

# Efecto Antibacteriano del Extracto Etanólico de *Equisetum giganteum* L. “Cola de Caballo” Frente al *Fusobacterium nucleatum*, Microorganismo Asociado a la Enfermedad Periodontal

Antibacterial Effect of the Ethanolic Extract of *Equisetum Giganteum* L. "Horsetail" Against *Fusobacterium Nucleatum*, A Microorganism Associated with Periodontal Disease

Elizabeth Huachaca<sup>1</sup>; Donald Ramos-Perfecto<sup>1,2</sup> & Hilda Moromi Nakata<sup>3</sup>

---

HUACHACA, E.; RAMOS-PERFECTO, D. & MOROMI, N. H. Efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Equisetum giganteum* L. “cola de caballo” frente al *Fusobacterium nucleatum*, microorganismo asociado a la enfermedad periodontal. *Int. J. Odontostomat.*, 17(4):414-419, 2023.

**RESUMEN:** La fitoterapia aplicada a la Odontología se presenta como una eficaz alternativa de tratamiento frente a las enfermedades periodontales (EP) porque busca utilizar los principios activos de las plantas medicinales que se encuentran en gran cantidad en la naturaleza, dándole así las características de ser más asequibles y de menor costo, para combatir los microorganismos patógenos causantes de las EP. El objetivo del estudio fue determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *Equisetum giganteum* L. frente a cepas ATCC de *Fusobacterium nucleatum*. El estudio fue de tipo experimental no probabilístico y estuvo constituido en total por 10 placas Petri sembradas con *F. nucleatum*. Se utilizó extracto etanólico de *E. giganteum* L. en las concentraciones de 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 %. Se utilizó el método de difusión en agar y se incubaron 10 placas a 37 °C durante 07 días. Se midieron los halos de inhibición con un vernier digital, siendo estos datos posteriormente analizados. No se evidenciaron halos de inhibición significativos en ninguno de los discos embebidos con las diferentes concentraciones en las 10 placas Petri sembradas con *F. nucleatum*, pero sí con la clorhexidina, agente química utilizado como control positivo. En conclusión no se determinó un efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *E. giganteum* L. frente a *F. nucleatum*, en ninguna de sus concentraciones.

**PALABRAS CLAVE:** Enfermedades periodontales, *Equisetum*, *Fusobacterium nucleatum*, antibacteriano, extracto de planta.

---

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades periodontales (EP) representan la segunda enfermedad bucal más común y prevalente después de la caries dental, afectando aproximadamente a un 10% de la población mundial, en países de Latinoamérica donde se acentúan los niveles de pobreza y desigualdad social se reportan cifras de hasta 18% de población afectada; el limitado acceso a los servicios de salud es un problema que se agudiza en las poblaciones rurales que no cuentan con el acceso a los implementos básicos que se utilizan en las terapias periodontales tales como cepillo dental, hilo dental,

pastas dentales, colutorios y antisépticos vitales para combatir los microorganismos causantes de las enfermedades periodontales (World Health Organization, 2020).

*Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) es un microorganismo comensal y versátil de la cavidad bucal; tiene la capacidad de coexistir con diversos patógenos periodontales y es considerado un patógeno con moderada actividad en las enfermedades periodontales ya que es el responsable de la transición de estadios iniciales de la enfermedad

<sup>1</sup> Cirujano dentista, Facultad de Odontología Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Ciudad Universitaria, Lima, Perú.

<sup>2</sup> Laboratorio de Microbiología, Facultad de Odontología Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Ciudad Universitaria, Lima, Perú.

<sup>3</sup> Licenciada en Biología, Facultad de Odontología Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Ciudad Universitaria, Lima, Perú.

periodontal como la gingivitis a estadios más graves como la periodontitis porque coloniza inicialmente en el biofilm dental y actúa como puente entre los colonizadores iniciales y tardíos causantes de las enfermedades periodontales (Ramos-Perfecto *et al.*, 2020).

*Equisetum giganteum* L. (*E. giganteum* L.) es una de las 04 especies de *Equisetum* que existen en el Perú, siendo esta, una de las más utilizadas e investigadas por sus propiedades farmacológicas y medicinales (León, 2013).

Chuquipiondo (2021) estudió el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *E. giganteum* L. sobre cepas ATCC de *P. gingivalis*, obteniendo como resultado que el extracto etanólico de *E. giganteum* L. al 100 % presenta efecto antibacteriano ante este microorganismo periodontopatógeno.

Choque Quispe (2020) estudió el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *E. arvense* sobre cepas ATCC de *P. gingivalis*, el estudio dio como resultado que *P. gingivalis* es muy sensible ante el extracto etanólico en las concentraciones de 75 % y 100 %.

En el campo de la odontología existen escasos estudios sobre su efectividad antibacteriana en bacterias causantes de las enfermedades periodontales tales como *F. nucleatum*.

Ante esta problemática la fitoterapia aplicada a la Odontología se presenta como una eficaz alternativa de tratamiento frente las enfermedades periodontales, porque busca utilizar los principios activos de las plantas medicinales que se encuentran en gran cantidad en la naturaleza, dándole así las características de ser más asequibles y de menor costo, para combatir los microorganismos patógenos causantes de esta enfermedad (Echegaray Rodríguez *et al.*, 2011).

En ese sentido, el propósito de este estudio fue evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* de la planta medicinal denominada "cola de caballo" frente a *F. nucleatum*, importante patógeno periodontal responsable de la gingivitis y estadios iniciales de la periodontitis, para otorgar así evidencia científica que avale en el futuro, su posible uso en colutorios y pastas dentales para el tratamiento alternativo de las enfermedades periodontales.

## MATERIAL Y MÉTODO

Obtención de la planta *E. giganteum* L. (Fig. 1) a tempranas horas de la mañana a mediados del mes de mayo del 2022, en el distrito de Huaquirca, provincia Abancay, departamento de Apurímac, localizado a 3100 m.s.n.m, se ubicó una plantación natural de "cola de caballo", sobre un suelo húmedo y arcilloso, las plantas tenían un tamaño de 2,5 a 3 m de altura.

Se procedió a realizar la cosecha de 5 kg de planta entera con unas tijeras de podar y se almacenó en una bolsa de papel Kraft debidamente rotulada para su posterior transporte.

Una muestra de la planta fue llevada al herbario del Museo de Historia Natural de la UNMSM, para su respectivo reconocimiento taxonómico de la especie determinando que la muestra correspondía a *E. giganteum* L.



Fig. 1. Plantación de *E. giganteum* L., ubicada en el distrito de Huaquirca, Abancay-Apurímac.

Procesamiento y obtención del extracto etanólico de *E. giganteum* L. Se procedió a separar los tallos principales y tallos estériles en buen estado,

de las impurezas de la planta, quedando 1 kg en total de muestra lista para ser procesada. Luego se lavó y desinfectó con NaOCl al 0,5 %. Se colocó esta muestra escogida y desinfectada sobre papel Kraft y se sometió al secado en la estufa a 37 °C durante 5 días. Se pesó 500 gr de planta seca y se procedió a triturar en un molino manual hasta obtener una muestra pulverizada que pasó por un proceso de tamizaje para estandarizar la medida de las partículas. Esto dio como resultado 200 g de muestra pulverizada y estandarizada que fue utilizada para su posterior maceración. Se vertió 200 g de *E. giganteum* L. en polvo, en dos frascos de vidrio BOECO (100 g en cada frasco), y se añadió 700 ml de etanol de 70° en cada frasco, con la finalidad de macerar la muestra con una consistencia que le permita extraer de manera adecuada los principios activos de la planta. Se colocaron los frascos de vidrio en la sombra a temperatura ambiente, y se maceró durante 5 días realizando 2 agitaciones al día, de 10 minutos, en cada frasco. Se separó la fase líquida de la fase sólida del macerado resultante, la fase líquida pasó por un filtrado en papel Whatman N° 4 con ayuda de una bomba de succión; se obtuvo 735 ml de solución filtrada que fue depositada sobre una bandeja de vidrio Pyrex y llevada a la estufa a 35 °C durante 3 días hasta obtener un extracto etanólico seco que pesó 7,6 gr. Luego se procedió a reconstituir este extracto etanólico seco con 76 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) obteniendo así una solución madre de extracto etanólico al 100 % (Fig. 2).



Fig. 2. Se realizaron las respectivas diluciones a partir del extracto madre para obtener las diferentes concentraciones de extracto que fueron almacenados en botellas de vidrio de color ámbar.

**Obtención de las cepas ATCC de *F. nucleatum*.** Se obtuvieron cepas estándar ATCC 25586 de *F. nucleatum*, previamente identificadas por laboratorios MICROBIOLOGICS, las cuales se importaron a través de la casa comercial GENLAB S.A.C., posteriormente se transportaron al laboratorio de Microbiolo-

gía de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, almacenándolas a una temperatura de 6 °C hasta su uso.

**Prueba de actividad antibacteriana frente a *F. nucleatum*.** La cepa de *F. nucleatum* ATCC 25586 se retiró del vial liofilizado y fue sembrado asépticamente (con la ayuda de un mechero Bunsen que brindó un halo de esterilización para evitar la contaminación de la placa Petri), con un asa de siembra estéril en una placa de agar Schaedler enriquecida con 5 % de sangre, se colocó dentro de una jarra de anaerobiosis y se llevó a la incubadora durante 5 días a 37 °C para su reactivación (Fig. 3).

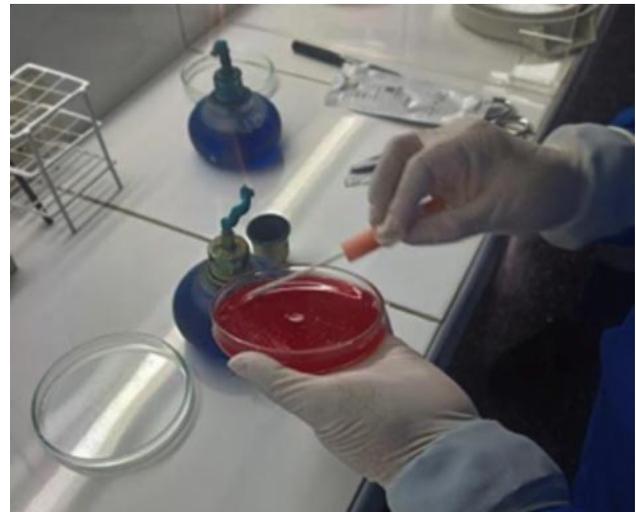


Fig. 3. Se retira el hisopo del vial liofilizado y se siembra sobre el agar Schaedler en un ambiente aséptico.

Una vez reactivada la cepa, se tomaron las colonias con un asa de siembra estéril y se colocaron dentro de un tubo de ensayo con caldo BHI, se homogeneizó la muestra mediante una escala de turbidez de 1 de Mc Farland, que equivalió a  $1 \times 10^8$  UFC/ml, esto con el objetivo de obtener la concentración adecuada de bacterias para su crecimiento.

Se realizó el método de difusión en agar que consistió en sembrar 100 uL de la suspensión del caldo BHI y diseminarlo mediante un hisopo sobre el agar Schaedler. Seguidamente se procedió a depositar sobre los discos de papel filtro, estériles, 10 uL de concentración de extracto al 6,25 %, 12,5 %, 25 %, 50 % y 100 % y sobre 1 disco de papel filtro se depositó 10 uL de gluconato de clorhexidina al 0,12 % y sobre otro disco de papel filtro se depositó 10 uL de suero fisiológico. En total estos 7 discos se colocaron sobre la superficie sembrada del agar Schaedler a una distancia no menor de

15 mm y a 1,5 cm del margen de la placa. Este procedimiento se realizó de manera repetida en 10 placas Petri idénticas sembradas con *F. nucleatum*.

Estas placas Petri debidamente sembradas y con los discos, se transportaron inmediatamente a la jarra de anaerobiosis con el reactivo de anaerobiosis y se incubaron a 37 °C durante 7 días (Fig. 4).

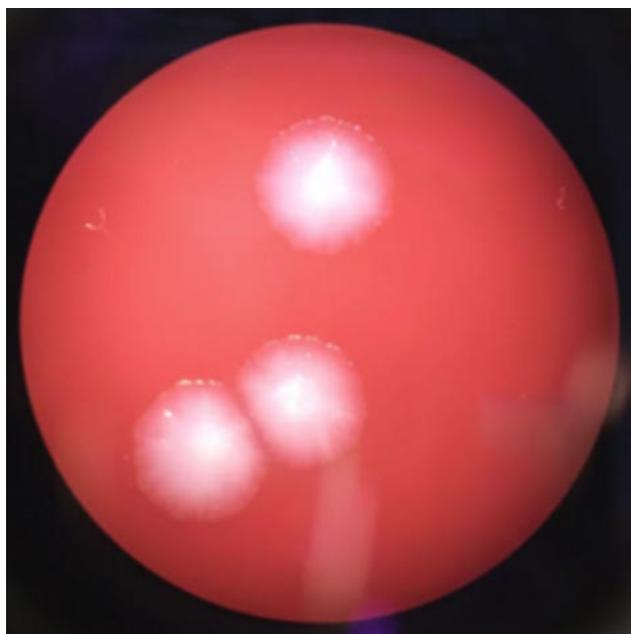


Fig. 4. Características macroscópicas de *F. nucleatum*, se observan colonias blanquecinas de aproximadamente 02 mm de diámetro con apariencia "manchada" o "miga de pan" como menciona la literatura.

**Análisis de datos.** Al obtener resultados negativos el análisis no utilizó pruebas estadísticas, se basó en describir detalladamente mediante el instrumento de recolección de datos los resultados de la investigación (Tabla I).

## RESULTADOS

No se evidenciaron halos de inhibición significativos para ser medidos en ninguna de las concentraciones del extracto etanólico en estudio, en ninguna de las placas. Los controles positivos de gluconato de clorhexidina al 0,12 % sí evidenciaron halos de inhibición posicionándose estas medidas dentro del rango de sensibilidad media en la escala de Duraffourd (Fig. 5). Los controles negativos de suero fisiológico no generaron halos de inhibición en ninguna de las placas en estudio.

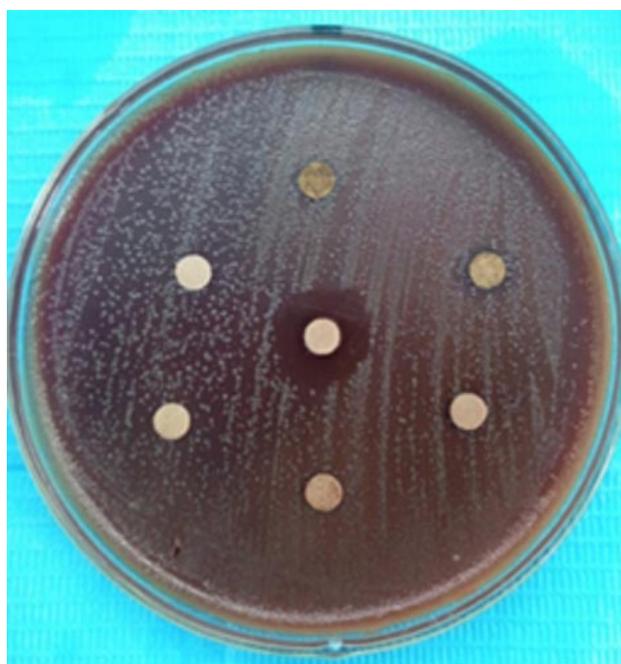


Fig. 5. Placa representativa donde se observa el halo de inhibición formado por los discos del control positivo, y el nulo efecto antibacteriano que mostraron las diferentes concentraciones del extracto.

Tabla I. Consolidación de resultados de los halos de inhibición de las 10 placas Petri.

	Halos de inhibición										Promedio B
	Placa Petri N° 01	Placa Petri N° 02	Placa Petri N° 03	Placa Petri N° 04	Placa Petri N° 05	Placa Petri N° 06	Placa Petri N° 07	Placa Petri N° 08	Placa Petri N° 09	Placa Petri N° 10	
Extracto etanólico al 100 %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Extracto etanólico al 50 %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Extracto etanólico al 25 %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Extracto etanólico al 12.5 %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Extracto etanólico al 6.25 %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Control positivo	16.79 mm	17.62 mm	17.74 mm	17.39 mm	16.83 mm	16.91 mm	16.72 mm	16.67 mm	16.85 mm	17.25 mm	17.077 mm
Control negativo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

## DISCUSIÓN

Durante la revisión bibliográfica, previa a la ejecución de esta investigación, se encontraron estudios realizados en Perú, que utilizaron el término de *Equisetum arvense* para referirse a una especie de "cola de caballo" en autores como Choque Quispe (2020) y Cáceres Lupaca (2018), sin embargo, durante la etapa de recolección de la planta, se evidenció que existe una confusión en la identificación taxonómica de esta, siendo *E. giganteum* L., la especie más abundante que crece en territorio peruano, situación que no sucede con *E. arvense* que crece en otros países con otros tipos de clima; este aspecto metodológico posiblemente contribuyó en la obtención de los resultados contradictorios del presente estudio frente a las investigaciones mencionadas, ya que al tratarse del mismo género pero diferente especie de planta varían aspectos cuantitativos en la composición química y obtención de metabolitos secundarios de dicha planta medicinal (Acosta de la Luz, 2003). Pese a esto, la gran cantidad de investigaciones que se encuentran en revistas internacionales pertenecen a *E. arvense*, por lo cual se tomaron como base de referencia para la elaboración de esta investigación.

El presente estudio contradice a Choque Quispe (2020), que comprobó la efectividad del extracto etanólico de *E. arvense* "cola de caballo", esta planta fue obtenida en Ilabaya-Tacna difiriendo de nuestra metodología de obtención realizada en Apurímac. Además en el proceso de elaboración si bien es cierto se siguió una metodología muy similar en el procesamiento de la planta, al realizar las disoluciones para las concentraciones del extracto se utilizó etanol de 70°, a diferencia del DMSO utilizado como disolvente como parte de nuestra metodología.

Es importante la utilización del DMSO como disolvente orgánico para la disolución de este tipo de extractos medicinales, ya que garantiza que todos los metabolitos secundarios sean homogenizados en la solución

Otra diferencia metodológica en contraste a la investigación de Choque Quispe (2020) fue la utilización del agar Tripticasa Soya como medio cultivo de anaerobios estrictos ya que el agar Schaedler enriquecido con 5 % de sangre de cordero es el medio de cultivo ideal para bacterias anaerobias estrictas como *F. nucleatum*. Otro punto importante a mencionar es la elección del control positivo, ya que Choque Quispe (2020) utilizó el gluconato de clorhexidina en la presentación

de la marca Perio-Aid®, sin embargo en nuestra metodología lo utilizamos en la marca Periogard®, esto con fines de pureza de producto ya que la primera marca mencionada además de tener el principio activo contiene aditivos como el CPC (cloruro de cetilpiridinio) lo cual podría causar sesgos en la investigación al no tratarse del antiséptico puro, a diferencia de Periogard® que solo contiene en su composición básicamente al gluconato de clorhexidina al 0,12 %.

Las bacterias periodontopatógenas que conforman el complejo rojo y naranja tienen la característica de ser bastante exigentes para su crecimiento, por lo cual requieren un medio de cultivo enriquecido y un ambiente de anaerobiosis estricta (Socransky & Haffajee, 2002), esto último genera algunas limitaciones durante la ejecución de los estudios experimentales ya que su delicado manejo origina que en muchas ocasiones las cepas no presenten el crecimiento que se requiere y se necesitan varios intentos hasta obtener resultados óptimos, esto genera que publicar este tipo de estudios involucre una mayor cantidad de inversión de tiempo y esfuerzo por parte del investigador.

Hasta el momento no se había reportado en la literatura sobre el efecto antibacteriano de *E. giganteum* L. frente a cepas de *F. nucleatum*, limitando la comparación de antecedentes que utilizan otras bacterias periodontopatógenas, además debemos tener en cuenta la naturaleza de las bacterias periodontopatógenas que, si bien son complementarias, son microorganismos con distintos factores de virulencia que podría hacer a uno más resistente que a otro.

Por otro lado, los resultados obtenidos en esta investigación guardan relación con lo investigado por García Arroyo (2013) y Pensantes-Sangay *et al.* (2020), quienes al evaluar el efecto antibacteriano de determinadas plantas medicinales frente a bacterias como periodontopatógenas, obtuvieron como resultado que *F. nucleatum* tiene un mayor grado de resistencia antibacteriana en comparación a otras bacterias periodontopatógenas.

Autores como (Ramos-Perfecto *et al.*, 2020) apoyan los resultados de la presente investigación ya que en su estudio de revisión bibliográfica refiere que *F. nucleatum* ha presentado en algunas investigaciones una alta resistencia, incluso a medicamentos como amoxicilina y metronidazol, que, a pesar de no formar parte del complejo rojo, esta bacteria se posiciona como una de las más versátiles y resistentes de la microbiota periodontopatógena. Es importante seguir incentivando

el descubrimiento de nuevos agentes antibacterianos frente a *F. nucleatum* dirigidos a su fuerte capacidad de adhesión e invasión (Han, 2015), porque además de brindar nuevas soluciones frente a la enfermedad periodontal, busca contrarrestar el impacto de las enfermedades sistémicas relacionadas directamente con esta bacteria, como el cáncer colorrectal (CCR), considerada la 4ta causa de muerte principal en el mundo (Su *et al.*, 2023).

## CONCLUSIONES

Se determinó que las cepas ATCC de *Fusobacterium nucleatum* no son sensibles al extracto etanólico de *E. giganteum* L. por lo que se recomienda utilizar otras especies de esta planta para evaluar su efecto antibacteriano.

**AGRADECIMIENTOS** . Agradecemos el apoyo del Laboratorio de Microbiología de la F.O de la UNMSM.

**HUACHACA, E.; RAMOS-PERFECTO, D. & MOROMI, N. H.** Antibacterial effect of the ethanolic extract of equisetum giganteum L. "horsetail" against fusobacterium nucleatum, a microorganism associated with periodontal disease. *Int. J. Odontostomat.*, 17(4):414-419, 2023.

**ABSTRACT:** Phytotherapy applied to Dentistry is presented as an effective alternative treatment against periodontal diseases (PD) because it seeks to use the active ingredients of medicinal plants that are found in large quantities in nature, thus giving it the characteristics of being more affordable. and at a lower cost, to combat the pathogenic microorganisms that cause PE. Objective: to determine the *in vitro* antibacterial effect of the ethanolic extract of *Equisetum giganteum* L. against ATCC strains of *Fusobacterium nucleatum*. Material and methods: The study was of a non-probabilistic experimental type and consisted of a total of 10 Petri dishes seeded with *F. nucleatum*. Ethanolic extract of *E. giganteum* L. was used in concentrations of 100, 50, 25, 12.5 and 6.25 %. The agar diffusion method was used and 10 plates were incubated at 37 °C for 07 days. The inhibition halos were measured with a digital vernier, and these data were subsequently analyzed. Results: No significant inhibition halos were found in any of the embedded disks with the different concentrations in the 10 Petri dishes seeded with *F. nucleatum*, but without chlorhexidine, the chemical agent used as a positive control. Conclusions: an *in vitro* antibacterial effect of the ethanolic extract of *E. giganteum* L. was not determined against *F. nucleatum*, in any of its concentrations.

**KEY WORDS:** periodontal diseases, *Equisetum*, *Fusobacterium nucleatum*, antibacterial, plant extract.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta de la Luz, L. Principios agroclimáticos básicos para la producción de plantas medicinales. *Rev. Cuba. Planta Med.*, 8(1), 2003. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962003000100008&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962003000100008&lng=es&nrm=iso)
- Cáceres Lupaca, K. *Efecto Antibacteriano in vitro del Extracto de Equisetum arvense (Cola de Caballo) sobre el Streptococcus mutans, Puno – 2018*. Puno, Universidad Nacional del Altiplano, 2018. Disponible en: <https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/3278374>
- Choque Quispe, E. B. *Efecto Antibacteriano del Extracto Etanólico de Equisetum arvense (Cola de Caballo) sobre la Porphyromonas gingivalis atcc 33277 - Estudio in vitro*. Tacna 2020. Tacna, Universidad Privada de Tacna, 2020. Disponible en: <https://repositorio.upt.edu.pe/handle/20.500.12969/1614>
- Echegaray Rodríguez, J. R.; Echegaray González, P.; Mosquera Fernández, A. & Gerrikaetxebarria Peña, J. Fitoterapia y sus aplicaciones. *Rev. Esp. Podol.*, 22(6):258-67, 2011.
- García Arroyo, R. L. *Efecto Antimicrobiano de la Óleo-Resina de Copaifera officinalis sobre Principales Cepas Bacterianas Periodontopatógenas de la Cavidad Bucal*. Lima, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2013. Disponible en: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/3460>
- Han, Y. W. *Fusobacterium nucleatum: A commensal-turned pathogen*. *Curr. Opin. Microbiol.*, 23:141-7, 2015.
- León, B. La cola de caballo (*Equisetum*, *Equisetaceae*) comercializada y exportada del Perú. *Rev. Peru. Biol.*, 19(3):345-6, 2013.
- Pensantes-Sangay, S. J.; Calla-Poma, R. D.; Requena-Mendizabal, M. F.; Alvino-Vales, M. I. & Millones-Gómez, P. A. Chemical composition and antibacterial effect of Plantago Major extract on periodontal pathogens. *Pesqui. Bras. Odontopediatr. Clin. Integr.*, 20:e0012., 2020.
- Ramos-Perfecto, D.; Maita Véliz, L. & Piscoche-Botello, C. *Fusobacterium nucleatum un comensal puente con otros microorganismos patógenos de la periodontitis*. *KIRU*, 17(4):230-6, 2020.
- Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol.* 2000, 28:12-55, 2002.
- Su, S.; Bu, Q.; Bai, X.; Huang, Y.; Wang, F.; Hong, J.; Fang, J. Y.; Wu, S. & Sheng, C. Discovery of potent natural product higenamine derivatives as novel anti-fusobacterium nucleatum agents. *Bioorg. Chem.*, 138:106586, 2023.
- World Health Organization (WHO). *Oral Health*. Website. Geneva, World Health Organization, 2020. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>

Dirección para correspondencia:  
Donald Ramos Perfecto  
Laboratorio de Microbiología  
Facultad de Odontología  
Universidad Nacional Mayor de San Marcos  
Ciudad Universitaria  
Av. German Amezaga S/N  
Lima  
PERÚ

E-mail: [dramosp@unmsm.edu.pe](mailto:dramosp@unmsm.edu.pe)