ESTEROLES

Liebermann-Burchard



Violeta, verded o azul

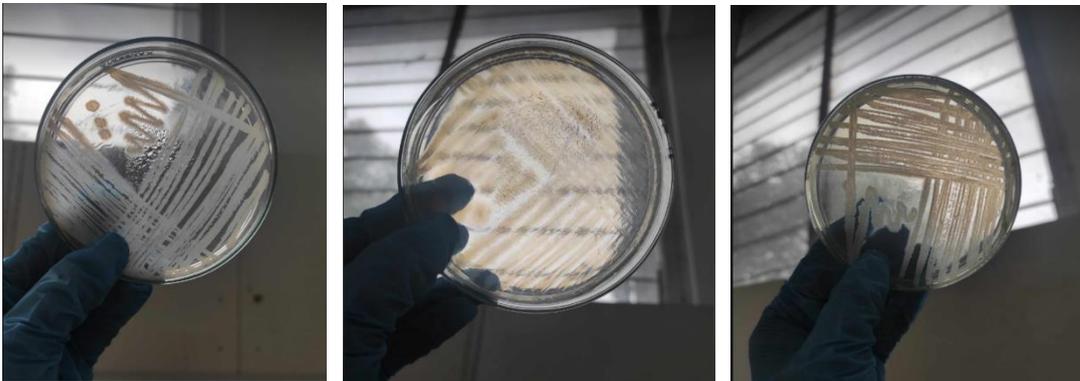
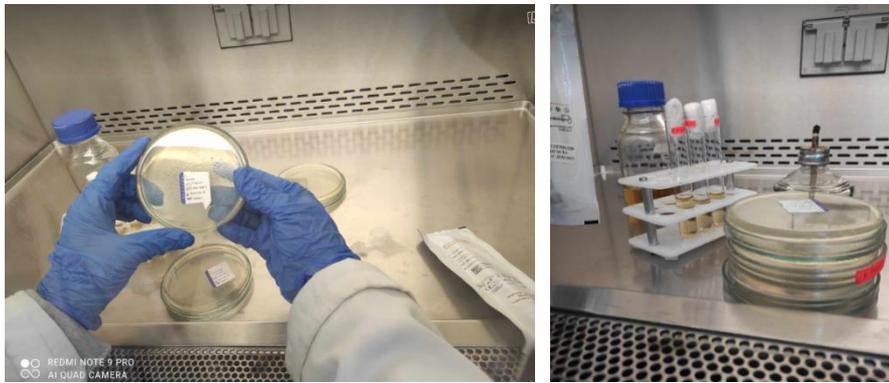
IDENTIFICACIÓN DE RESINAS

Resinas



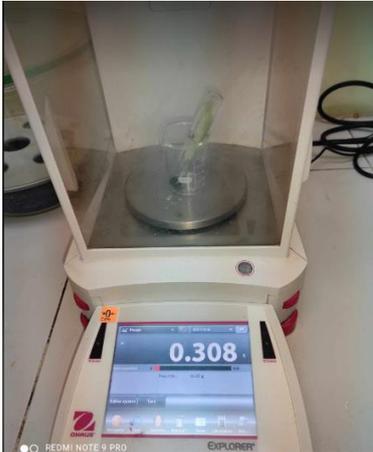
Precipitado

ANEXO I: ACTIVACIÓN DE CEPAS ATCC *ENTEROCOCCUS FAECALIS*, *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*.



ANEXO J: RESULTADOS DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA DEL EXTRACTO *EQUISETUM GIGANTEUM L.* (COLA DE CABALLO)

PREPARACIÓN DEL EXTRACTO



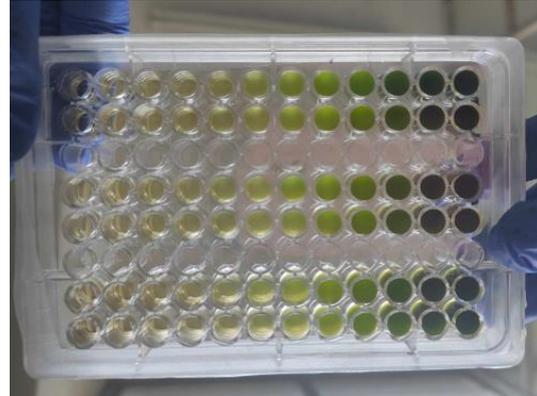
ESCALA MAC FARLAND



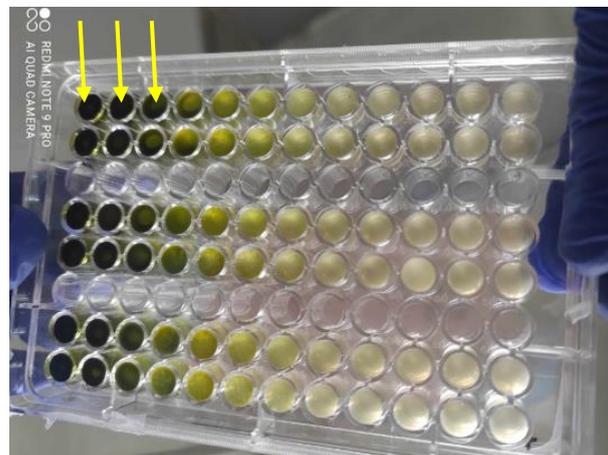
PREPARACIÓN DE DILUCIONES



PREPARACIÓN EN LOS POCILLOS



RESULTADOS POCILLOS SIN TURBIDEZ

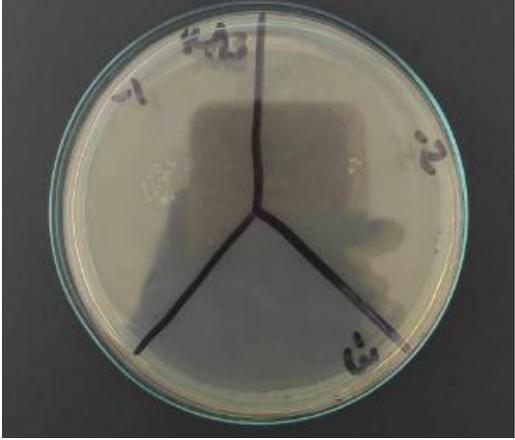
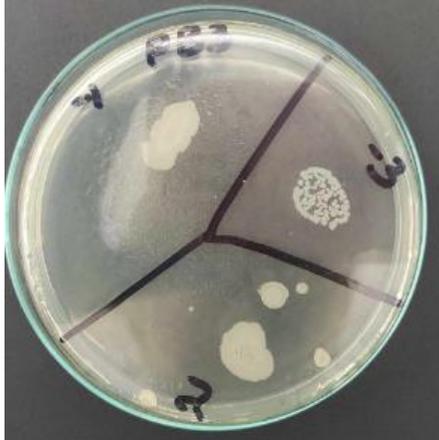


CONTROLES POSITIVOS

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
		
<p>10⁻¹=300 (Incontable) 10⁻²=300 10⁻³=300</p>	<p>10⁻¹=300 (Incontable) 10⁻²=300 10⁻³=300</p>	<p>10⁻¹=300 (Incontable) 10⁻²=300 10⁻³=300</p>

CONCENTRACIÓN MINIMA BACTERICIDA DEL EXTRACTO *EQUISETUM GIGANTEUM L.* (COLA DE CABALLO)

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
POCILLO CONCENTRACION (187.5 mg/ml)		
		
<p>10⁻¹=300 (Incontable) 10⁻²=0 10⁻³=0</p>	<p>10⁻¹=300 (Incontable) 10⁻²=300 10⁻³=300</p>	<p>10⁻¹=300 (Incontable) 10⁻²=300 10⁻³=300</p>

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
POCILLO CONCENTRACION (375 mg/ml)		
		
$10^{-1}=30$ $10^{-2}=4$ $10^{-3}=0$	$10^{-1}=300$ (Incontable) $10^{-2}=300$ $10^{-3}=300$	$10^{-1}= 1$ $10^{-2}=0$ $10^{-3}=0$

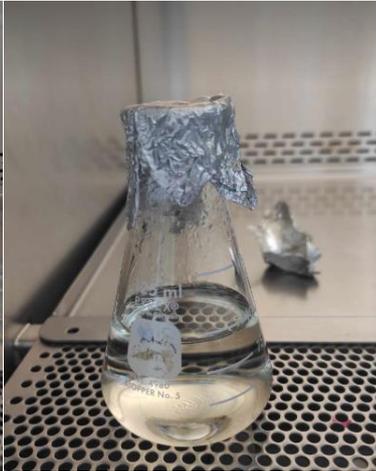
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
POCILLO CONCENTRACION (750 mg/ml)		
		
$10^{-1}=1$ $10^{-2}=0$ $10^{-3}=0$	$10^{-1}=2$ $10^{-2}=0$ $10^{-3}=0$	$10^{-1}=1$ $10^{-2}=0$ $10^{-3}=0$

ANEXO K: RESULTADOS ANTIBIOGRAMA EN CONCENTRACIONES 3000, 1500, 750, 350 Y 187.5 (MG/ML) DEL EXTRACTO *EQUISETUM GIGANTEUM L.* (COLA DE CABALLO)

AGAR Müller-Hinton



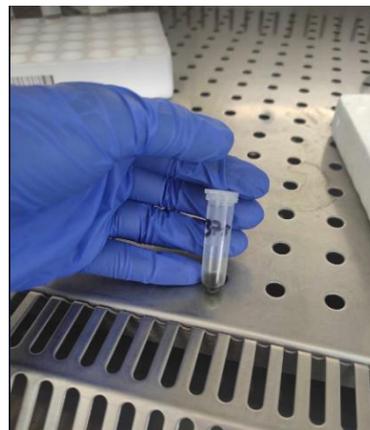
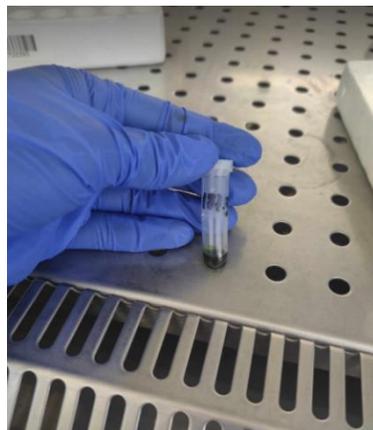
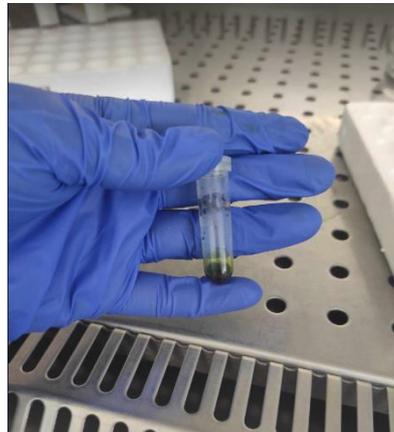
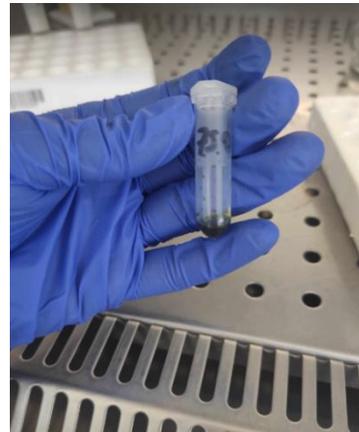
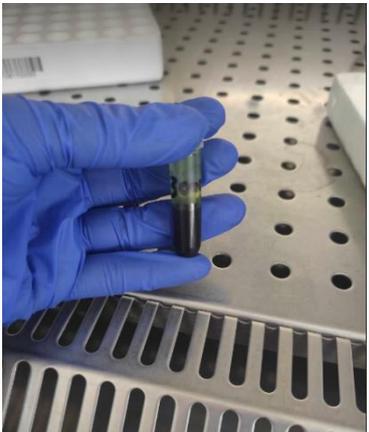
AGUA DE PEPTONA



DILUCIONES



PREPARACIÓN DE LAS
CONCENTRACIONES DEL
EXTRACTO



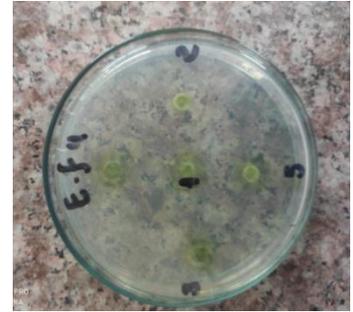
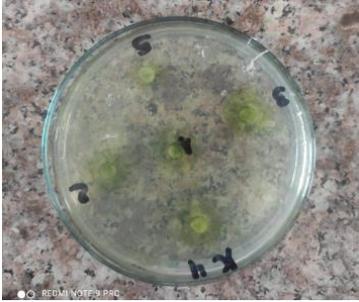
RESULTADOS ANTIBIOGRAMA

Klebsiella pneumoniae

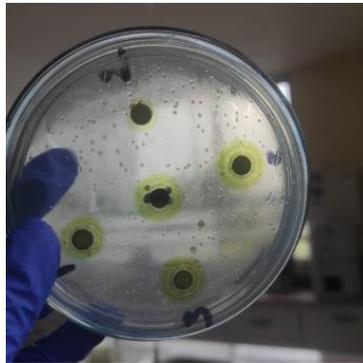
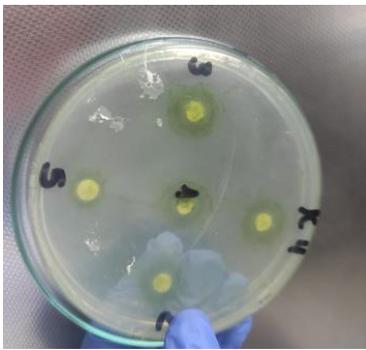
Pseudomonas aeruginosa

Enterococcus faecalis

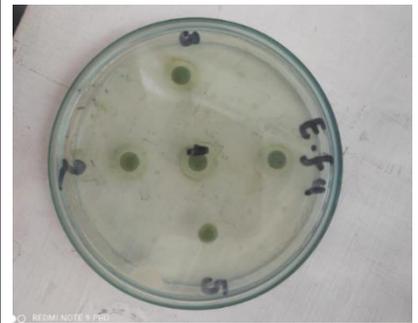
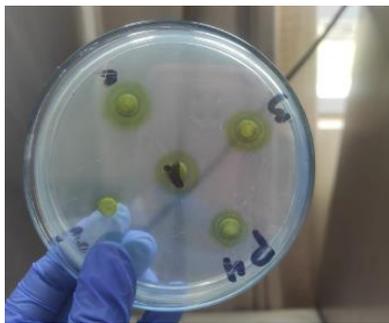
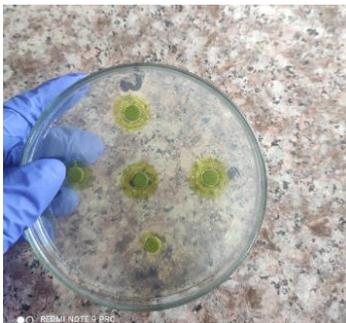
PRIMERA REPETICIÓN



SEGUNDA REPETICIÓN



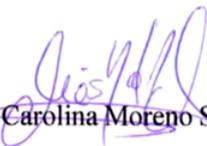
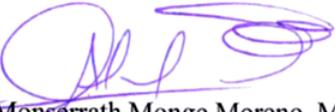
TERCERA REPETICIÓN





ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
CERTIFICADO DE CUMPLIMIENTO DE LA GUÍA PARA
NORMALIZACIÓN DE TRABAJOS DE FIN DE GRADO

Fecha de entrega:03/07/2024

INFORMACIÓN DEL AUTOR
Nombres – Apellidos: Itaty Thalia Zhicay Orellana
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias
Carrera: Bioquímica y Farmacia
Título a optar: Bioquímica Farmacéutica
<p style="text-align: center;"> BQ.CI. Mishell Carolina Moreno Samaniego, MSc Directora del Trabajo de Integración Curricular</p> <p style="text-align: center;"> Dra. Adriana Monserrath Monge Moreno, MSc Asesora del Trabajo de Integración Curricular</p>