

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONOR ORREGO
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA



TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE CIRUJANO DENTISTA

**EFEECTO ANTIBACTERIANO Y ANTIFÚNGICO *IN VITRO* DEL EXTRACTO
ETANÓLICO DE *NASTURTIUM OFFICINALE* (BERRO) SOBRE *ENTEROCOCCUS
FAECALIS* Y *CÁNDIDA ALBICANS***

AUTORA

MARTÍNEZ RUIZ VIELKA YANNELA

ASESOR:

GONZÁLEZ CABEZA JOSÉ GUILLERMO

Trujillo – Perú

2020

DEDICATORIA

A Dios por concederme un nuevo amanecer cada día y permitirme llegar hasta aquí.

A Julio y Martha, mis padres, por brindarme su amor incondicional, apoyo infinito, por inculcarme buenos valores, por ser mi fortaleza en todo momento y por enseñarme a persistir en lo que me proponga.

A Denilson, mi hermano menor, por creer en mí y alentarme a seguir mejorando.

A mis abuelas Santos y Elsa, por su apoyo incondicional y cariño hacia mi persona.

A mis abuelos Guillermo y Felipe, por sus sabios consejos y motivación, quienes ya no estarán físicamente conmigo, pero los llevo siempre en mi mente y corazón.

A toda mi familia en general por alegrarse de cada logro de mi vida.

A mis lindas amistades que me apoyaron en todo momento.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. José Guillermo González Cabeza, docente de la escuela profesional de Estomatología de la Universidad Privada Antenor Orrego, asesor de la presente tesis, por su constante orientación y apoyo para que sea posible el desarrollo y culminación de esta investigación.

A los docentes de la Escuela profesional de Estomatología de la Universidad Privada Antenor Orrego por brindarme sus conocimientos, experiencias y motivación durante mi formación profesional.

Al personal de Laboratorio de Microbiología, por su colaboración y disposición de tiempo durante la ejecución del presente proyecto.

RESUMEN

Objetivo: Determinar el efecto antibacteriano y antifúngico *in vitro* del extracto etanólico de *Nasturtium officinale* sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ y *Cándida albicans* ATCC 10231™.

Material y Método: Se trabajó con las concentraciones de 20%, 40%, 60%, 80% y 100% de extracto etanólico de *Nasturtium officinale*. Como controles positivos se incluyó a la Clorhexidina para el *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ y la Nistatina para la *Candida albicans* ATCC 10231™. Se usó placas con Agar Muller – Hinton para *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ y Agar Dextrosa Sabouraud para *Candida albicans* ATCC 10231™. Para evaluar el efecto antibacteriano y antifúngico se empleó el método de pozos en agar. La lectura de las placas se realizó a las 24 horas a través de la inspección visual. Las medidas de los halos de inhibición del crecimiento del microorganismo fueron tomadas en milímetros empleando un calibrador vernier.

Resultados: Los promedios del halo de inhibición de crecimiento de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ fue de 22.17 mm (20%), 23.08 mm (40%), 26.33 mm (60%), 28.58 mm (80%), 28.92 mm (100%) y de la clorhexidina fue de 23 mm.

Los promedios del halo de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* ATCC 10231™ fue de 10 mm (20%), 10.17 mm (40%), 10.33 mm (60%), 10.42 mm (80%), 13.92 mm (100%) y de la Nistatina fue de 19 mm.

Conclusiones: El extracto etanólico de *Nasturtium officinale* tiene efecto antibacteriano y antifúngico *in vitro* sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ y *Cándida albicans* ATCC 10231™

PALABRAS CLAVE: *Nasturtium officinale*, berro, antibacteriano, antifúngico, *Cándida albicans*, *Enterococcus faecalis*.

ABSTRACT

Objective: To determine the antibacterial and antifungal effect *in vitro* of the ethanolic extract of *Nasturtium officinale* on *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*.

Material and Method: The concentrations of 20%, 40%, 60%, 80% and 100% of ethanolic extract of *Nasturtium officinale* were used. As positive controls Chlorhexidine for *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM and Nystatin for *Candida albicans* ATCC 10231TM were included. Plates were used with Muller-Hinton Agar for *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM and Dextrose Sabouraud Agar for *Candida albicans* ATCC 10231TM. To evaluate the antibacterial and antifungal effect, the agar wells method was used. The reading was carried out at 24 hours by visual inspection of each plate. The measurement was carried out by taking the recording in millimeters of the growth inhibition halos of the microorganism with a vernier caliper.

Results: The mean diameter of the growth inhibition halo of *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM was 22.17 mm (20%), 23.08 mm (40%), 26.33 mm (60%), 28.58 mm (80%), 28.92 mm (100%) and chlorhexidine was 23 mm.

The mean diameter of the growth inhibition halo of *Candida albicans* ATCC 10231TM was 10 mm (20%), 10.17 mm (40%), 10.33 mm (60%), 10.42 mm (80%), 13.92 mm (100%) and Nystatin was 19 mm.

Conclusions: The ethanolic extract of *Nasturtium officinale* has antibacterial and antifungal effect *in vitro* on *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM and *Candida albicans* ATCC 10231TM

KEY WORDS: *Nasturtium officinale*, watercress, antibacterial, antifungal, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	8
1.1.	Realidad problemática	8
1.2.	Marco teórico:	9
1.3.	Antecedentes.....	12
1.4.	Justificación y propósito.....	14
1.5.	Formulación del problema	15
1.6.	Hipótesis de investigación.....	15
1.7.	Objetivo(s). General y específicos	16
1.7.1.	Objetivo General.....	16
1.7.2.	Objetivos Específicos	16
1.8.	Variables.....	17
II.	METODOLOGÍA	17
2.1.	Tipo de investigación.....	17
2.3.	Población y Muestra.....	18
2.4.	Técnicas e instrumentos de investigación	19
2.5.	Diseño de investigación	24
2.6.	Procesamiento y análisis de datos	27
2.7.	Principios bioéticos.....	27
III.	RESULTADOS	28
IV.	DISCUSIÓN	35
V.	CONCLUSIONES	38
VI.	RECOMENDACIONES	38
VII.	REFERENCIAS	39
VIII.	ANEXOS	45

ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS

Tabla 01	31
Tabla 02	31
Tabla 03	32
Gráfico 01	32
Tabla 04	33
Tabla 05	33
Tabla 06	34
Gráfico 02	34

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Realidad problemática

En la cavidad oral la flora bacteriana se establece de forma progresiva desde el nacimiento del ser humano. Se han identificado alrededor de 700 especies bacterianas alojadas en diversas superficies de la cavidad oral.¹ Algunas están asociadas con el desarrollo de enfermedades bucales, la más prevalente es la caries dental.² Una opción para tratar dientes ampliamente destruidos por caries es la endodoncia, pero hay posibilidad de fracaso del tratamiento debido a la persistencia de agentes bacterianos alojados en los conductos del diente. *El Enterococcus faecalis (E. faecalis)* es una de las especies bacterianas que presenta farmacorresistencia.³

A su vez, la cavidad bucal constituye un ambiente favorable para la colonización de microorganismos oportunistas como los hongos del género *Candida*, principalmente *Candida albicans (C. albicans)*.⁴ Se considera la causante de la mayoría de infecciones micóticas, se dice que cuatro de cada mil pacientes que acuden a consulta dental presentan síntomas de infección candidiásica.^{5,6} Además este hongo posee resistencia a diversas sustancias antifúngicas.⁷

Debido a la resistencia antimicrobiana en los últimos años existe un gran interés en el uso de plantas medicinales como nuevas fuentes de agentes antimicrobianos, que a través de sus extractos evidencien la capacidad de inhibir su crecimiento.⁸⁻¹⁰ Por lo que su uso, adicionalmente este aportando vitaminas y reduciendo los efectos tóxicos de los fármacos convencionales.^{11,12}

1.2. Marco teórico:

Nasturtium officinale (*N. officinale*), comúnmente llamado berro, es una planta herbácea perenne que generalmente crece en lugares húmedos.¹³ Pertenece la familia de las crucíferas al igual que la coliflor, brócoli, nabo, repollo, entre otras.^{14,15} Se encuentra principalmente en Europa, América y Asia.¹⁶

El berro posee un tallo de hasta 80 cm de altura y hojas de color verde claro acorazonadas, con flores de color blanco en forma de racimo.¹⁷ Sus frutos son cilindros delgados, ligeramente curvados y contienen cuatro hileras de semillas pequeñas y redondas, esta planta tiene un sabor picante.¹⁸

Esta planta contiene una gran cantidad de vitaminas (A, B1, B2, B3, C, E, K), ácido fólico, proteínas y minerales (Calcio, hierro, yodo, fósforo, cobre, azufre).^{16,19} Es generalmente usado como medicina tradicional para tratar la hiperglucemia, hiperlipidemia, enfermedades cardiovasculares y pulmonares.^{20,21} Se le atribuye propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes, cicatrizantes y diuréticas.^{22,23}

Entre los metabolitos secundarios de la planta, se encuentran los compuestos fenólicos y glucosinolatos. Entre los compuestos fenólicos resaltan: ácido clorogénico, quercetina-3-O-rutinósido, ácido dicafeoil tartárico e isoramnetina. Los glucosinolatos están compuestas por gluconasturtina y el isotiocianato de fenetilo. De los cuales tanto la quercetina-3-O-rutinósido y el isotiocianato de fenetilo le proporciona propiedades antimicrobianas.²⁴

Dentro de las causas principales de los tratamientos endodónticos fallidos es la remoción insuficiente de tejido pulpar y/o de los microorganismos existentes en los canales radiculares, especialmente del *E. faecalis*.²⁵

E. faecalis es un coco Gram positivo, no esporulado y anaerobio facultativo.^{1,2} Su hábitat es el tracto gastrointestinal, pero también se encuentra en la mucosa oral, lengua, bolsas periodontales y conductos radiculares.²⁶

Este microorganismo es muy frecuente en procesos infecciosos bucales entre ellos la necrosis pulpar, periodontitis apicales y conductos exteriorizados a cavidad bucal.²⁷

Esta bacteria tiene la capacidad de poder vivir y multiplicarse en medios que son inhabitables para diversas bacterias y en donde los nutrientes son escasos.²⁸ Pueden crecer a una temperatura de 10 a 45 ° C, pH 9.6, al 6.5% de solución salina y sobrevivir a 60 °C durante 30 minutos.²⁹

Debido a su alta virulencia de adhesión y de formación de biofilm consiguen penetrar los túbulos dentinarios permaneciendo luego de la instrumentación químico-mecánica y así contaminando los conductos luego de haber sido obturados.^{30,31}

Es resistente al hidróxido de calcio, un agente antimicrobiano alcalino empleado en odontología como medicamento intrarradicular.³² Generalmente el pH de estas pastas son usadas en endodoncia con 12.3; pero, la alcalinidad alcanzada dentro de la dentina radicular no excede al pH 10.3 después de llenar los canales con hidróxido de calcio, este valor puede disminuir a pH 8.5- 9.0 dentro del sistema de conductos radiculares a consecuencia del efecto tampón de la dentina, valor que no

logra ser lo suficiente como para exterminar a *E. faecalis*.³³

La candidiasis es la infección micótica más usual de la cavidad oral, es ocasionada por el hongo *Cándida*, es diagnosticada por la observación de cambios clínicos y de muestras adquiridas por citología exfoliativa o biopsia en las cuales hay pseudohifas, hifas o levaduras.³⁴

La *Cándida* es un microorganismo oportunista clasificado en el grupo de levaduras, de los cuales se han identificado más de 150 especies.³⁵ *C. albicans* es una de las especies más frecuente en lesiones de la mucosa bucal, seguidas de *cándida no albicans*: *Krusey*, *glabrata*, *tropicalis*, *parapsilosis* y *dublinskiensis*.³⁶

C. albicans pertenece a la familia *Cryptococcaceae*, es un organismo asexual, saprofito, crece preferentemente en superficies húmedas y templadas, puede tornarse patógeno.³⁷ Es una levadura oval que provoca un pseudomicelio en los tejidos, exudados y cultivos; puede propagarse, vincularse con otras afecciones y provocar una enfermedad general progresiva en pacientes debilitados o con un sistema inmunológico alterado.³⁸

Las causas que incitan el desarrollo de la candidiasis bucal son xerostomía, higiene bucal deficiente, antibioticoterapia prolongada, alteraciones inmunológicas o endocrinas, entre otras.³⁹ Así mismo se ha descrito que la presencia de aparatos de ortodoncia bucales y prótesis dentales tiene como consecuencia la acumulación de biofilm y modificación del entorno ecológico de la cavidad oral, por lo que contribuye al aumento de la colonización por *C. albicans*.^{34,36,40}

Las lesiones candidiásicas suelen aparecer en la mucosa yugal, ángulo de los labios, paladar, lengua y faringe.⁴¹

Los tipos clínicos más característicos son la forma pseudomembranosa y la eritematosa. Pueden tener evolución aguda o crónica según la persistencia de los factores predisponentes. También son frecuentes procesos bucales comúnmente asociados: estomatitis subprotésica, queilitis angular, glositis romboidal y lengua vellosa.⁴²

1.3. Antecedentes

Mahdavi et al (2019) evaluaron la efectividad antibacteriana del aceite de *Nasturtium officinale* frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* y *Salmonella entérica*. El resultado fue que *S. enteric* y *E. coli* demostraron más resistencia y *B. cereus* más susceptibilidad al aceite de *N. officinale*. Concluyeron que el aceite de *N. officinale* posee actividad antibacterial frente a bacterias Gram positiva.⁴³

Omidi et al (2018) analizaron la actividad del extracto etanólico de *Nasturtium officinale* frente al crecimiento y formación de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*. Entre sus resultados fueron: La concentración inhibitoria mínima (MIC) fue de 0.625 mg / ml y la concentración bactericida mínima (MBC) de este extracto fue de 1.25 mg / ml. La inhibición de la formación de biofilm por extracto de planta dependía de la concentración, el porcentaje más alto fue de 7,5 mg / ml y el más bajo fue de 0,11 mg / ml. Concluyeron que el extracto de *Nasturtium officinale* tiene efecto antibacterial y anti-biofilm contra la *Pseudomonas aeruginosa*.⁴⁴

Farshbaf et al (2016) evaluaron el efecto antibacterial del extracto acuoso y alcohólico del *Nasturtium officinale* en algunos patógenos. Como resultado obtuvieron: *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* (gram positivas) fueron las bacterias más sensibles con MIC de 8 µg / ml,

mientras que *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* (Gram negativa) fueron más resistentes a los extractos. Además, el efecto inhibitorio de los extractos acuosos y alcohólicos de *N. officinale* fue mayor contra las bacterias Gram positivas en comparación con los Gram negativas. Por lo tanto, los extractos acuosos y alcohólicos de *N. officinale* afectan el crecimiento de bacterias Gram positivas.⁴⁵

Lazaro R et al (2016) realizaron un estudio sobre los componentes antibacterianos del extracto de cloroformo de *N. officinale* frente al *Mycobacterium tuberculosis*. Los resultados fueron que, de las 14 fracciones analizadas, solo del 3 al 5 mostraron propiedades antimicobacterianas de *N. officinale*, concluyendo que se debía a la presencia de E-fitol con una CMI = 12.5 µg / ml y ácido palmítico con una CMI = 50 µg / ml contra *Mycobacterium tuberculosis*.⁴⁶

Khan H et al (2015) determinaron la composición nutricional y las actividades antioxidantes y antimicrobianas de las plantas silvestres disponibles en Pakistán. Ocho especies de plantas silvestres fueron recolectadas, de las cuales una de ellas fue el *Nasturtium officinale*. Cuyos resultados fueron que el *N. officinale* tenía buena actividad antioxidante, además, tuvo un efecto inhibitorio contra *Escherichia coli* con 13 +/- 0.6 mm, *Streptococcus pneumoniae* con 14 +/- 0.7 mm y *Proteus vulgaris* con 15 +/- 0.8 mm de zona de inhibición. Por lo tanto el *N. officinale* tiene actividad antioxidante y antibacteriana.⁴⁷

Nikan J y Khavari H (2014) realizaron un estudio sobre la actividad antifúngica del extracto de berro en el desarrollo de *Fusarium solani* (agente causal de la podredumbre seca de la papa). Los resultados de este estudio indicaron que todas las concentraciones de extracto alcohólico de berros pueden inhibir significativamente el crecimiento de micelios de *Fusarium solani* en medio de cultivo de agar papa dextrosa.

Entre las diferentes concentraciones de extracto de berros, la zona de inhibición más alta del hongo se obtuvo a una dosis de 600 mg / ml. En consecuencia, el extracto de berro posee potencial para ser empleado en fabricar compuestos fungicidas naturales.⁴⁸

Freitas et al (2013) evaluaron la posible interacción *in vitro* entre extractos naturales de *N. officinale* y el isotiocianato de 2-feniletilo con la Gentamicina, se realizó un estudio de sinergia contra 11 aislados de *Escherichia coli*, usaron un ensayo de difusión de disco y métodos de CMI para evaluar la efectividad antibacteriana *in vitro*. Cuyos resultados mostraron que hay un aumento en la actividad antibacteriana del antibiótico cuando se combina con extractos de plantas y compuestos puros. Concluyeron que el berro tiene importantes sustancias farmacológicas que pueden usarse para desarrollar agentes antimicrobianos nuevos y efectivos.⁴⁹

1.4. Justificación y propósito

Debido a que en los últimos años la medicina natural está siendo estudiada en el ámbito odontológico, pero al vivir en un país que posee una gran biodiversidad de flora los estudios no se abastecen, como es el caso del *N. officinale* la cual es una planta con múltiples propiedades medicinales comprobadas artesanalmente, pero con escasos estudios científicos.

Este estudio pretende promover el uso de plantas medicinales para mejorar el estado de la salud bucal y servir como antecedente para investigaciones futuras las cuales pueden ser realizadas *in vitro* o *in vivo*.

Posee importancia clínica ya que si se demuestra que el extracto etanólico de *N. officinale* presenta efectividad antibacteriana y

antifúngica sobre dichos microorganismos podría ser una alternativa de prevención y tratamiento frente a las patologías bucales más frecuentes, como es el caso de la caries dental y candidiasis oral, además de aumentar las probabilidades de éxito en los tratamientos endodónticos, ya que el *E. faecalis* coloniza los conductos radiculares.

Así mismo podría favorecer a la población ya que pueden acceder a un menor costo a otras alternativas de tratamiento para el control de microorganismos relacionados a enfermedades orales a base de este extracto.

Por lo descrito decidí realizar la presente investigación “Efecto antibacteriano y antifúngico *in vitro* del extracto etanólico de *Nasturtium officinale* sobre *Enterococcus faecalis* y *Cándida albicans*”

1.5. Formulación del problema

¿Posee efecto antibacteriano y antifúngico *in vitro* el extracto etanólico de *Nasturtium officinale* sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ y *Cándida albicans* ATCC 10231™?

1.6. Hipótesis de investigación

El extracto etanólico de *Nasturtium officinale* tiene actividad antibacteriana y antifúngica sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ y *Cándida albicans* ATCC 10231™ respectivamente.

1.7. Objetivo(s). General y específicos

1.7.1. Objetivo General.

Determinar el efecto antibacteriano y antifúngico *in vitro* del extracto etanólico de *Nasturtium officinale* sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ y *Cándida albicans* ATCC 10231™.

1.7.2. Objetivos Específicos

- Determinar la susceptibilidad *in vitro* del *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ frente al extracto etanólico de *Nasturtium officinale* en las concentraciones de 20%, 40%, 60%, 80% y 100%
- Determinar la susceptibilidad *in vitro* de la *Cándida albicans* ATCC 10231™ frente al extracto etanólico de *Nasturtium officinale* en las concentraciones de 20%, 40%, 60%, 80% y 100%

1.8. Variables

Variables	Definición conceptual	Definición operacional e Indicadores	Tipo de variable		Escala de medición
			Según su naturaleza	Según su función	
Extracto etanólico de <i>Nasturtium officinale</i>	Es una planta semi acuática utilizada en medicina tradicional por sus múltiples propiedades. ¹⁹	Concentración del extracto etanólico de <i>Nasturtium officinale</i> . al 20%, 40%, 60%, 80% y 100%	Cuantitativa	Independiente	Razón
Efecto antibacteriano y antifúngico	Capacidad para eliminar, inactivar y refrenar la proliferación de agentes patógenos mediante procesos físicos o químicos. ⁵⁰	Susceptibilidad: Se medirá el diámetro del halo de inhibición en milímetros constituido en torno de cada pocillo tanto para el <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 TM y la <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 TM	Cuantitativa	Dependiente	Razón

II. METODOLOGÍA

2.1. Tipo de investigación

Según el periodo en que se capta la información	Según la evolución del fenómeno estudiado	Según la comparación de poblaciones	Según la interferencia del investigador en el estudio	Según la forma de recolección de datos
Prospectivo	Transversal	Comparativo	Experimental	Prolectivo

2.2. Población y Muestra

2.2.1. Características generales:

- Conjunto de placas Petri con Agar Muller- Hinton conteniendo las cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ y los pocillos con la suspensión acuosa procedente del extracto etanólico de *Nasturtium officinale* a una concentración correspondiente y un control positivo (Clorhexidina al 2%).
- Conjunto de placas Petri con Agar Dextrosa Sabouraud conteniendo las cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231™ y los pocillos con la suspensión acuosa procedente del extracto etanólico de *Nasturtium officinale* a una concentración correspondiente y un control positivo (nistatina).
- **Criterios de inclusión**
 - Placas Petri conteniendo las cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ y *Cándida albicans* ATCC 10231™
 - Placas Petri que se encuentren en buen estado y esterilizados correctamente.
- **Criterios de exclusión**
 - Placas Petri con las cepas *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ y *Cándida albicans* ATCC 10231™ que posean alguna rajadura o algún tipo de daño en su estructura en la fase de incubación.
 - Placas Petri con las cepas *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ y *Cándida albicans* ATCC 10231™ con un resultado en la fase de incubación pueda ser incierto.

- **Criterios de eliminación**
 - Placas Petri con las cepas *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ y *Cándida albicans* ATCC 10231™ que se hayan contaminado o deteriorado en la conservación, manipulación y los procedimientos que no posibiliten su medición consecutiva.

2.3. Técnicas e instrumentos de investigación

2.3.1. Método: Observación

2.3.2. Instrumento de recolección de datos:

Para la presente investigación se realizó una ficha para cada microorganismo:

- Una ficha con el promedio del diámetro de los halos de inhibición en milímetros para analizar la sensibilidad del *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ frente a las concentraciones del extracto etanólico *Nasturtium officinale*. (Anexo 01)
- Otra ficha con el promedio del diámetro de los halos de inhibición en milímetros para analizar la sensibilidad de la *Cándida albicans* ATCC 10231™ frente a las concentraciones del extracto etanólico de *Nasturtium officinale*. (Anexo 02)

2.3.3. Procedimiento de recolección de datos:

- **Estudio Piloto**

Antes de ejecutar el proyecto se realizó un estudio piloto por falta de antecedentes del uso del *N. officinale* como agente antibacteriano y antifúngico en *E. faecalis* ATCC

29212™ y *C. albicans* ATCC 10231™ respectivamente. Se empleó 5 placas Petri con 4 repeticiones para el extracto etanólico de *N. officinale* al 20%, 40%, 60%, 80%, 100% y una placa para control positivo, tanto para *E. faecalis* ATCC 29212™ y *C. albicans* ATCC 29212™. Siendo en total 12 placas. (Anexo 03 y 04)

- **De la aprobación del proyecto**

Se obtuvo el permiso para su ejecución con la aprobación del proyecto por la Unidad de Investigación Científica de la Escuela de Estomatología de la Universidad Privada Antenor Orrego con la correspondiente Resolución Decanal.

- **De la autorización para la ejecución**

Se solicitó el permiso para poder ingresar al Laboratorio de Microbiología y Biotecnología de la Fac. de C.C. de la Salud – UPAO, en el cual el investigador estuvo bajo la supervisión del Biólogo y personal del laboratorio. (Anexo 05)

- **De la obtención del extracto etanólico de *Nasturtium officinale***

Recolección de *Nasturtium officinale*

Se recolectó 2 kg de esta planta.

Identificación y determinación taxonómica de la especie

Un ejemplar completo de la planta se llevó al *Herbarium Truxillense* (HUT) para su identificación y determinación

taxonómica. (Anexo 06)

Preparación de la muestra vegetal

Se realizó los siguientes pasos (Anexo 07);

- **Selección:** Se seleccionó las hojas que estuvieran en buen estado, sin ataque de hongos, ni marchitadas o decoloradas.
- **Lavado:** las hojas fueron lavadas con agua destilada, se le realizó una desinfección con hipoclorito de sodio al 0.5 %, luego se enjuagó con agua destilada, para retirar residuos de hipoclorito.
- **Secado:** se distribuyeron las hojas sobre papel Kraft para que sequen a temperatura ambiente por 24 horas, luego fueron sometidas a una estufa a 40 °C.
- **Pulverización:** se pulverizó usando un molino.
- **Tamizaje:** Lo obtenido se pasó por medio del tamiz N° 0.7.
- **Almacenamiento:** El polvo obtenido de las hojas de berro pesó 129 g, este se colocó en un frasco de vidrio ámbar de boca ancha.

Preparación del extracto etanólico

A los 129 g de polvo se le adicionó 1.4 L de etanol al 70° G.L. (Gay Lussac). Se mezcló bien, considerando que ésta no debe sobrepasar las $\frac{3}{4}$ partes del recipiente. Se tapó el envase y se maceró por 7 días, agitándose 15 minutos, dos veces al día.

Luego se filtró usando una bomba de vacío, con papel de filtro Whatman N° 2. Este líquido filtrado se le

denominó extracto etanólico.

Luego, el extracto etanólico se recuperó en un rotavapor, se terminó de secar en la estufa de circulación de aire a 40 °C. Al producto resultante se le denominó extracto blando. A partir de ello se preparó las concentraciones de 20% (200mg/mL), 40% (400mg/mL), 60% (600mg/mL), 80% (800mg/mL) y 100% (1000 mg/mL) disueltas en agua destilada. Por último, se colocó en frascos de vidrio de color ámbar estéril y se guardaron en refrigeración a 4 °C, hasta su empleo posterior. (Anexo 08)

- **De la obtención de las cepas**

Este estudio utilizó cultivos liofilizados de las cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ y *Cándida Albicans* ATCC 10231™ para evaluar la susceptibilidad de los microorganismos frente al extracto etanólico de *Nasturtium officinale*, las cuales fueron obtenidas del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología de la Fac. de C.C. de la Salud – UPAO.

Reactivación y preparación del inóculo de las Cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™

Fue reactivada en agar Muller - Hinton y cultivada bajo condiciones de aerobiosis a una temperatura de 37°C. La suspensión bacteriana tuvo una turbidez semejante al tubo N° 0,5 del Nefelómetro de McFarland que corresponde a $1,5 \times 10^8$ bacterias / ml. (Anexo 09 y 10)

- **Reactivación y preparación del inóculo de las Cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231™**

Las placas se incubaron en medio de agar Dextrosa Sabouraud a 37 °C.

Bajo condiciones estériles se tomó 3 a 4 colonias de la cepa y se procedió a realizar la suspensión directa en 5 ml. de solución salina fisiológica estéril hasta llegar a la turbidez estándar de 0,5 de McFarland. (Anexo 09 y 11)

- **De la determinación de la susceptibilidad antibacteriana**

Se hizo uso del método de pozos en agar.

En el tubo donde se preparó la suspensión bacteriana se introdujo un hisopo esterilizado, se humedeció y fue presionado contra las paredes y así se eliminó el exceso de líquido, rápidamente se inoculó la superficie seca del agar Muller - Hinton por hisopado en tres direcciones opuestas, esto se hizo tres veces para una mejor distribución del microorganismo sobre la superficie del agar. (Anexo 12)

Luego se procedió a la elaboración de pocillos, con un diámetro de 5mm, de 50 ul de capacidad. Cada placa tuvo 4 pocillos a excepción de la placa control que solo contuvo un pocillo. En cada pocillo se colocó 50 ul con una micropipeta de las concentraciones experimentales al 20%, 40%, 60%, 80%, 100% del extracto etanólico de *N. officinale* y para el control positivo se contó con la clorhexidina al 2%. Por último, estas se voltearon y se incubaron en aerobiosis a una temperatura de 37°C durante 24 horas. (Anexo 13 y 14)

Luego de 24 horas con un calibrador vernier se efectuó

la medición de los halos de inhibición del *E. faecalis* ATCC 29212™. (Anexo 15 y 17)

- **De la determinación de la susceptibilidad antifúngica**

A partir del inóculo de *C. albicans* ATCC 10231™ se sembraron con un hisopo estéril en Placas Petri con agar Dextrosa Sabouraud. (Anexo 12)

Se procedió a realizar 4 pocillos para las placas que contenían las concentraciones de *N. officinale* y un pocillo para la Nistatina (placa control). Para luego ser incubadas a 37° C en una estufa por 24 horas. (Anexo 13 y 14)

Se midió los halos de inhibición de cada concentración del extracto etanólico a las 24 horas. (Anexo 16 y 17)

2.4. Diseño de investigación

2.4.1. Unidad de muestreo:

- Cada placa Petri con Agar Muller- Hinton conteniendo las cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ y los pocillos con la suspensión acuosa procedente del extracto etanólico de *Nasturtium officinale* a una concentración correspondiente y un control positivo (Clorhexidina al 2%).
- Cada placa Petri con Agar Dextrosa Sabouraud conteniendo las cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231™ y los pocillos con la suspensión acuosa procedente del extracto etanólico de *Nasturtium officinale* a una concentración correspondiente y un control positivo (nistatina).

2.4.2. Unidad de análisis:

- Cada placa Petri con Agar Muller- Hinton conteniendo las cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ y los pocillos con la suspensión acuosa procedente del extracto etanólico de *Nasturtium officinale* a una concentración correspondiente y un control positivo (Clorhexidina al 2%).
- Cada placa Petri con Agar Dextrosa Sabouraud conteniendo las cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231™ y los pocillos con la suspensión acuosa procedente del extracto etanólico de *Nasturtium officinale* a una concentración correspondiente y un control positivo (nistatina).

2.4.3. Tamaño muestral:

➤ **Para *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™**

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \cdot (S_1^2 + S_2^2)}{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)^2}$$

Donde:

- $Z_{\alpha/2} = 1.96$ (confianza del 95%)
- $Z_{\beta} = 0.84$ (potencia del 80%)
- $\bar{x}_1 = 11.25$ promedio del halo de inhibición de la susceptibilidad del *E. faecalis* ATCC 29212™ frente al extracto etanólico del *N. officinale* al 60% del estudio piloto.
- $\bar{x}_2 = 12.75$ promedio del halo de inhibición del *E. faecalis* ATCC 29212™ frente al extracto etanólico del *N. officinale* al 100% del estudio piloto

- $S_1 = 0.96$ D.E. de los halos para la concentración al 60%
- $S_2 = 1.50$ D.E. de los halos para la concentración al 100%

Reemplazando:

$$n = \frac{(1.96+0.84)^2 \cdot (0.96^2+1.5^2)}{(11.25-12.75)^2} = 12 \text{ repeticiones para cada grupo.}$$

➤ **Para *Cándida albicans* ATCC 10231™**

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \cdot (S_1^2 + S_2^2)}{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)^2}$$

Donde:

- $Z_{\alpha/2} = 1.96$ (confianza del 95%)
- $Z_{\beta} = 0.84$ (potencia del 80%)
- $\bar{x}_1 = 23.25$ promedio del halo de inhibición de la susceptibilidad de *C. albicans* ATCC 10231™ frente al extracto etanólico del *N. officinale* al 40% del estudio piloto.
- $\bar{x}_2 = 24.75$ promedio del halo de inhibición de *C. albicans* ATCC 10231™ frente al extracto etanólico del *N. officinale* al 60% del estudio piloto.
- $S_1 = 1.5$ D.E. de los halos para la concentración al 40%
- $S_2 = 0.96$ D.E. de los halos para la concentración al 60%

Reemplazando:

$$n = \frac{(1.96+0.84)^2 \cdot (1.5^2+0.96^2)}{(23.25-24.75)^2} = 12 \text{ repeticiones}$$

2.4.4. Tipo de muestreo:

Muestreo no probabilístico

2.5. Procesamiento y análisis de datos

Se empleó paquetes estadísticos Excel y SPSS.

- **Estadística descriptiva:** Se fabricó tablas de frecuencias de una entrada con sus valores absolutos, promedio, desviación estándar y gráficos.
- **Estadística analítica:** Para determinar el efecto antibacteriano y antifúngico del extracto etanólico del *N. officinale* sobre las cepas de *E. faecalis* ATCC 29212TM y *C. albicans* ATCC 10231TM respectivamente se dispuso de un análisis de varianza correspondiente a un diseño totalmente al azar empleando la prueba “F”, luego se empleó una prueba de comparaciones múltiple utilizando Duncan. Ambas pruebas con un nivel de significancia del 5%.

2.6. Principios bioéticos

Para ejecutar la presente investigación se respetó los siguientes principios de bioseguridad y así no perjudicar el medio ambiente ni al personal:

- Declaración de Helsinki, adoptada por la 64^a Asamblea Médica Mundial, principio 11.⁵¹
- Ley General de Salud del Perú (Ley N° 026842) Art. 86.⁵²

La manipulación y desecho de las muestras se ejecutó de acuerdo al manual de bioseguridad en laboratorios de microbiología y medicina durante la ejecución del estudio.⁵³

III. RESULTADOS

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto antibacteriano y antifúngico *in vitro* del extracto etanólico de *Nasturtium officinale* (berro) frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM y *Cándida albicans* ATCC 10231TM. Para ello se empleó el método de pozos en Agar y se midió en milímetros los halos de inhibición, pudiendo observar la diferencia del tamaño de los halos del efecto del extracto etanólico comparado con el control positivo. (figura 1 y 2)

Se realizó 3 tablas y un gráfico tanto para el *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM (Tabla 01, tabla 02, tabla 03 y gráfico 01) y *Cándida albicans* ATCC 10231TM (Tabla 04, tabla 05, tabla 06 y gráfico 02).

Tabla 01: Se construyó una tabla que contenía las 5 concentraciones del extracto etanólico de *Nasturtium officinale*, el grupo control (Clorhexidina), número de intervenciones, el promedio del diámetro de los halos de inhibición de crecimiento del *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM y su respectiva desviación estándar. Pudiendo observar que la desviación estándar es baja, por lo tanto, los valores de cada halo de inhibición con su respectiva concentración de extracto etanólico se extienden en un rango reducido, es decir no mantienen mucha diferencia por cada medición hecha.

Tabla 02: Para que la investigación tenga más credibilidad se realizó el análisis de varianza, en donde muestra que P tiene el valor de 0.000 lo cual es menor que el nivel de significancia de 0.05, esto quiere decir que existe una diferencia altamente significativa del diámetro del halo de inhibición de crecimiento de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM, en las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Nasturtium officinale*.

Tabla 03: Se utilizó la prueba de Duncan, que comparó cada promedio de los halos de inhibición de crecimiento de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ mostrando que hay diferencia altamente significativa entre las concentraciones del extracto etanólico de *Nasturtium officinale* al 20% y 100%. Existe semejanza en las concentraciones del extracto etanólico de *Nasturtium officinale* al 20%, 40% y con la clorhexidina. La concentración al 60% no tiene homogeneidad con otros. Las concentraciones al 80% y 100% obtuvieron el mayor promedio.

Gráfico 01: El eje de las abscisas representa las concentraciones del extracto etanólico al 20%, 40%, 60%, 80% y 100%, y el eje de las ordenadas el diámetro de los halos de inhibición. Se observa una línea ascendente la que vendría a ser el efecto antibacteriano de las diferentes concentraciones del extracto etanólico y una descendente para el efecto de la Clorhexidina, apreciándose que, al aumentar las concentraciones del extracto, mayor es el efecto antibacteriano. El grupo control Clorhexidina tuvo un efecto semejante a los extractos al 20% y 40%.

Tabla 04: Se construyó una tabla que contenía las 5 concentraciones del extracto etanólico de *Nasturtium officinale*, el grupo control (Nistatina), número de intervenciones, el promedio del diámetro de los halos de inhibición de crecimiento del *Cándida albicans* ATCC 10231™ y su respectiva desviación estándar. Pudiendo observar que la desviación estándar es baja, por lo tanto, los valores de cada halo de inhibición con su respectiva concentración de extracto etanólico se extienden en un rango reducido, es decir no mantienen mucha diferencia por cada medición hecha.

Tabla 05: Se presenta el análisis de varianza, en la cual se aprecia que existe una diferencia altamente significativa del diámetro del halo de inhibición de *Cándida albicans*, en las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Nasturtium officinale*.

Tabla 06: Se observa los promedios del diámetro del halo de inhibición de crecimiento de *Cándida albicans* después de usar el método de Pocios en Agar. Se utilizó la prueba de Duncan, que comparó los promedios de los halos demostrando que hay diferencia significativa entre las concentraciones del extracto etanólico de *Nasturtium officinale* al 20% y 100%. Existe semejanza en las concentraciones del extracto etanólico de *Nasturtium officinale* al 20%, 40%,60% y 80%. La concentración etanólica al 100% no presenta homogeneidad con otros. El grupo control con Nistatina obtuvo el mayor promedio de halo con 19 mm.

Gráfico 02: Se observa una línea ascendente, la cual el eje de las abscisas representa las concentraciones del extracto etanólico al 20%, 40%, 60%, 80% y 100%, y el eje de las ordenadas el tamaño de los halos de inhibición.

Se muestra el efecto antifúngico del extracto etanólico de *Nasturtium officinale* sobre las cepas de *Cándida albicans*, observando que, al incrementar las concentraciones del extracto, mayor es el efecto antifúngico. El grupo control con Nistatina tuvo mayor efecto antifúngico comparado con las distintas concentraciones del extracto de *Nasturtium officinale*.

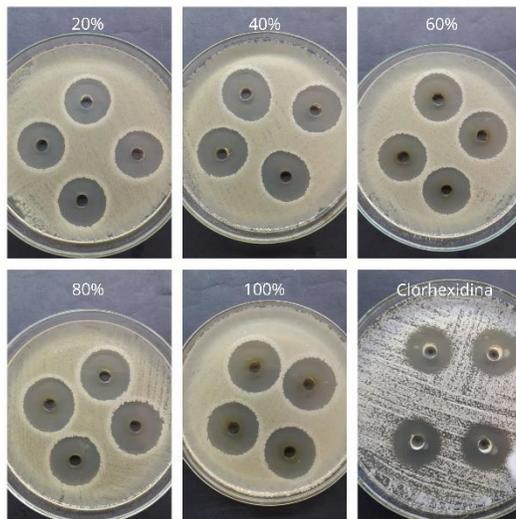


Figura 1: halos de efecto antibacteriano del extracto etanólico de *N. officinale* y Clorhexidina.

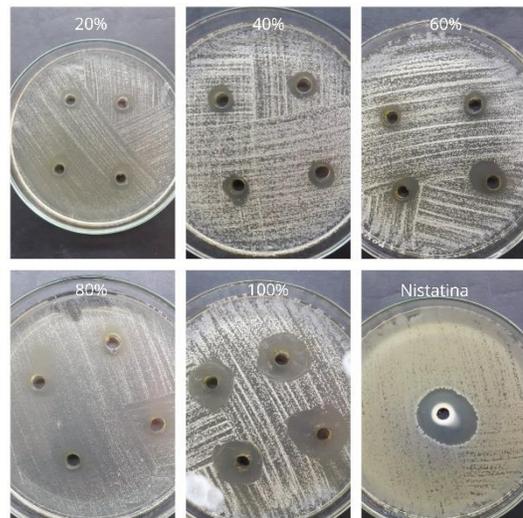


Figura 2: halos del efecto antifúngico del extracto etanólico de *N. officinale* y Nistatina.

Tabla 01

Diámetro promedio (mm) del halo del efecto antibacteriano in vitro del Extracto Etanólico de Nasturtium Officinale (Berro) en las concentraciones de 20%, 40%, 60%, 80% y 100% y Clorhexidina frente a Enterococcus Faecalis.

<u>Concentraciones</u>	Ni	<u>Promedio</u>	<u>Desv. Est.</u>
20%	12	22.17	1.03
40%	12	23.08	1.16
60%	12	26.33	3.94
80%	12	28.58	0.67
100%	12	28.92	1.44
<u>Clorhexidina</u>	12	23.00	0.00

Tabla 02

Análisis de Varianza para el Efecto Antibacteriano in Vitro del Extracto Etanólico de Nasturtium Officinale (Berro) en las concentraciones de 20%, 40%, 60%, 80% y 100% y Clorhexidina, frente a Enterococcus Faecalis, mediante el diámetro (mm) de los halos de inhibición.

FV	SC	gl	CM	F	P
<u>Entre grupos</u>	539.24	5	107.85	31.62	0.0000
<u>Dentro de grupos</u>	225.08	66	3.41		
Total	764.32	71			

FV: fuente de variación, SC: suma de cuadrados, gl: grado de libertad, CM: cuadrado de medio, F: comparar varias variables, P: probabilidad.

Tabla 03

Agrupación del diámetro promedio (mm) del halo del efecto antibacteriano in vitro del Extracto Etanólico de *Nasturtium Officinale* (Berro) en sus distintas concentraciones y Clorhexidina frente a *Enterococcus Faecalis*.

<u>Concentraciones</u>	<u>ni</u>	<u>Grupos para alfa = 0.05</u>		
		G1	G2	G3
20%	12	22.17		
<u>Clorhexidina</u>	12	23.00		
40%	12	23.08		
60%	12		26.33	
80%	12			28.58
100%	12			28.92

Gráfico 01

Efecto antibacteriano del Extracto etanólico de *Nasturtium officinale* en sus distintas concentraciones sobre las cepas de *Enterococcus faecalis* y de la clorhexidina.

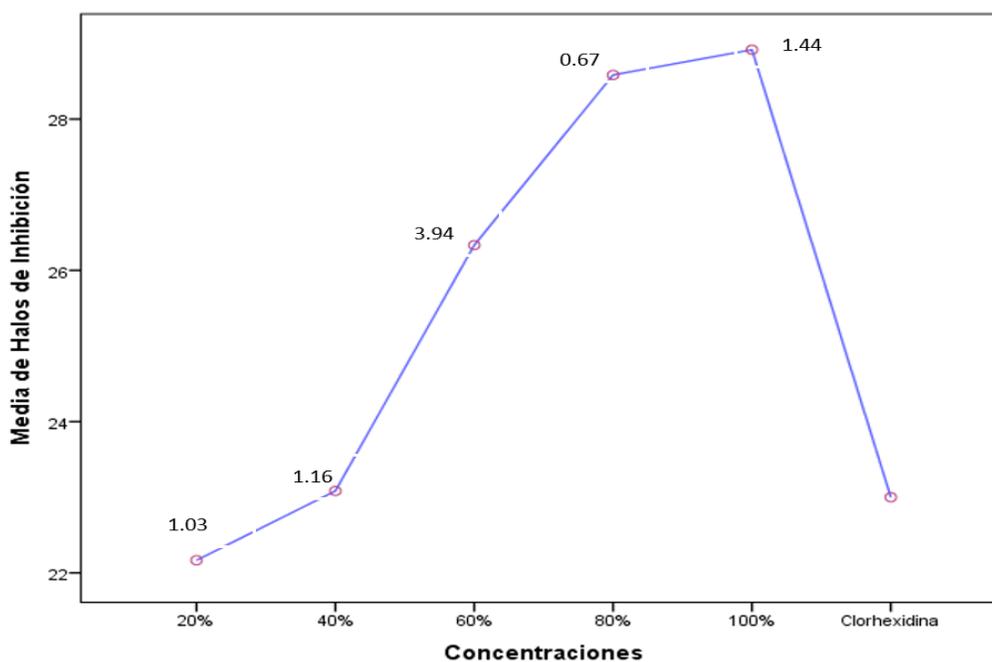


Tabla 04

Diámetro promedio (mm) del halo del efecto antifúngico in vitro del Extracto Etanólico de Nasturtium Officinale (Berro) en las concentraciones de 20%, 40%, 60%, 80% y 100% y Nistatina, frente a Cándida albicans.

<u>Concentraciones</u>	<u>ni</u>	<u>Promedio</u>	<u>Desv. Est.</u>
20%	12	10.00	0.85
40%	12	10.17	1.34
60%	12	10.33	0.78
80%	12	10.42	0.67
100%	12	13.92	2.87
<u>Nistatina</u>	12	19.00	0.00

Tabla 05

Análisis de Varianza para el Efecto Antifúngico in Vitro del Extracto Etanólico de Nasturtium Officinale (Berro) en las concentraciones de 20%, 40%, 60%, 80% y 100% y Nistatina, frente a Cándida Albicans, mediante el diámetro (mm) de los halos de inhibición.

FV	SC	<u>gl</u>	CM	F	P
<u>Entre grupos</u>	777.11	5	155.42	78.81	0.0000
<u>Dentro de grupos</u>	130.17	66	1.97		
Total	907.28	71			

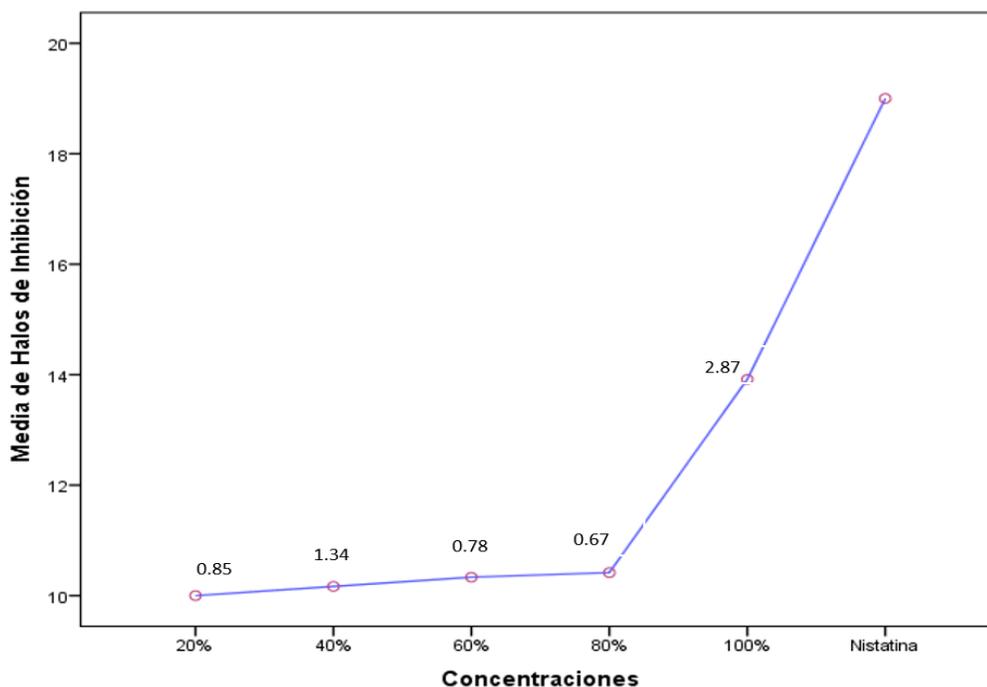
Tabla 06

Agrupación del diámetro promedio (mm) del halo del efecto antifúngico in vitro del Extracto Etanólico de Nasturtium Officinale (Berro) en sus distintas concentraciones y Nistatina frente a Cándida albicans.

<u>Concentraciones</u>	<u>ni</u>	<u>Grupos para alfa = 0.05</u>		
		G1	G2	G3
20%	12	10.00		
40%	12	10.17		
60%	12	10.33		
80%	12	10.42		
100%	12		13.92	
<u>Nistatina</u>	12			19.00

Gráfico 02

Efecto antifúngico del Extracto etanólico de Nasturtium officinale en sus distintas concentraciones sobre las cepas de Cándida albicans y de la Nistatina.



IV. DISCUSIÓN

Epidemiológicamente existe un cambio constante de la resistencia de levaduras a antifúngicos o de bacterias a antibióticos, asociado con el tipo de huésped, el microorganismo involucrado, la etiología de la enfermedad, y la resistencia o sensibilidad del antifúngico o antibiótico.^{54, 55}

Si bien esta investigación es sobre el efecto antifúngico y antibacteriano del extracto etanólico de *Nasturtium officinale* (berro) frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM y *Cándida albicans* ATCC 10231TM, la resistencia bacteriana y fúngica es un problema que surge a partir de la adaptación de la bacteria al antibiótico y de la levadura al antifúngico, tras una mutación genética que los convierte en seres más difíciles para combatir. La resistencia de estos microorganismos a los fármacos ha promovido diversos estudios que precisamente implican la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para hacerles frente a microorganismos como *Enterococcus faecalis* y *Cándida albicans*. Conociendo esto, se espera que este aporte científico contribuya con dicha finalidad.

Las investigaciones con extractos de productos naturales han incrementado su significación con el paso del tiempo a causa de las propiedades y beneficios que ofrecen para favorecer la salud de las personas.

Según refiere la literatura, las sustancias antimicrobianas de la mayoría de las especias son los propios aceites esenciales, mezcla de diferentes productos volátiles, entre ellos se encuentran los alcoholes, cetonas, éteres, ácidos, entre otros. El berro posee compuestos fenólicos y glucosinolatos los cuales le proporcionan propiedades antimicrobianas.²⁴

Teniendo en cuenta la compatibilidad de estos compuestos con el organismo y sus efectos farmacéuticos beneficiosos, es de gran valor estudiar los efectos

antibacterianos de las plantas que se han utilizado en la medicina tradicional.

El objetivo de esta investigación experimental fue determinar el efecto antibacteriano y antifúngico *in vitro* del extracto etanólico de *Nasturtium officinale* (berro) frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM y *Cándida albicans* ATCC 10231TM, lo cual se demostró según los resultados obtenidos. Esto tendría una explicación ya que se utilizó un solvente orgánico (alcohol) el cual posibilita la conservación de los compuestos biológicamente activos (compuestos fenólicos y glucosinolatos).⁴⁵

Se demostró que existe efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Nasturtium officinale* al 20%, 40%, 60%, 80% y 100% de concentración sobre las cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM, Gram positiva, frecuentemente encontrada en un gran porcentaje tratamientos endodónticos fallidos debido a que es un microorganismo persistente en las lesiones periapicales. Se realizó a través del método de pocitos en agar registrando las medidas de los halos de inhibición. El promedio de estos halos fue entre 22.17 – 28.92 mm.

Se asemeja al estudio realizado por Omidi et al (2018), quienes evaluaron la actividad del extracto etanólico de *Nasturtium officinale* frente a *Pseudomonas aeruginosa* (Gram positiva) y concluyeron que posee un efecto antibacterial.

Así mismo, es similar a lo hallado por Farshbaf et al (2016) quienes observaron que *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* (Gram positiva) eran sensibles al extracto etanólico de *Nasturtium officinale*.

Esto podría deberse a la diferente estructura en la pared celular bacteriana de estos dos grupos de bacterias. Las bacterias Gram negativas poseen una membrana externa que actúa como barrera contra el paso de moléculas grandes e hidrofóbicas. Dado que los compuestos más eficaces que se

encuentran en los aceites y extractos esenciales tienen naturaleza hidrofóbica, se puede concluir que estos compuestos pueden no entrar o alcanzar los puntos activos dentro de las bacterias Gram negativas.⁴⁵

También se demostró que el extracto etanólico posee efecto antifúngico sobre las cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231TM por medio de las medidas de los halos de inhibición. El promedio de estos halos fue entre 10 – 13.92 mm.

Similar al estudio realizado por Nikan J y Khavari H (2014) quienes concluyeron que el extracto alcohólico de *Nasturtium officinale* es fungicida ya que puede inhibir el crecimiento de micelios de *Fusarium solani* en medio de cultivo de agar papa dextrosa.

Según Cadena K et al (2017), quienes realizaron una investigación experimental *in vitro* sobre la efectividad antifúngica de diferentes concentraciones hidroalcohólicas (25%, 50%, 75% y 100%) de *Uncaria Tomentosa* sobre *Cándida albicans*, también incluyendo a la Nistatina (control positivo) concluyeron que el extracto hidroalcohólico al 100% (16.5 mm) como la nistatina (23.42 mm) evidenciaron ser sensibles, mientras que las concentraciones al 50% (10.96 mm) y 75% (14.5 mm) obtuvieron una sensibilidad intermedia y al 25% (6.46 mm) fue resistente contra *Cándida albicans*. Al igual que en el presente estudio la Nistatina (19 mm) tuvo un valor mucho mayor a la de las concentraciones del extracto etanólico.

Así corrobora el estudio realizado por Días M et al (2016), quienes utilizaron 3 antifúngicos (nistatina, fluconazol y clotrimazol) para determinar la sensibilidad de diferentes especies de *Cándida* (*albicans glabrata*, *parapsilosis* y *tropicalis*) concluyendo que ninguna de estas especies de *Cándida* es resistente a la Nistatina, pero sí lo son con el fluconazol y el clotrimazol. Esto se debe a la resistencia de *Cándida albicans* a diferentes antifúngicos, por ello el presente estudio de investigación se obtuvo una baja efectividad antifúngica del extracto

etanólico de *Nasturtium officinale* frente a *Cándida albicans* ATCC 10231™ comparado con la Nistatina.

V. CONCLUSIONES

1. El extracto etanólico de *Nasturtium officinale* tiene efecto antibacteriano y antifúngico *in vitro* frente a las cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ y *Cándida albicans* ATCC 10231™, el cual se realizó mediante el método de pozos en agar.
2. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ es susceptible a las concentraciones usadas del extracto de *Nasturtium officinale*, a mayor concentración mayor sensibilidad. El grupo control de clorhexidina tuvo menor efecto antibacteriano en comparación con las concentraciones del extracto al 60%, 80% y 100%.
3. *Cándida albicans* ATCC 10231™ es susceptible a las concentraciones usadas del extracto de *Nasturtium officinale*, a mayor concentración mayor sensibilidad. El grupo control de Nistatina tuvo mayor efecto antifúngico en comparación con las concentraciones del extracto.

VI. RECOMENDACIONES

1. Realizar más estudios con el extracto etanólico de *Nasturtium officinale* con otras cepas de importancia odontológica.
2. Realizar estudios sobre la efectividad del uso de irrigantes, colutorios y pastas dentales a base de *Nasturtium officinale*.
3. Realizar estudios sobre la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), Concentración Mínima Bactericida (CMB) y Concentración Mínima Fungicida (CMF) del extracto etanólico de *Nasturtium officinale*.

VII. REFERENCIAS

1. Carrero C, González MC, Martínez MA, Serna F, Díez H, Rodríguez A. Baja frecuencia de *Enterococcus faecalis* en mucosa oral de sujetos que acuden a consulta odontológica. Rev Fac Odontol Univ Antioq. 2014; 26(2): 261-270.
2. Alvarado S, Herrera P, Enoki E, Ruiz M, Millones P. Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *Prosopis pallida* sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Revista Cubana de Medicina Tropical. 2018;70(2)
3. Pupo S, Díaz A, Castellanos P, Simancas V. Eliminación de *Enterococcus faecalis* por medio del uso de hipoclorito de sodio, clorhexidina y MTAD en conductos radiculares. Av. Odontoestomatol. 2014; 30 (5): 263-270.
4. Pérez O, Vallejos E. Actividad antifúngica *in vitro* del extracto crudo acuoso de *Rosmarinus officinalis* contra *Candida albicans*. J. Selva Andina Res. Soc. 2019; 10(1):45-51.
5. Gallón J. Cambios morfológicos e inhibición del crecimiento de *Cándida albicans* en presencia de una solución de sulfato de zinc. NOVA. 2015; 13 (23): 7-15
6. Churata D, Ramos D, Moromi H, Martínez E, Castro A, García R. Efecto antifúngico de *Citrus paradisi* "toronja" sobre cepas de *Cándida albicans* aisladas de pacientes con estomatitis subprotésica. Rev Estomatol Herediana. 2016;26(2):78-84.
7. Maureira N, Viera P, Fernandez A, Urrejola M, Bravo C, Mardones F, Vines E, Haidar Z. Susceptibilidad de cepas de *Cándida* oral a extracto etanólico del propóleo chileno de Olmué. Int. J. Odontostomat. 2017; 11(3):295-303.
8. Najem A, Ibrahim J. Potential use of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil as anti-bacterial and anti-algal. J Pharm Biol Sci 2017; 12(2):68-71.

9. Gallegos M. Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *An Fac Med.* 2016; 77(4):327-32.
10. Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. [Internet]. WHO. 2013 [citado 10 de Diciembre de 2019]. Disponible en: https://www.who.int/topics/traditional_medicine/WHO-strategy/es/
11. Garcia C, Sarrion M, Bagán J. Current treatment of oral candidiasis: A literature review. *J. Clin. Exp.Dent.* 2014; 6(5):576-82.
12. Machorowska A, Skucha M, Mertas A, Tanasiewicz M, Niedzielska I, Morawiec, T, Baron S. Effects of brazilian propolis on dental plaque and gingiva in patients with oral cleft malformation treated with multibracket and removable appliances: A comparative study. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2016: 2038407.
13. Fretes F. Plantas medicinales y aromáticas: una alternativa de producción comercial. Paraguay: USAID; 2010. 10 p.
14. Ugas R. 40 viejas y nuevas verduras para diversificar tu alimentación y nutrirte mejor. Perú: Progrma de Hortalizas, Universidad Nacional Agraria La Molina. 2014. 64-65 p.
15. Saavedra G, Blanco C, Teresa M, Aspe C. Hortalizas saludables: El Berro. Chile: Tierra Adentro; 2011. 14-18 p.
16. Jeon J, Bong S, Park J, Park Y, Arasu M, Al-Dhabi N, et al. De novo transcriptome analysis and glucosinolate profiling in watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.). *BMC Genomics.* 2017; 18:401.
17. García M. NAVARRA, Plantas medicinales. 2ª ed. España: Caja de ahorros de Navarra; 1981. 88 p.
18. Chaudhary S, Hisham H, Mohamed D. A review on phytochemical and pharmacological potential of watercress plant. *Asian J Pharm Clin Res.* 2018; 11(12):102-107

19. Pandey Y, Bhatt S, Debbarma N. Watercress (*Nasturtium officinale*): A Potential Source of Nutraceuticals. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.*2018; 7(02): 2685-2691
20. Clemente M, Miguel MD, Felipe KB, Fujiwara GM, Fernandes LC, Dias Jd, et al. Can medicinal properties of watercress be relevant to human health? A systematic review based on preclinical study in vivo. *Phcog Rev.* 2019; 13:10-5.
21. Zargari F, Ghorbanihaghjo A, Babaei H, Farajnia S, Roodbari NH. The effect of hydroalcoholic extract of *Nasturtium officinale* R. Br on antioxidant status and DNA damage in liver and kidney rats exposed to arsenic. *Med J Tabriz Univ Med Sci.* 2014; 36(3): 44-9.
22. Zeb A. Phenolic profile and antioxidant potential of wild watercress (*Nasturtium officinale* L.). *SpringerPlus.* 2015; 4:714.
23. Karami M, Mostafazadeh M, Sadeghi H, Sadeghi H, Mehraban F, Kokhdan EP, et al. Nephroprotective effect of *Nasturtium officinale* (watercress) ethanol extract and Vitamin E on vancomycin-induced nephrotoxicity in rats. *Jundishapur J Nat Pharm Prod.* 2018; 13:1-8.
24. Aires A, Carvalho R, Rosa E, Saavedra M. Phytochemical characterization and antioxidant properties of baby-leaf watercress produced under organic production system. *CyTA - Journal of Food*, 2013; 11(4) :343-351
25. Rodríguez C, Oporto G. Implicancias clínicas de la contaminación microbiana por *Enterococcus faecalis* en canales radiculares de dientes desvitalizados: Revisión de la literatura. *Revista Odontológica Mexicana* 2015;19 (3): 181-186
26. *Ardila C, Maggiolo S, Dreyer E, Armijo J, Silva N. Enterococcus faecalis en dientes con periodontitis apical asintomática. Revista Archivo Médico de Camagüey, 18(4), 415-423.*
27. Tabassum S, Khan FR. Failure of endodontic treatment: The usual suspects. *European Journal of Dentistry.* 2016; 10(1):144-7.

28. Selleck E, Tyne D, Gilmore M. Pathogenicity of Enterococci. *Microbiol Spectr.* 2019; 7(4):10.1128.
29. Ríos S, Agudelo R, Gutiérrez L. Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública,* 2017; 35(2): 236-247.
30. Plotino G, Cortese T, Grande N, Leonardi D, Di Giorgio G, Testarelli L, et al. New Technologies to Improve Root Canal Disinfection. *Braz Dent J.* 2016; 27(1):3-8.
31. Echeverri D, Alderete D. *In vitro* antibacterial effect of 2% chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* in dentin previously irrigated with 5% sodium hypochlorite. *Int. J. Odontostomat.* 2015; 9(1):25-29.
32. Alvear J, Pupo S, Romero A. Evaluación de la actividad antimicrobiana del hidróxido de calcio combinado con diferentes concentraciones de omeprazol frente a *enterococcus faecalis*. *Salud Uninorte. Barranquilla (Col.)* 2018; 34 (3): 551-557
33. Weckwerth P, Zapata R, Vivan R, Tanomaru M, Maliza A, Duarte M. *In vitro* alkaline pH resistance of *Enterococcus faecalis*. *Braz Dent J.* 2013; 24 (5): 474-476.
34. Ibañez N, Robles C, Lecona J. Frecuencia de candidiasis oral asociada al uso de prótesis dentales en pacientes de la Clínica Odontológica de la Universidad Anáhuac Norte. *Rev ADM* 2017; 74 (2): 74-78.
35. Moosazadeh, M.; Akbari, M.; Tabrizi, R.; Ghorbani, A.; Golkari, A. & Banakar, M. Denture stomatitis and *Candida Albicans* in Iranian population: A systematic review and meta-analysis. *J. Dent.* 2016; 17(3):283-92.
36. Hernández S, Rueda F, Flota A, Aguilar F, Rodríguez M, Lama E. Influencia de la aparatología ortodóntica sobre la ocurrencia de *Candida* spp. en la cavidad oral. *Rev Chilena Infectol* 2016; 33 (3): 293-297
37. Estrada G, Márquez M, Díaz J, Agüero A. Candidiasis bucal en pacientes con diabetes mellitus. *MEDISAN* 2015; 19(11):1317

38. Velasco León EC, Mendiola García A, Pizano Damasco MI. Candidiasis oral en paciente pediátrico sano. Revisión bibliográfica. *Oral*. 2013; 14(44): 956-64.
39. Varela Y, Herrera N, Carrero S, Díaz C, Correa M, Salazar O. Especies de *Candida* colonizantes de cavidad oral en pacientes pediátricos oncológicos hospitalizados en el IAHULA, Mérida, Venezuela. *RSVM*. 2014; 34:22-26
40. Armas M, Muñoz J. *Cándida albicans* en prótesis totales en pacientes portadores de enfermedades crónicas no transmisibles: diabetes mellitus tipo II e hipertensión arterial. *Dom Cien*. 2017; 3(3):487-500
41. Estrada G, Márquez M, Díaz J, Sánchez O. Candidiasis bucal en pacientes con tratamiento antineoplásico. *MEDISAN* 2015; 19(9):1080
42. Otero E, Peñamaría M, Rodríguez M, Martín B, Blanco A. Candidiasis oral en el paciente mayor. *Av. Odontoestomatol* 2015; 31 (3): 135-148.
43. Mahdavi S, Kheyrollahi M, Sheikloei H, Isazadeh A. Antibacterial and antioxidant activities of *nasturtium officinale* essential oil on food borne bacteria. *The Open Microbiology Journal*. 2019; 13: 81-85.
44. Omid A, Sharifi A. Effect of methanolic extract of *Nasturtium officinale* on growth and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gorgan Univ Med Sci*. 2018; 20(2): 102-108.
45. Farshbaf S, Ghiami M, Mahmoudi R. Evaluation of Antibacterial Effects of Aqueous and Alcoholic Extracts of *Nasturtium Officinale* on Some Pathogenic. *Mljgoums*. 2016; 10(6): 49-53.
46. Lazaro R, Eunice A, Zuniga F, Garcia A, Gonzalez E, Alvarez L, *et al*. Antimycobacterial compounds from *Nasturtium officinale*. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2016;13:31-4.
47. Khan H, Jan SA, Javed M, Shaheen R, Khan Z, Ahmed A, *et al*. Nutritional composition, antioxidant and antimicrobial activities of selected wild edible plants. *J Food Biochem* 2015;40:61-70.

48. Nikan J, Khavari H. In vitro anti-fungal activity of watercress (*Nasturtium officinale*) extract against *Fusarium solani*, the causal agent of potato dry rot. *Journal of Herbal Drugs*. 2014; 5(1): 19-24.
49. Freitas E, Aires A, de Santos E and Saavedra M. Antibacterial activity and synergistic effect between watercress extracts, 2-phenylethyl isothiocyanate and antibiotics against 11 isolates of *Escherichia coli* from clinical and animal source. *Letters in Applied Microbiology*. 2013; 57(4): 266-73.
50. Hospital Alemán Asociación Civil. Diccionario médico. 2018. Disponible en: <https://www.hospitalaleman.org.ar/diccionario-medico/i/>.
51. Asamblea Médica Mundial. Declaración de Helsinki. Finlandia: AMM; 1964.
52. ESSALUD. Ley General de Salud, Ley N° 26842. 1997
53. Organización Mundial de la Salud. Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. 3° ed. Ginebra: Biblioteca Organización Mundial de la Salud. 2005.
54. Zurita S. Situación de la resistencia antifúngica de especies del género *Cándida* en Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2018; 35 (1): 126-31
55. López K, Dzul K, Lugo C, Arias L, Zvala J. Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Cándida albicans*. *Rev Biomed*. 2016; 27: 127-136
56. Cadena K, Pazán P, Farfán A. Efecto antifúngico de diferentes concentraciones del extracto de *Uncaria Tomentosa* sobre *Cándida albicans*: Estudio *in vitro*. *Rev Odontología*. 2017; 19; 30-39
57. Días M, Camponovo R, Araya I, Cerda A, Santander M, Carrillo A. Identificación y sensibilidad antifúngica *in vitro* de *Cándida spp*. De origen vaginal a fluconazol, clotrimazol y nistatina. *Rev Esp Quimioter*. 2016; 29 (3): 151-154

VIII. ANEXOS

ANEXO 01

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA MEDIR EL TAMAÑO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN EN MM DEL *ENTEROCOCCUS FAECALIS* FRENTE AL EXTRACTO ETANÓLICO DE *NASTURTIUM OFFICINALE*

MICROORGANISMO	REPETICIONES	SOLUCIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>NASTURTIUM OFFICINALE</i>				
		20%	40%	60%	80%	100%
<i>Enterococcus faecalis</i> <i>ATCC 29212™</i>	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					
	7					
	8					
	9					
	10					
	11					
	12					
	Promedio estándar					

CONTROL	Halo de inhibición en mm
Clorhexidina	

ANEXO 02

**FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA MEDIR EL TAMAÑO DE LOS
HALOS DE INHIBICIÓN EN MM DE *CÁNDIDA ALBICANS* FRENTE AL
EXTRACTO ETANÓLICO DE *NASTURTIUM OFFICINALE***

MICROORGANISMO	REPETICIONES	SOLUCIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE NASTURTIUM OFFICINALE				
		20%	40%	60%	80%	100%
<i>Cándida albicans</i> <i>ATCC 10231™</i>	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					
	7					
	8					
	9					
	10					
	11					
	12					
	PROMEDIO ESTÁNDAR					

CONTROL	Halo de inhición en mm
Nistatina	

ANEXO 03

ESTUDIO PILOTO: Prueba piloto de 4 repeticiones.

Diámetro del halo de inhibición en mm del *Enterococcus faecalis* frente al extracto etanólico del *Nasturtium officinale* en diferentes concentraciones.

MICROORGANISMO	REPETICIONES	SOLUCIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>NASTURTIUM OFFICINALE</i>				
		20%	40%	60%	80%	100%
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 TM	1	20	24	26	29	31
	2	22	22	24	29	28
	3	22	25	24	27	27
	4	22	22	25	26	27
	Mediana	21.5	23.25	24.75	27.75	28.25
	D.E.	1	1.5	0.96	1.5	1.89

CONTROL	Halo de inhibición en mm
Clorhexidina	23

ANEXO 04

ESTUDIO PILOTO: Prueba piloto de 4 repeticiones.

Diámetro del halo de inhibición en mm de *Cándida albicans* frente al extracto etanólico del *Nasturtium officinale* en diferentes concentraciones.

MICROORGANISMO	REPETICIONES	SOLUCIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>NASTURTIUM OFFICINALE</i>				
		20%	40%	60%	80%	100%
<i>Cándida albicans</i> ATCC 10231TM	1	9	11	11	12	14
	2	9	11	12	12	14
	3	10	11	10	11	11
	4	10	10	12	12	12
	MEDIANA	9.5	10.75	11.25	11.75	12.75
	D.E.	0.5	0.5	0.96	0.5	1.50

CONTROL	Halo de inhibición en mm
Nistatina	19

ANEXO 05

SOLICITO: ACCESO AL
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA
MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA DE
LA FAC. DE C.C. DE LA SALUD DE LA
UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONOR
ORREGO

Dr. JOSÉ GUILLERMO GONZÁLEZ CABEZA

COORDINADOR DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOTECNOLOGÍA DE LA FAC. DE C.C. DE LA SALUD

S.D.:

Yo, Vielka Yannela Martínez Ruiz, bachiller en Estomatología de la Universidad Privada Antonor Orrego, identificada con ID 000134571, ante Ud. me presento y expongo:

Que, siendo requisito indispensable para poder optar el título profesional de Cirujano Dentista, la sustentación de tesis, recorro a su despacho a fin de que se apruebe el permiso para la realización de mi proyecto de tesis titulado: **“Efecto antibacteriano y antifúngico *in vitro* del extracto etanólico de *Nasturtium officinale* (berro) sobre *Enterococcus faecalis* y *Cándida albicans*”**, motivo por el cual pido, se me facilite el permiso del uso del laboratorio, materiales y equipos necesarios del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de la Fac. de C.C. de la Salud de la Universidad Privada Antonor Orrego.

Trujillo, Febrero de 2020



Dr. José Guillermo González Cabeza
JEFE
UNIDAD DE CENTROS DE INVESTIGACIÓN


MARTÍNEZ RUIZ, VIELKA YANNELA
Bachiller en Estomatología

ANEXO 07

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA VEGETAL



Selección



Lavado



Secado en estufa a 40°C



Pulverización



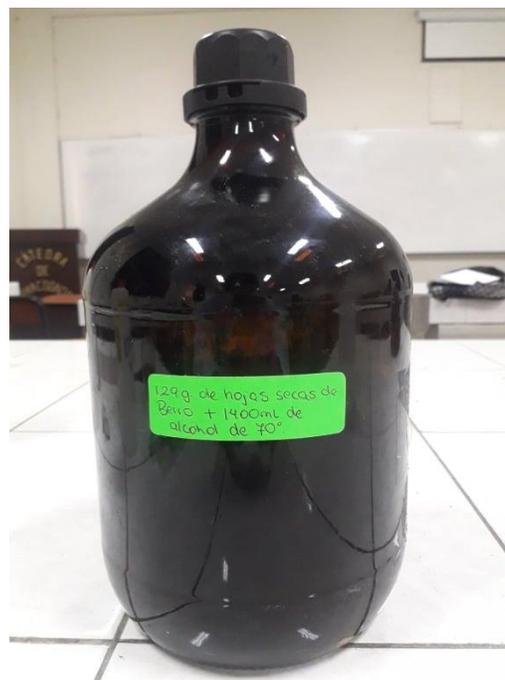
Tamizaje

ANEXO 08

PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO



Alcohol de 96° + agua destilada
= Etanol a 70°



129 g de polvo de hojas de berro + 1440 ml de etanol a 70°



Filtración



Concentraciones disueltas en alcohol de 70°



Frascos con el contenido etanólico

ANEXO 09



Placas Petri con Agar Muller-Hinton y Agar Dextrosa Sabouraud.

ANEXO 10



Inóculo de las cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™

ANEXO 11



Inóculo de las cepas de *Cándida Albicans* ATCC 10231™

ANEXO 12

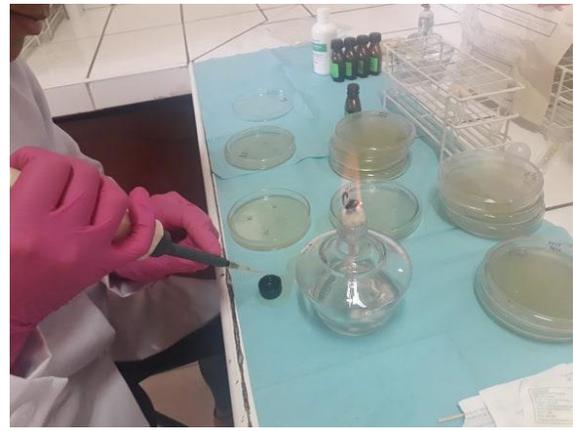


Siembra de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ y *Cándida Albicans* ATCC 10231™

ANEXO 13
MÉTODO DE POZOS EN AGAR



Elaboración de pocillos con una pipeta
Pasteur de vidrio estéril.



Llenado de los pocillos con ayuda de una micropipeta.

ANEXO 14



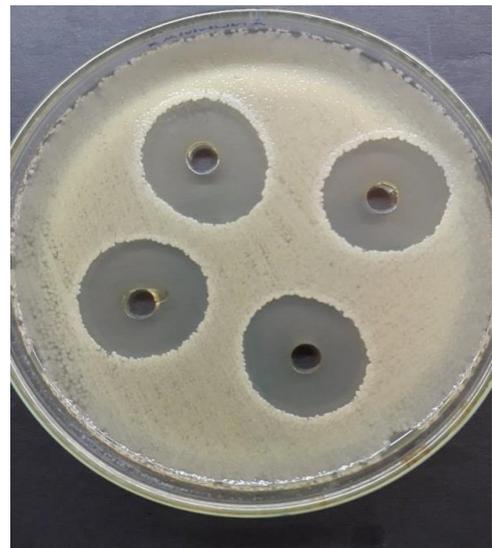
Incubación de las placas a 37° C en la estufa por 24 horas.

ANEXO 15

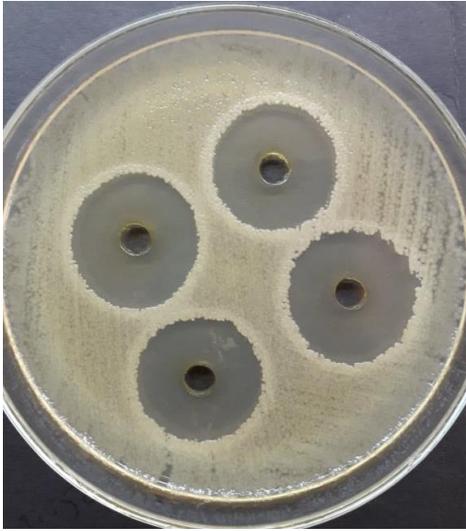
SUSCEPTIBILIDAD ANTIBACTERIANA: HALOS DE INHIBICIÓN DEL ENTEROCOCCUS *FAECALIS* ATCC 29212™ FRENTE AL EXTRACTO ETANÓLICO DE *NASTURTIUM OFFICINALE*



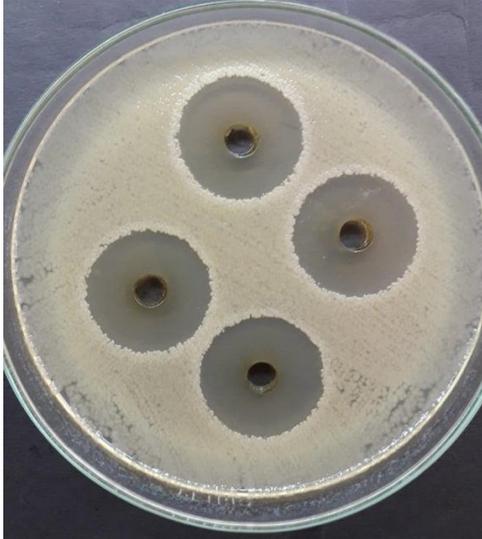
Concentración de extracto al 20%



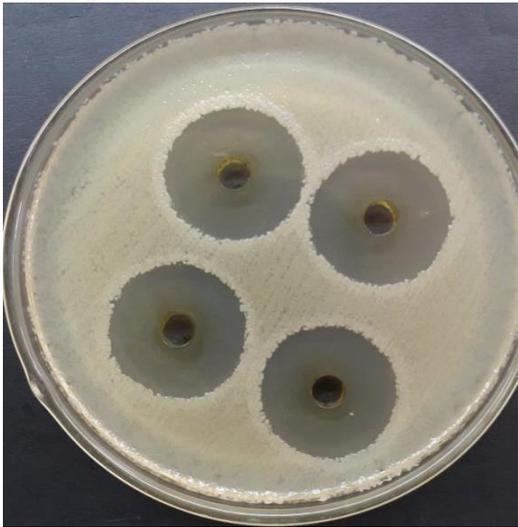
Concentración de extracto al 40%



Concentración de extracto al 60%



Concentración de extracto al 80%



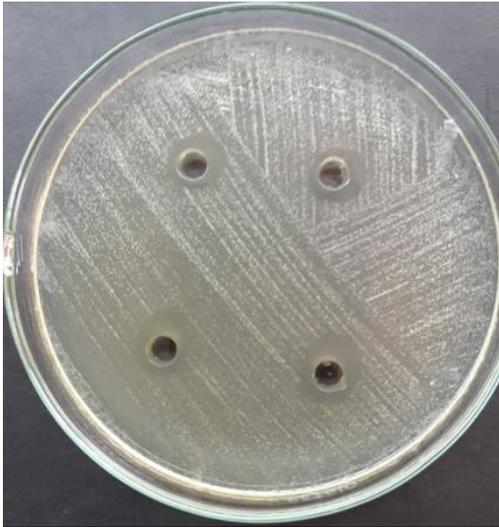
Concentración de extracto al 100 %



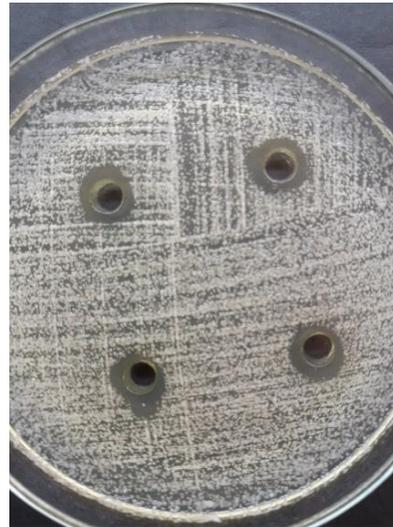
Control positivo: Clorhexidina al 2%

ANEXO 16

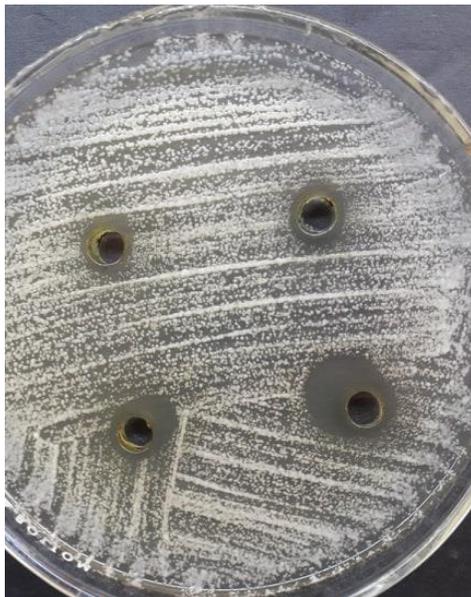
SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA: HALOS DE INHIBICIÓN DEL *CÁNDIDA ALBICANS* ATCC 10231™ FRENTE AL EXTRACTO ETANÓLICO DE *NASTURTIUM OFFICINALE*



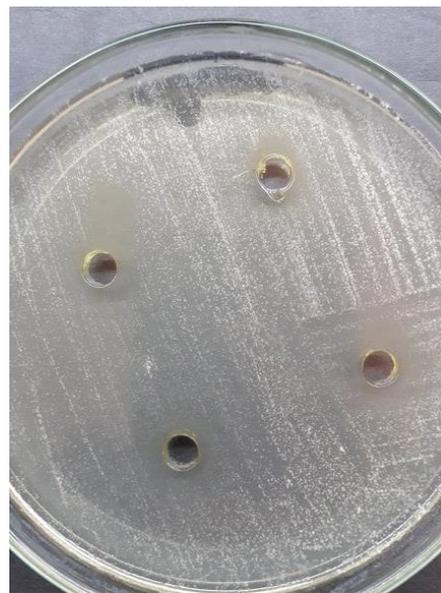
Concentración de extracto al 20 %



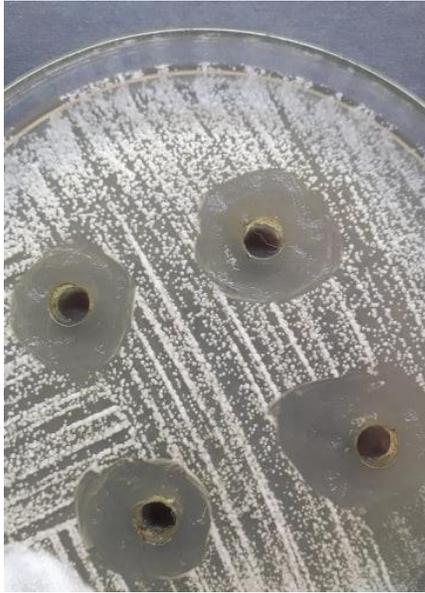
Concentración de extracto al 40 %



Concentración de extracto al 60 %



Concentración de extracto al 80 %



Concentración de extracto al 100 %



Control positivo: Nistatina

ANEXO 17



Medición de los halos de inhibición con un calibrador vernier.