

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA “*In vitro*” DEL ACEITE  
ESENCIAL Y EXTRACTO ETANÓLICO DE *Equisetum arvense*  
“COLA DE CABALLO” FRENTE A *Escherichia coli* Y *Candida*  
*albicans* UROPATÓGENAS.**

**TESIS**

**PRESENTADA POR:**

**Br. YUDITH MARIELA CALSIN HUAYTA**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PUNO – PERÚ**

**2017**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**

**TESIS**

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA “*In vitro*” DEL ACEITE ESENCIAL Y EXTRACTO  
ETANÓLICO DE *Equisetum arvense* “COLA DE CABALLO” FRENTE A *Escherichia  
coli* Y *Candida albicans* UROPATÓGENAS.**



**PRESENTADA POR:**

Br. YUDITH MARIELA CALSIN HUAYTA

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 28 DE SEPTIEMBRE DEL 2017

**APROBADO POR EL JURADO REVISOR:**

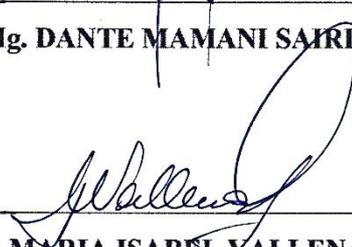
**PRESIDENTE:**

  
Mg. MARTHA E. APARICIO SAAVEDRA

**PRIMER MIEMBRO:**

  
Mg. DANTE MAMANI SAIRITUPAC

**SEGUNDO MIEMBRO:**

  
Mg. MARIA ISABEL VALLENAS GAONA

**DIRECTOR / ASESOR:**

  
Dr. JUAN JOSE PAURO ROQUE

**ÁREA:** CIENCIAS BIOMÉDICAS  
**LÍNEA:** DIAGNOSTICO Y EPIDEMIOLOGIA  
**TEMA:** BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

## DEDICATORIA

*... a Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.*

*... Con eterna gratitud a mis padres, Adolfo Calsin y Gladys Huayta inculcarme principios, valores y brindarme todo su apoyo y cariño.*

*... a Ever Jonatan por su amor incondicional, por apoyarme y alentarme para continuar, cuando parecía que me iba a rendir.*

*A mi hermana Leticia por todo su cariño y porque a pesar de sus defectos, es una gran persona.*

*Yudith M. Calsin Huayta.*

## AGRADECIMIENTO

- A la primera casa superior de estudios, la Universidad Nacional del Altiplano y a la Facultad de Ciencias Biológicas, por acogerme y brindarme la oportunidad de formarme profesionalmente.
- A los docentes de la Escuela Profesional de Biología, que con su conocimiento y enseñanza contribuyeron en mi formación académica.
- Agradezco de manera muy especial a mi director de tesis, Dr. Juan José Pauro Roque, quien dirigió esta tesis e hizo posible su culminación, por su motivación y su apoyo intelectual.
- Al presidente del jurado calificador de esta tesis Mcs. Martha Elizabeth Aparicio Saavedra y a los dos miembros de jurado, Mg. Dante Mamani Sairitupac y Mg. Maria Isabel Vallenas, por la disponibilidad, valiosas ideas y sugerencias durante las revisiones, correcciones del proyecto de investigación y dictamen del borrador de tesis.
- A la Dra. Youri Teresa del Carpio Condori, por facilitarme el uso del Laboratorio de Microbiología.
- Al técnico del Laboratorio de Microbiología de la FCCBB, Leónidas Teves, por brindarme las facilidades necesarias para realizar este trabajo.
- A la facultad de ingeniería Química de la UNA – Puno y al Ing. Jorge Quien me facilito el uso del equipo del Laboratorio de Operaciones y Procesos Unitarios.
- A mis amigos, quienes me ayudaron en la realización de este trabajo.
- A todas las personas que contribuyeron en alguna manera, me brindaron ideas y consejos para que se culmine mi proyecto de investigación.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	10
ABSTRACT .....	11
I. INTRODUCCIÓN .....	12
1.1. Objetivo general: .....	13
1.1.1. Objetivos específicos: .....	14
1.2. Hipótesis general: .....	14
1.2.1. Hipótesis específicas: .....	14
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	15
2.1. Antecedentes .....	15
2.2. Marco teórico.....	18
2.2.1. Plantas medicinales .....	18
2.2.2. Aceites esenciales .....	19
2.2.3. Extractos etanólicos .....	19
2.2.4. <i>Equisetum arvense</i> L. (cola de caballo).....	20
2.2.5. <i>Escherichia coli</i> .....	22
2.2.6. <i>Candida albicans</i> .....	23
2.2.7. Gentamicina .....	23
2.2.8. Fluconazol.....	24
2.3. Marco conceptual .....	26
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	28
3.1. Área de estudio .....	28
3.2. Tipo de estudio .....	28
3.3. Población y muestra.....	28
3.4. Diseño de investigación.....	29
3.5. Metodología .....	30

IV. RESULTADOS Y DISCUSION.....	40
4.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) <i>in vitro</i> del aceite esencial y extracto etanólico de <i>Equisetum arvense</i> “cola de caballo“, frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 Y <i>Candida albicans</i> .....	40
4.2. Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 Y <i>Candida albicans</i> frente al aceite esencial y extracto etanólico de <i>Equisetum arvense</i> comparado con los fármacos gentamicina y fluconazol.....	45
V. CONCLUSIONES.....	56
VI. RECOMENDACIONES .....	57
VII. REFERENCIAS.....	58
ANEXOS.....	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cola de caballo ( <i>Equisetum arvense</i> L.) en su hábitat natural, distrito de Marangani (Cusco), en el mes de Marzo 2017. ....	20
<b>Figura 2.</b> Estructura química de la Gentamicina. ....	24
<b>Figura 3.</b> Estructura química del Fluconazol. ....	25
<b>Figura 4.</b> Diagrama de flujos de proceso de obtención de extractos etanólicos. ....	33
<b>Figura 5.</b> Diferencia estadística significativa del efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>Equisetum arvense</i> a diferentes dosis, comparado con el antibiótico Gentamicina, obtenidos en la Facultad de Ciencias Biológicas UNA – Puno, durante abril a junio del 2017. ....	47
<b>Figura 6.</b> Diferencia estadística significativa del efecto antibacteriano del extracto etanólico de <i>Equisetum arvense</i> a diferentes dosis, comparado con el antibiótico Gentamicina, obtenidos en la Facultad de Ciencias Biológicas UNA – Puno, durante abril a junio del 2017. ....	51
<b>Figura 7.</b> Diferencia estadística no significativa de los diámetros de halos de inhibición según extractos etanólicos y aceites esenciales de <i>Equisetum arvense</i> a concentraciones de 1, 5, 10, 25, 35, 50 $\mu$ L, durante abril a junio 2017. ....	53
<b>Figura 8.</b> Susceptibilidad antimicrobiana de <i>Candida albicans</i> frente al extracto etanólico y aceite esencial de <i>Equisetum arvense</i> (cola de caballo), Facultad Ciencias Biológicas, UNA-Puno, abril - junio del 2017. ....	54
<b>Figura 9.</b> Recolección de plantas de <i>Equisetum arvense</i> (cola de caballo), recolectado en Marangani, durante febrero a marzo del 2017. ....	63
<b>Figura 10.</b> Secado de plantas de <i>Equisetum arvense</i> (cola de caballo), realizado en Puno, durante marzo del 2017. ....	63
<b>Figura 11.</b> Obtención de aceite esencial de <i>Equisetum arvense</i> por el método de destilación de arrastre por vapor, Facultad de Ingeniería Química, UNA-Puno. durante abril a junio 2017. ....	64
<b>Figura 12.</b> Obtención de extracto etanólico por el método de maceración al frío. Facultad de Ciencias Biológicas UNA – Puno, durante abril a junio del 2017. ....	64

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diseño experimental para determinar la CMI del aceite esencial y extracto etanólico frente a <i>Escherichia coli</i> y <i>Candida albicans</i> . .....	29
Tabla 2. Diseño experimental para la susceptibilidad antimicrobiana de <i>Escherichia coli</i> y <i>Candida albicans</i> . .....	30
Tabla 3. Tabla estandarizada de medida de halos de inhibición (mm). .....	38
Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria (CMI) “ <i>in vitro</i> ” del aceite esencial de “cola de caballo” frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922. Obtenidos en la Facultad de Ciencias Biológicas UNA – Puno, durante abril a junio del 2017.....	40
Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria (CMI) por acción antibacteriana <i>in vitro</i> del extracto etanólico de Cola de caballo frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922. Obtenidos en la Facultad de Ciencias Biológicas UNA – Puno, durante abril a junio del 2017. ....	42
Tabla 6. Diámetro de halos de inhibición (en mm) y porcentajes de inhibición, tratados con diferentes dosis de aceite esencial (1, 5, 10, 25, 35, 50 µl) de <i>Equisetum arvense</i> , comparado con el control positivo (Gentamicina) frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, obtenidos en la Facultad de Ciencias Biológicas UNA – Puno, durante abril a junio del 2017. ....	46
Tabla 7. Categorización de la susceptibilidad de <i>Escherichia coli</i> frente al aceite esencial de <i>Equisetum arvense</i> “Cola de caballo”, según diámetro del halo de inhibición, obtenidos en la Facultad de Ciencias Biológicas UNA – Puno, durante abril a junio del 2017. ....	47
Tabla 8. Diámetro de halos de inhibición en (mm) tratados con concentraciones de extracto etanólico, comparado con el control positivo (Gentamicina), obtenidos en la Facultad de Ciencias Biológicas UNA – Puno, durante abril a junio del 2017. ....	49
Tabla 9. Categorización del Extracto etanólico de <i>Equisetum arvense</i> “Cola de caballo” frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 según diámetro del halo de inhibición, obtenidos en la Facultad de Ciencias Biológicas UNA – Puno, durante abril a junio del 2017. ....	50

## ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

%: Porcentaje

°C: Grados centígrados

ANOVA: Analysis Of Variance

ATCC: American Type Culture Collection

BaCl<sub>2</sub>: Cloruro de bario

CERITS: Centro de Referencia de Infecciones de Transmisión Sexual

cm: Centímetro

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CVV: Candidiasis vulvo vaginal

D.C.A: Diseño completamente al azar

DHI: Diámetro de halo de inhibición

g: Gramos

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Acido sulfúrico

INS: Instituto Nacional de Salud

ITU: Infecciones de tracto urinario

kg: Kilogramos

ml: Mililitro

mm: Milímetro

msnm: Metros sobre el nive del mar

OMS: Organización Mundial de la Salud

ppm: Partículas por millón

SDA: Sabouraud Agar

TLRs: Receptores Toll Like

TSA: Tripticasa Soya Agar

UFC:Unidad formadora de colonia

VB: Vaginosis bacteriana

µg: microgramos

µl: microlitros

## RESUMEN

En la actualidad *Escherichia coli* y *Candida albicans* son los uropatógenos más frecuentes tanto a nivel mundial como en el Perú, debido a que cuentan con factores de virulencia y una constante resistencia a fármacos, esto hace que sea un problema para la salud pública, por tanto, se sugiere una alternativa de control utilizando una planta medicinal conocida como “cola de caballo” (*Equisetum arvense*). En tal sentido se plantearon los objetivos: Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial y extracto etanólico de *Equisetum arvense* (cola de caballo) frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Candida albicans*, seguidamente determinar la susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Candida albicans* frente al aceite esencial y extracto etanólico de “cola de caballo” comparado con los fármacos comerciales gentamicina y fluconazol. La extracción del aceite esencial se realizó por el método de arrastre a vapor de agua y la obtención del extracto etanólico por el método de maceración en frío. La concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial y extracto etanólico se determinó por el método de dilución en placa a dosis de 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2.5 y 5 % y para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana, se empleó el método de difusión en placa (Kirby-Bauer) a dosis de 1 µl, 5 µl, 10 µl, 25 µl, 35 µl y 50 µl de aceite esencial y extracto etanólico, teniendo como controles positivos los antibióticos gentamicina y fluconazol. La CMI del aceite esencial de *Equisetum arvense*, frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 *in vitro* fue 1.0 % y 2.5% para el extracto etanólico, mientras que para *Candida albicans* las concentraciones de aceite esencial y extracto etanólico no fueron las suficientes para determinar la CMI. Por otro lado en la susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* ATCC 25922, el porcentaje de inhibición del aceite esencial y extracto etanólico a mayores dosis (35 y 50 µl) fueron superiores al control (Gentamicina 10 µg) con 57% y 27% por encima de dicho control, estos datos fueron analizados estadísticamente mediante pruebas de análisis de varianza y pruebas de rango múltiple de Tukey, en la que presentaron diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ), mientras tanto la cepa de *Candida albicans* resultó resistente a las dosis aplicadas.

**Palabras Clave:** aceite esencial, extracto etanólico, *Equisetum arvense*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans*, concentración mínima inhibitoria.

## ABSTRACT

Currently, *Escherichia coli* and *Candida albicans* are the most frequent uropathogens both worldwide and in Peru, because they have virulence factors and constant resistance to drugs, this makes it a problem for public health, therefore, a control alternative is suggested using a medicinal plant known as horsetail (*Equisetum arvense*). In this sense, the objectives were set. To determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of the essential oil and ethanolic extract of *Equisetum arvense* horsetail against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Candida albicans* and to determine the antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Candida albicans* against essential oil and ethanolic extract of "Horsetail" compared to commercial drugs gentamicin and fluconazole. The extraction of the essential oil was carried out by the method of drag to steam of water and the obtaining the ethanolic extract by the cold maceration method. The determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of the essential oil and ethanolic extract was performed by the plate dilution method at doses of 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2.5 and 5%. To determine the antimicrobial susceptibility of the essential oil and ethanolic extract, the plate diffusion method (Kirby-Bahuer) was used in doses of 1  $\mu$ l, 5  $\mu$ l, 10  $\mu$ l, 25  $\mu$ l, 35  $\mu$ l and 50  $\mu$ l of essential oil and ethanolic extract, having as positive controls the antibiotics gentamicin for *E. coli* ATCC and fluconazole for *C. albicans*. The CMI of the essential oil of *Equisetum arvense* against *Escherichia coli* ATCC 25922 in vitro was 1.0% and 2.5% for ethanolic extract, whereas for *Candida albicans* the concentrations of essential oil and ethanolic extract were not sufficient to determine the CMI. On the other hand, in the antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* ATCC 25922, the percentage of inhibition of the essential oil and ethanol extract at higher doses were higher than the control (Gentamicin) with 57% and 27% above said control, these data were analyzed statistically ( $P < 0.05$ ), whereas strains of *Candida albicans* were resistant to the applied doses.

**Keywords:** Essential oil, ethanolic extract, *Equisetum arvense*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* uropathogen, minimal inhibitory concentration.

## I. INTRODUCCIÓN

Desde épocas remotas el hombre siempre ha buscado y encontrado remedios para sus enfermedades en la naturaleza, especialmente en los vegetales, constituyendo así que hoy en día el uso de los recursos de las plantas medicinales es una gran alternativa para preservar y recuperar la salud sobre todo en comunidades aisladas, constituyendo motivos suficientes para profundizar el conocimiento de nuestras especies de plantas medicinales, por tanto el presente trabajo de investigación se basa en la actividad antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial y extracto etanólico de *Equisetum arvense* “cola de caballo” frente a la supervivencia de cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Candida albicans*, el cual fue desarrollado en la Universidad Nacional del Altiplano - Puno, en la Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Biología.

Por otro lado las infecciones de tracto urinario (ITU), son uno de los problemas de salud pública, ya que se estima que globalmente ocurren al menos 150 millones de casos de ITU por año (1), mientras en el Perú, de todos los casos de infecciones asociadas a la atención en salud el 19% es por ITU (2), y de todos los casos, *Escherichia coli* es el microorganismo más frecuentemente aislado en todos los tipos de infección de tracto urinario, presentes en infecciones intrahospitalarias con 50% y extrahospitalarias con 63% (3), no obstante las infecciones urinarias por levaduras del género *Candida sp.*, también son cada vez más prevalentes en pacientes hospitalizados, especialmente en grupos de mayor riesgo como puede ser en pacientes con neoplasia hematológica que se encuentran bajo tratamiento de quimioterapia y en cuidados intensivos (4), es así que en los casos de flujo vaginal, la vaginosis bacteriana (VB) representa el 50% y la candidiasis vulvovaginal (CVV) el 30 a 35%, por eso considera que es la segunda causa más frecuente del síndrome de flujo vaginal (5).

Sin embargo el problema no solo es la prevalencia con la que *Escherichia coli* y *Candida albicans* afectan a la población causando infecciones de tracto urinario, sino que cada vez estos microorganismos se hacen resistentes a una variedad de fármacos, siendo así que la resistencia bacteriana de *Escherichia coli* a los antibióticos se relaciona con el consumo inadecuado de éstos, ya que la presión selectiva que ejercen, es favorable en la creación, adaptación y diseminación de mecanismos de resistencia a los antimicrobianos (1) y por lo tanto se reconoce la influencia que ejerce la emergencia de bacterias con patrones de resistencia en la gravedad de este tipo de infecciones(6), a

tal punto que se considera un problema de salud pública, tanto en el ámbito nosocomial como en el comunitario.

Por todo ello la fitoterapia o tratamiento con plantas medicinales está siendo cada vez más aceptada en los diferentes niveles sociales, a pesar de tener una larga historia de saber popular esta ha sido menospreciada por los profesionales de salud hace algunos años (7), por tanto, es evidente que los remedios a base de plantas medicinales presentan una gran ventaja con respecto a los tratamientos químicos, ya que las plantas y sus principios activos se hallan siempre biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias que se potencian entre sí, de tal manera que en general no se acumulan en el organismo y sus defectos indeseables están limitados (8). Dentro de la variedad de plantas medicinales en el Perú, encontramos a *Equisetum arvense* (cola de caballo), la cual es una de las hierbas medicinales más usadas en el mundo y no es casualidad, ya que esta planta brinda un número importante de beneficios y propiedades que pueden ayudar a superar muchos padecimientos y molestias.

Por tanto este trabajo de investigación contiene información producto de datos obtenidos del desarrollo de la tesis sobre la actividad antimicrobiana de una hierba nativa “Cola de caballo”, por ende la culminación de esta tesis es suma importancia para corroborar, aplicar y desarrollar los conocimientos teóricos y prácticos que se adquieren durante la formación profesional, aportando criterios en los procesos tecnológicos desarrollados, finalmente toda la información científica que se brinda a través de la tesis, contribuirá al mejor conocimiento de nuestra realidad y esperamos que estimule a futuros trabajos de investigación a fin de ir resolviendo gradualmente la validación científica de estos importantes recursos de la zona sur peruana.

En tal sentido, se plantearon los siguientes objetivos e hipótesis:

### **1.1. Objetivo general:**

Determinar la actividad antimicrobiana del aceite esencial y extracto etanólico de *Equisetum arvense* “Cola de caballo” *In vitro*, frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans* uropatogenas.

### 1.1.1. Objetivos específicos:

- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial y extracto etanólico de *Equisetum arvense* “cola de caballo” *In vitro*, frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Candida albicans* uropatógenas.
- Determinar la susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Candida albicans* uropatógenas *In vitro*, frente al aceite esencial y extracto etanólico comparado con los fármacos gentamicina y fluconazol.

### 1.2. Hipótesis general:

El aceite esencial y el extracto etanólico de *Equisetum arvense* “cola de caballo”, tienen actividad antimicrobiana *in vitro* frente a uropatógenos como *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

#### 1.2.1. Hipótesis específicas:

- La concentración mínima inhibitoria del aceite esencial y extracto etanólico de *Equisetum arvense* frente a *Escherichia coli* ATCC y *Candida albicans* estarán dentro del rango de concentración del 0.1 a 5%.
- La susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* ATCC y *Candida albicans* frente a las diferentes dosis de aceite esencial y extracto etanólico de *Equisetum arvense*, comparado con los fármacos comerciales, tendrán diferente efecto inhibitorio.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Antecedentes

La actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y metanólicos de *Equisetum arvense* (cola de caballo) se demostró por estudios realizados en diferentes lugares, en la que se aplicaron determinadas concentraciones de los extractos para demostrar si la planta cola de caballo causa efectos inhibitorios frente a *Aeromonas spp.*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* ATCC 25922, los resultados fueron favorables obteniendo así, halos de inhibición de 11 mm para *Escherichia coli* ATCC 25922 (9, 10). Por otro lado un estudio evaluó el efecto del extracto de “cola de caballo” *Equisetum arvense* obtenido por destilación, cocción, infusión y maceración para el control de roya *Puccinia sp.* en el cultivo de cebolla blanca *Allium fistulosum*, aplicando tres concentraciones de cada extracto (5%, 10% y 15%), todos los tratamientos que tuvieron aplicación de extracto de cola de caballo sin importar el método de extracción ni la dosis tuvieron un rendimiento estadísticamente igual (11).

El aceite esencial de ajeno (*Artemisia absinthium* L.) también demuestra causar efecto inhibitorio frente a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), tal como lo demuestra un estudio donde en los resultados se observó que a concentraciones de aceite esencial superiores a 5  $\mu$ l/l inhibió a dicha bacteria y comportándose como resistente a 1  $\mu$ l/l, en tanto la concentración mínima inhibitoria (CMI) fue 32.81  $\mu$ l/l (12), así como también el aceite esencial de *Matricaria recutita* (manzanilla), tiene efecto antibacteriano sobre cepas de *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* presentando una actividad bactericida con una concentración inhibitoria mínima del 4% en el caso *Streptococcus pyogenes* y 3% para *Staphylococcus aureus* (13).

Por otro lado el aceite esencial del chiri-chiri (*Grindelia boliviana*) también muestra efecto bactericida inhibiendo el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC *in vitro* a partir de la concentración de 5 $\mu$ l/l con 5.74 mm de halo de inhibición, el mayor efecto bactericida se observó en la concentración de 75 $\mu$ l/l con 14.24mm de halo de inhibición, en tanto la concentración mínima inhibitoria fue estimada en 1.12  $\mu$ l/l (14), efectos similares causa el aceite esencial de menta (*Mentha piperita* L.) frente a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), estimando una concentración mínima inhibitoria a una dosis del 2.5 % (15).

No obstante también hay plantas que tienen propiedades antifúngicas, así como lo refieren las revisiones bibliográficas, dentro de ellas está el estudio realizado con “romero” *Rosmarinus officinalis* y “tomillo” *Thymus vulgaris*, los resultados estiman que la concentración de 10 000 ug/ml origina mayor inhibición del crecimiento de *Candida albicans*, mientras que la CMI fue 1000 ug/ml (16), la “muña” *Minthostachys mollis* tiene las mismas propiedades inhibiendo así a cepas de *Candida albicans* con un promedio de halo de inhibición de 29 mm a una dosis de 1ml/250µl, mostrándose así sensible a dicho aceite esencial (17).

La acción antimicrobiana de las plantas, depende mucho de los compuestos activos presentes en ellas, los más importantes son los aceites esenciales ricos en fenoles, como es el caso del tomillo que contiene altos porcentajes de timol y carvacrol, clavo de olor (*Eugenia caryophyllus*) contiene eugenol e isoeugenol, y las esencias con alcoholes y cetonas: menta (mentol y mentona), orégano (carvacrol y timol) es que gracias a esta actividad, las esencias son muy usadas para problemas de las vías respiratorias, como antiséptico bucal y para infecciones urinarias (18).

En tanto en la composición química del aceite esencial de *Equisetum arvense* (Cola de caballo), identificaron 25 componentes, siendo los de mayor porcentaje el Hexahydrofarnesyl acetone (18.34%), cis-geranyl acetone (13.74%), thymol (12.09%), trans-phytol (10.06%) y Carvacrol (7.5%), este mismo aceite esencial fue aplicado para determinar el efecto inhibitorio *in vitro* de cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enteritidis*, los resultados fueron favorables ya que todas éstas fueron sensibles a una dilución de 1:10 (19). Según la bibliografía el Carvacrol y Timol son componentes que tienen la capacidad de destruir la estructura de la membrana celular microbiana, causando el incremento de su permeabilidad y por consiguiente la salida de iones inorgánicos, ATP, ácidos nucleicos y aminoácidos, etc (20).

Algunos autores refieren también, que la planta “cola de caballo” contiene muchos minerales (Sílice, calcio, magnesio, cromo, hierro, manganeso, potasio); ácidos (salicílico, málico, esquisético), saponinas, nicotina, glucosidos, flavonoides, taninos y fitosteroles, alcaloides, muchos de los cuales poseen comprobados efectos protectores y curativos (21). Dentro de los esteroides tienen el beta-sitosterol (60%), campesterol (32.9%), isofucoesterol (5.9%), colesterol (trazas), así como también trazas de alcaloides piridínicos como la equisetina, nicotina, palustrina, 3-metoxipiridina, equispermina y equisetopirona (22).

## **2.2. Marco teórico**

### **2.2.1. Plantas medicinales**

Una planta medicinal es cualquier especie vegetal que posee sustancias que pueden ser empleadas para intereses terapéuticos y cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos (8), estas plantas también tienen relevantes aplicaciones en la medicina moderna y entre otras, se emplean como materia prima para la fabricación de medicamentos semisintéticos más complejos, la estructura química de sus principios activos puede de uso para modelo de la elaboración de drogas sintéticas y tales principios se pueden utilizar como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos (23).

#### **Plantas medicinales en el Perú**

El Perú es un país que posee una gran biodiversidad y experiencia en la utilización tradicional de plantas medicinales, fuente de recursos naturales para la investigación y desarrollo de fitomedicamentos (24), por ello diversos pueblos indígenas del Perú vienen utilizando desde tiempos inmemoriales las plantas medicinales, asignándoles nombres que se conocen como nombres comunes o nombres populares, esto origina que, en el saber popular, a una planta se le otorgue más de un nombre de acuerdo a la región, idioma o dialecto que se use (25), por otro lado, la atención primaria de salud de hasta un 80% de la población de los países en desarrollo se basa en la medicina tradicional, por tradición cultural o porque no existen otras opciones, en tanto en los países ricos, muchas personas recurren a diversos tipos de remedios naturales porque consideran que natural es sinónimo de inocuo (26).

#### **Principio activo de las plantas**

Los principios activos son sustancias que se hallan en las distintas partes u órganos de los vegetales, los más importantes desde el punto de vista de la salud son los aceites esenciales, alcaloides, glucósidos, mucílagos y taninos (18), que por su estructura química, se disponen en dos grupos, uno son los productos resultantes del metabolismo primario, de procesos químicos que intervienen de manera directa en la supervivencia, crecimiento y reproducción, los cuales son los glúcidos, lípidos y derivados de aminoácidos, otro los productos que derivan del metabolismo secundario, los cuales no son esenciales para el metabolismo, sino que son sintetizados como defensa y

adaptación, los más importantes son los heterósidos, polifenoles, terpenoides y alcaloides (27).

### **2.2.2. Aceites esenciales**

Los aceites esenciales son sustancias altamente concentradas de la parte de la planta de la cual se extraen y consisten en una mezcla de sustancias aromáticas, en general los aceites esenciales se definen como mezclas de componentes volátiles (28), los componentes químicos principales de los aceites esenciales son hidrocarburos alcoholes fenoles aldehídos cetonas, etc. estos se han estudiado en su mayoría por su sabor y fragancia para dar sabor a los alimentos, bebidas, sin embargo, los aceites esenciales y sus componentes están ganando mayor interés debido a su potencial uso multifuncional, debido a esto muchos autores informan de las propiedades antimicrobianas, antifúngicas, antioxidantes y de captura de radicales de los mismos (29).

### **Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales**

El efecto antimicrobiano de cada aceite esencial es diferente y su actividad antimicrobiana pueden ser evaluada como la concentración mínima inhibitoria (CMI) (30), la cual se define como la concentración mínima requerida del aceite esencial de una determinada planta que tenga la capacidad de frenar el crecimiento del microorganismo como son las propiedades bacteriostáticas o fungistáticas, o la concentración mínima letal que asegure la reducción de un 99.9 % de la población del microorganismo propiedades bactericida y fungicida (31), por tanto, se puede resumir que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales dependería principalmente de tres características; su carácter hidrófilo o hidrófoba, sus componentes químicos y el tipo de microorganismo al que se debe atacar (32).

### **2.2.3. Extractos etanólicos**

El extracto etanólico es una sustancia obtenida a partir de una determinada materia prima desecada de origen vegetal, por maceración y en contacto con etanol, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico, estos procesos pueden ser sometidos a determinadas operaciones para eliminar algunos de sus componentes (33), la extracción se realiza a temperatura ambiente y consiste en remojar el material vegetal, previamente triturado, en contacto con un solvente, esta puede ser agua o etanol, preferentemente el etanol puesto que a largos tiempos de extracción el agua puede

propiciar la fermentación o la formación de mohos hasta que éste penetre y disuelva las porciones solubles, por tanto se utiliza un recipiente con tapa, en él se coloca todo el material vegetal con el disolvente y tapado se deja en reposo por un período de 2 a 14 días con agitación esporádica, posteriormente se filtra el líquido y se obtiene el extracto (33).

#### 2.2.4. *Equisetum arvense* L. (cola de caballo)

##### Descripción botánica

Sinonimias: “Cola de caballo”, “Yerba del Platero”, “Chicote de fraile”



**Figura 1. Cola de caballo (*Equisetum arvense* L.) en su hábitat natural, distrito de Marangani (Cusco), en el mes de Marzo 2017.**

La planta “cola de caballo” es una planta herbácea sin flores, vivaz por su raíz y rizoma, crece en suelos húmedos, sus tallos son erectos; unos son fértiles, miden de 10 a 20 cm de altura, no se ramifican y terminan en una espiga esporangífera de color beige (32), mientras que los tallos estériles, que son los que interesan en fitoterapia, miden de 20 a 80 cm de altura, de color verde y presentan un verticilio de escamas que se corresponden con las hojas de cada nudo, las hojas surgen en unos verticilos o nudillos presentes en el tallo (34).

### **Eco geografía**

Su distribución es mundial y de mayor riqueza en el hemisferio norte (34), en el Perú se reconoce en la actualidad tres especies del género *Equisetum*: *E. bogotense*, *E. arvense* y *E. myriochaetum*, estas tres especies se hallan distribuidas en casi toda América tropical y en el Perú las dos primeras crecen en casi todas las regiones, ocupando ambientes húmedos y alterados desde el nivel del mar hasta los 4200 msnm de altitud (35).

### ***Equisetum arvense* L. (cola de caballo)**

#### **Clasificación taxonómica (35)**

Dominio:	Eukarya
Reino:	Plantae
Phylum	Pteridophyta
Clase:	Equisetopsida
Orden:	Equisetales
Familia:	Equisetaceae
Género:	Equisetum
Especie:	<i>Equisetum arvense</i> L.

### **Principios activos de la cola de caballo**

Las propiedades terapéuticas de la planta “cola de caballo” están dadas por determinados principios activos que se pueden aislar de sus tejidos (36), algunos autores refieren que esta planta contiene muchos minerales (Sílice, calcio, magnesio, cromo, hierro, manganeso, potasio); ácidos (salicílico, málico, esquisético), nicotina, glucosidos, saponinas, heteroxidos, fitosteroles, flavónicos y taninos , por tanto la cola de caballo contiene muchos componentes de los cuales poseen comprobados efectos protectores y curativos (21), son dos los tipos de principios activos de mayor relevancia en esta planta, el primero es un amplio conjunto de sustancias minerales, dentro de las cuales la más importante es la sílice, el segundo es una serie de glucósidos que tienen roles coadyuvantes del sílice y la mayor proporción de sílice se presenta como anhídrido (36).

**Sus principales componentes bioquímicos son (22):**

- Sales minerales, en especial de sílice, es una de las mejores fuentes de este mineral que nos brinda la naturaleza, potasio, calcio, magnesio y aluminio.
- Vitamina C, carotenoides.
- Flavonoides, glucósidos de kenferol.
- Taninos gálicos.
- Saponósidos, a destacar la equisetonina.
- Ácidos cafeico y ferúlico.
- Polialcoholes carbonados como el manitol, con efectos diuréticos el Inositol.
- Trazas de alcaloides activos como la espermidina, usada en jardinería, la nicotina, etc.
- Esteroles.

Estos componentes le confieren a la cola de caballo cualidades remineralizantes, vitamínicas, diuréticas, depurativas, desintoxicantes, antimicrobianas, antiinflamatorias, vasoconstrictoras a nivel local, cicatrizantes y como eficaz restaurador epidérmico (37).

**2.2.5. *Escherichia coli***

Dentro de las cepas de *Escherichia coli* que infectan a los seres humanos, se han descrito dos grupos principales; las que causan infecciones intestinales y las que producen infecciones extraintestinales, este último grupo incluye a los agentes causales de las infecciones del tracto urinario, es así que los serogrupos de *E. coli* comúnmente asociados con ITU son: O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O22, O25 y O75, los cuales son responsables de más del 75% de estas infecciones (38). En 2013 las infecciones de vías urinarias se mantuvieron como una de las primeras causas de morbilidad y *E. coli* es el principal agente causal con más del 90% de este tipo de infecciones, seguida por otros géneros bacterianos, como son *Klebsiella*, *Proteus* y *Staphylococcus* (3),

**Factores de virulencia**

Además de los factores de riesgo clásico y de virulencia bacteriana, se incide sobre el papel que juega la adhesividad de las enterobacterias y de los receptores Toll-like (TLRs) en reconocer a dichos uropatógenos y en desencadenar la cascada de respuesta inmunitaria innata (39), demostrando en estudios experimentales de la capacidad que

tiene *Escherichia coli* de invadir las células epiteliales y formar comunidades bacterianas intracelulares en el interior de biofilms, puede constituir un reservorio para *Escherichia coli* productora de las ITU recurrentes, en tanto la resistencia de *Escherichia coli* a una de las clases de medicamentos más utilizadas en el tratamiento de las infecciones urinarias está muy generalizada y en muchas partes del mundo hay países en los que este tratamiento es ineficaz en más de la mitad de los pacientes (40).

#### **2.2.6. *Candida albicans***

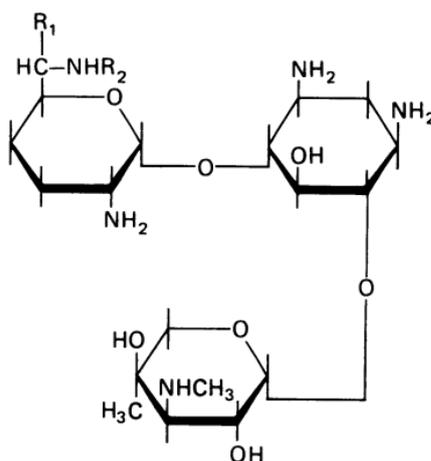
Existen más de 100 especies de *cándida* que son patogénicas para los seres humanos y la mayoría de ellas vive como comensal en el tracto gastrointestinal, aparato reproductor y en la piel, esperando el momento oportuno para que aumente su población y entonces genere molestias, es decir que son patógenos oportunistas que se hallan evidentes cuando el equilibrio se rompe o se altera por algún factor (41), las especies del género *Candida*, son la causa más común en infecciones de las vías urinarias, son comensales normales del ser humano y la colonización por *Candida* difiere de la infección en que esta última produce una reacción tisular, en tanto la infección urinaria inferior por *Candida* suele producirse en pacientes con sonda urinaria, especialmente después de una terapia con antibióticos (42).

Aunque las infecciones por *Candida* y por bacterias con frecuencia se producen simultáneamente, en tanto, la prostatitis por *C. albicans* aparece con frecuencia en pacientes con diabetes, por lo general después de una instrumentación, mientras la candidiasis renal suele diseminarse por vía hematógena, y en general se origina en el tracto gastrointestinal (42), por otro lado, de los casos de flujo vaginal, la VB suele representar el 50% de los casos y la CVV el 30 a 35% de los casos. Se considera, en la mayoría de las series revisadas, la segunda causa más frecuente del síndrome de flujo vaginal (41).

#### **2.2.7. Gentamicina**

Farmacología: la gentamicina es un antibiótico aminoglucósido de amplio espectro y acción bactericida. Mecanismo de acción: Los aminoglucósidos son transportados de forma activa a través de la membrana bacteriana, se unen irreversiblemente a una o más proteínas receptoras específicas de la subunidad 30S de los ribosomas bacterianos e interfieren con el complejo de iniciación entre el ARNm (ARN mensajero) y la subunidad 30S. El ADN puede leerse de forma errónea, lo que da lugar a la producción

de proteínas no funcionales; los polirribosomas se separan y no son capaces de sintetizar proteínas. Esto da lugar a un transporte acelerado de aminoglucósidos, con lo que aumenta la ruptura de las membranas citoplasmáticas de las bacterias y la consiguiente muerte celular (42), por otro lado su composición química dice componer de policatiónicos que contienen dos o más aminoazucres unidos por enlaces glucosídicos a un anillo de hexosa, policationes muy polares, como se muestra en la figura 2 (43).

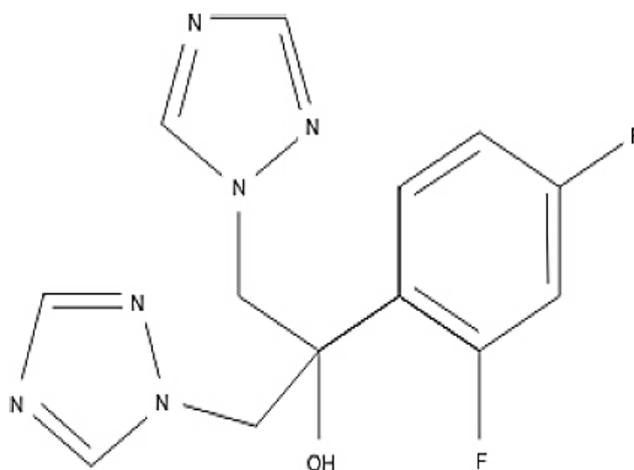


**Figura 2. Estructura química de la Gentamicina**  
Fuente: (43)

### 2.2.8. Fluconazol

Fluconazol es un antifúngico comúnmente usado en tratamientos patológicos y al igual que otros triazoles, tiene 2 anillos que contienen 3 átomos de nitrógeno como se muestra en la (Figura 3), un anillo bencénico presenta 2 flúor, su peso molecular es relativamente bajo, 306.3 Da, es decir es una molécula polar y simétrica lo que favorece su hidrosolubilidad, su aspecto es de polvo blanco y cristalino y no ionizable a pH fisiológico, su buena solubilidad en agua le hace apto para administración endovenosa, penetrando muy bien en fluidos corporales (44), su mecanismo de acción está dado porque generalmente los azoles se unen a la enzima C14-alfa-demetilasa, e inhiben la transformación de lanosterol en ergosterol, esta inhibición altera la fluidez de la membrana, aumentando la permeabilidad y produciendo una inhibición del crecimiento celular y de la replicación (43), la enzima C14-alfa-demetilasa, está acoplada al citocromo P- 450, esta inhibición del citocromo P- 450 es responsable de los efectos

adversos que los imidazoles pueden causar en humanos y la afinidad por el P- 450 de los mamíferos es menor en el caso de los Triazoles (44).



**Figura 3. Estructura química del Fluconazol**  
Fuente :(44)

### 2.3. Marco conceptual

**Aceite esencial.** Son formas o sustancias altamente concentradas de la parte de la planta de la cual se extraen y consisten en una mezcla de sustancias aromáticas que sólo la naturaleza puede producir, en general, los aceites esenciales se definen como mezclas de componentes volátiles, productos del metabolismo secundario de las plantas (28).

**Cepa.** Conjunto de virus, bacterias u hongos que tienen el mismo patrimonio genético (45).

**Destilación.** Separación de una mezcla de varios componentes aprovechando sus distintas volatilidades, o bien separar los materiales volátiles de los no volátiles (33).

**Destilación por arrastre de vapor con agua.** Destilación por medio de una corriente de vapor que arrastra selectivamente algunos compuestos de la mezcla (33).

**Extracto etanólico.** Extracto con olor característico, obtenido a partir de materia prima desecada de origen vegetal, por maceración o percolación en contacto con etanol, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico (33).

**Levadura.** Son hongos unicelulares, redondos o elipsoides que se reproducen por gemación o fisión binaria (46).

**Halo de inhibición.** Es la zona alrededor de un disco de antibiótico en un antibiograma en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada con el germen, es una medida de la potencia del antibiótico frente al germen (47).

**Método Kirby – Bauer.** Método utilizado para determinar la sensibilidad de agentes patógenos ante nuevas sustancias en investigación (48).

**Planta medicinal.** Especie vegetal que contiene en toda o en alguna de sus partes constitutivas, principios activos útiles para combatir enfermedades (23).

**Antibiótico:** agente biológico o químico que inhibe el crecimiento de los microorganismos. (48)

**Colonia:** crecimiento visible bacteriano, generalmente en medios sólidos, originada por la multiplicación de una sola bacteria preexistente. (48)

**Concentración mínima inhibitoria (CMI):** corresponde a la concentración más débil de un antibiótico capaz de inhibir el crecimiento visible de una cepa bacteriana al cabo de 18 – 24 horas de incubación. (48)

**Escala de Mc. Farland:** estándar de turbidez de sulfato de bario. La escala usada para el inóculo de las pruebas de susceptibilidad por el método de disco difusión es 0.5 (48).

**Patógeno:** especie bacteriana capaz de ocasionar dichas enfermedades al presentarse circunstancias favorables para el organismo (49).

**Principio activo:** los principios activos son la sustancia a la cual se debe el efecto farmacológico de un medicamento, y su uso se remonta a la prehistoria, en un principio eran hierbas y sustancias naturales. (50)

**Resistente:** organismo que no se inhiben por las concentraciones clínicamente posibles de un agente antimicrobiano. (48)

**Sensible:** categoría clínica definida para las pruebas de susceptibilidad *in vitro*. Implica que una infección debida a la cepa bacteriana estudiada puede ser tratada apropiadamente con la dosis de antibiótico recomendada para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que existan contraindicaciones (48)

**Infecciones del tracto urinario (ITU):** Es la existencia de gérmenes e infecciones patógenos en el tracto urinario. El tracto urinario incluye los riñones, la vejiga y la uretra. (39)

**In vitro:** es un conjunto de fenómenos observados en el laboratorio a partir de productos biológicos vivos. Método para mantener en vida diversos organismos vivos como son: células, espermatozoides, óvulos, virus, bacterias etc. generalmente en un ambiente controlado fuera del organismo vivo (51).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Área de estudio

La recolección de las muestras de las plantas de “cola de caballo” se realizó en el distrito Marangani, provincia de Canchis – Cusco, a una altura de 3698 msnm aproximadamente. La obtención del aceite esencial de *Equisetum arvense* L. “cola de caballo”, se realizó en el Laboratorio de Operaciones y Procesos Unitarios de la Escuela Profesional de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno. La obtención de extracto etanólico se realizó en la Facultad de Ciencias Biologías, Laboratorio de Microbiología. Las pruebas de susceptibilidad del aceite esencial y extracto etanólico de *Equisetum arvense* L. (cola de caballo) frente a las cepas de *Escherichia coli* y *Cándida albicans*, se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno.

#### 3.2. Tipo de estudio

Es de tipo experimental, con pruebas y controles, distribuidos en tres grupos: Un grupo controles positivos: antibiótico Fluconazol para *Cándida albicans* y Gentamicina para *Escherichia coli*, un control negativo (agua destilada estéril); y el tercer grupo representada por el aceite esencial y extracto etanólico de *Equisetum arvense* L. (Cola de caballo).

#### 3.3. Población y muestra

##### Constituida por:

- Cepa de *Cándida albicans*: se obtuvo del CERITS (Centro de Referencia de Infecciones de Transmisión Sexual), del Hospital Regional “Manuel Núñez Butrón – Puno”, procedente de un muestra clínica de orina.
- Cepa de *Escherichia coli* ATCC: cepas de referencia de *Escherichia coli* ATCC 25922, se obtuvo del Departamento de Patología Clínica del Hospital Regional “Manuel Núñez Butrón – Puno”.
- Aceite esencial de *Equisetum arvense* L. (Cola de caballo).
- Extracto etanólico de *Equisetum arvense* L. (Cola de caballo).

**Criterios de inclusión:**

- Planta “cola de caballo” en buen estado de desarrollo, sin signos de enfermedades y daño físico.

**Criterios de exclusión:**

- Material vegetal que se encuentre en mal estado de crecimiento o desarrollo y que presente signos visibles de daño.

**3.4. Diseño de investigación**

La distribución de las unidades experimentales para el estudio del efecto del aceite esencial y extracto etanólico de la “cola de caballo” frente a *Escherichia coli* ATCC y *Candida albicans*, correspondió a un diseño completamente al azar (D.C.A.), la disposición de unidades experimentales fue de la siguiente manera:

**Tabla 1. Diseño experimental para determinar la CMI del aceite esencial y extracto etanólico frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans*.**

Repet.	Control	Aceite esencial y/o extracto etanólico de cola de caballo						Total
	negativo*	0.1%	0.2%	0.5%	1%	2.5%	5%	
1	1	1	1	1	1	1	1	7
2	1	1	1	1	1	1	1	7
3	1	1	1	1	1	1	1	7
<b>Total</b>	3	3	3	3	3	3	3	21

\*Control negativo: medio de cultivo Mueller Hinton sin concentración de aceite esencial ni extracto etanólico.

Para determinar el primer objetivo, se trabajó con 21 unidades experimentales, conformado por 3 repeticiones para cada dosis utilizada, además se utilizó un control negativo (medio de cultivo Mueller Hinton sin aceite esencial o extracto etanólico), cada unidad experimental estuvo constituida por determinados porcentajes de aceite esencial y/o extracto etanólico (0.1 %, 0.2 %, 0.5%, 1%, 2.5%, 5%), preparados de la siguiente manera:

1° concentr.: 0.02 ml de aceite esencial y/o extracto etanólico + 19.98 ml de Agar MH

2° concentr.: 0.04 ml de aceite esencial y/o extracto etanólico + 19.96 ml de Agar MH

3° concentr.: 0.1 ml de aceite esencial y/o extracto etanólico + 19.90 ml de Agar MH

4° concentr.: 0.2 ml de aceite esencial y/o extracto etanólico + 19.80 ml de Agar MH

5° concentr.: 0.5 ml de aceite esencial y/o extracto etanólico + 19.50 ml de Agar MH

6° concentr.: 1.0 ml de aceite esencial y/o extracto etanólico + 19.00 ml de Agar MH

Para determinar la susceptibilidad, se trabajó con 21 unidades experimentales, conformado por 3 repeticiones por cada dosis utilizada, además se utilizó un control positivo el antibiótico comercial gentamicina y fluconazol para *E. coli* y *C. albicans* respectivamente, que sirvieron para comparar el efecto inhibitorio, ya que se conoce que dichos microorganismos son sensibles a estos antibióticos.

**Tabla 2. Diseño experimental para la susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* y *Candida albicans*.**

Repet	Antibiótico Gentamicina/ Fluconazol	Aceite esencial y/o extracto etanólico de Cola de caballo						Total
		1 µl	5µl	10µl	25µl	35µl	50µl	
1	1	1	1	1	1	1	1	7
2	1	1	1	1	1	1	1	7
3	1	1	1	1	1	1	1	7
<b>Total</b>	3	3	3	3	3	3	3	21

### 3.5. Metodología

#### Método de campo

#### Recolección del material vegetal

Primeramente hay que tener en cuenta que dependiendo de la planta que interesa recolectar debemos distinguir donde se encuentre los principios activos más intensos y en qué momento de recolección del día, no obstante tener en cuenta que la hora indicada para la recolección de las especies vegetales es realizarla por la mañana. (52)

**Procedimiento:**

Se colectó 24 kg de planta entera (Figura 7), se cortaron los tallos estériles con tijeras de podar, se seleccionaron y separaron las impurezas (ramas secas, tallos secos o dañados, tierra, otras plantas, etc.), inmediatamente se almacenaron en bolsas de papel kraft previamente etiquetados, con la finalidad de evitar su deterioro o maltrato de la planta durante su traslado. Posteriormente fueron trasladadas al Laboratorio de Operaciones y Procesos Unitarios de la Facultad de Ingeniería Química, Escuela Profesional de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno.

**Secado del material vegetal**

**Fundamento.-** es la eliminación del agua de los tejidos y células de la planta, para evitar la alteración de los componentes de la planta por la humedad persistente. Las hojas deben ser secadas con el tallo sin desprenderlas (54).

**Procedimiento.-** se hizo en un ambiente protegido de la luz solar, ventilada y sin superponer los tallos para su desecación óptima por el lapso de 15 días que se obtuvo un secado adecuado de la materia vegetal (Figura 8).

**Método de laboratorio****Obtención del aceite esencial de *E. arvense* (cola de caballo)****Método de destilación por arrastre a vapor de agua**

**Fundamento.-** Consiste en calentar la planta medicinal hasta que sus componentes más volátiles pasen a la fase de vapor y a continuación se enfría el vapor para recuperar dichos componentes en forma líquida por medio de la condensación (el aceite esencial) (33)

**Procedimiento**

- Se separaron manualmente las hojas de los tallos de la planta, y se carga en un hidroddestilador, de manera que forme un lecho fijo compacto, colocándose un total de 2 Kg.
- El vapor de agua se inyectó mediante un distribuidor interno, próximo a su base y con la presión suficiente para vencer la resistencia hidráulica del lecho. Conforme el vapor se pone en contacto con el lecho, la materia prima se calienta y liberando el aceite esencial contenido y éste, a su vez, debido a su alta

volatilidad se evapora. Al ser soluble en el vapor circundante, el aceite esencial es “arrastrado”, corriente arriba hacia el tope del hidroddestilador.

- La mezcla, vapor saturado y aceite esencial, fue condensado y enfriado, hasta temperatura ambiente en un condensador “cuello de cisne” o prolongación curvada del conducto, a la salida del hidroddestilador.
- A la salida del condensador, se obtuvo una emulsión líquida heterogénea. La cual, se separó en un decantador dinámico o bureta. Este equipo está lleno de agua fría al inicio de la operación y el aceite esencial se fue acumulando, debido a su casi inmiscibilidad en el agua y a la diferencia de densidad y viscosidad con el agua. Posee un ramal lateral, por el cual, el agua es desplazada para favorecer la acumulación del aceite, el vapor condensado acompañante del aceite esencial y que también se obtiene en la bureta, es llamado “agua floral”, posee una pequeña concentración de los compuestos químicos solubles del aceite esencial, lo cual le otorga un ligero aroma, semejante al aceite obtenido.
- El proceso terminó cuando el volumen del aceite esencial acumulado en la bureta no varió con el tiempo. A continuación, el aceite fue retirado de la bureta y almacenado en frascos acaramelados estériles con tapa, luego los frascos se rotularon y se mantuvieron en refrigeración para su conservación.

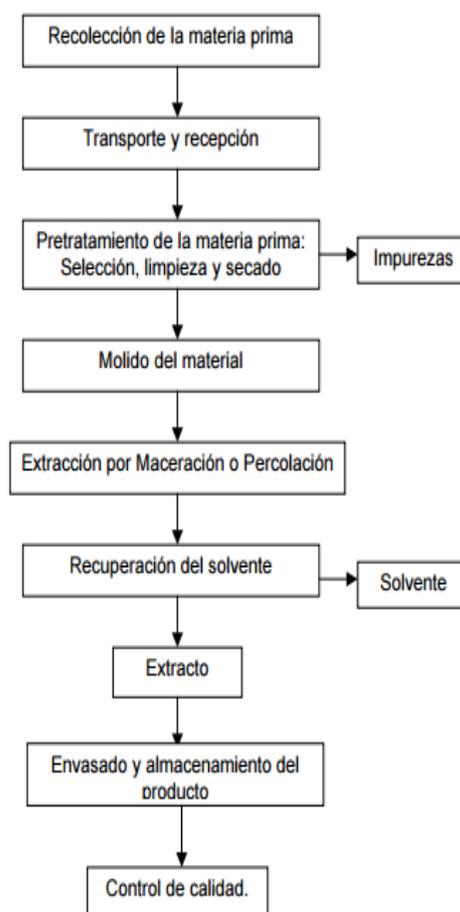
### **Obtención de extractos etanólicos de *E. arvense* (cola de caballo)**

#### **Método de extracción por maceración**

**Fundamento:** Extracto con olor característico, obtenido a partir de materia prima desecada de origen vegetal, por maceración en contacto con etanol, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico, estos procesos pueden ser sometidos a determinadas operaciones para eliminar algunos de sus componentes y así mejorar notablemente la calidad del producto deseado (33).

#### **Procedimiento:**

Se procedió a triturar 25 g de la planta deshidratada, luego fueron agregados en 50 ml de alcohol al 70%; y macerados en envases de vidrio en ambiente oscuro y seco durante 5 días, a temperatura ambiente (15 a 18 °C), posteriormente se procedió a filtrar el estado líquido del orgánico para preparar diluciones de las concentraciones.



**Figura 4. Diagrama de flujos de proceso de obtención de extractos etanólicos**

**Fuente: (33)**

### **Obtención de cepas**

Se utilizó cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, provenientes del Instituto Nacional de Salud de la ciudad de Lima, obtenidas del Departamento de Patología Clínica del Hospital Regional “Manuel Núñez Butrón” y cepas de *Candida albicans* provenientes de Centro de Referencia de Infección de Transmisión Sexual (CERITS) del mismo hospital. El transporte y bioseguridad se tomaron muy en cuenta ya que estas son sustancias infecciosas, por tanto se aplicó el sistema de embalaje triple. Este sistema de embalaje consto de tres componentes: el recipiente primario, el embalaje secundario y el embalaje externo. El recipiente primario que contiene la muestra debe ser estanco, a prueba de fugas y estar debidamente etiquetado en relación con el contenido, estas fueron envueltas en material absorbente suficiente para absorber todo el líquido en caso de rotura o fuga, posterior a ello de transporte en una caja de tecnopor bien hermetizada, hasta llegar al laboratorio.

### **Preparación del medio de cultivo agar Mueller Hinton (48)**

**Fundamento.-** El agar Mueller-Hinton se considera el mejor medio para las pruebas de sensibilidad de rutina dado que muestran buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad, contiene bajo nivel de inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina, es adecuado para el desarrollo de la mayoría de las bacterias patógenas y existen suficientes datos recopilados que avalan la experiencia de las pruebas de sensibilidad realizadas en este medio.

**Procedimiento.-** Según su especificación para su respectiva hidratación, se preparó la cantidad de 6.08 g de agar con 160 ml de agua destilada para 8 placas. Luego se llevó el medio a esterilización en autoclave a 120 °C por 30 minutos. Antes que el medio de cultivo se enfríe, se realizó el plaqueo, vertiendo aproximadamente 20 ml de medio Mueller Hinton en cada placa estéril vacía, luego se esperó su solidificación. No obstante se verificó el pH del agua destilada (7.2-7.4), empleando tiras reactivas.

### **PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR MC FARLAND (48)**

**Fundamento.-** El inóculo bacteriano debe contener una cantidad normatizada de unidades formadoras de colonias (UFC), para minimizar la variación de la población bacteriana, esta cantidad es de  $1 \times 10^3$  UFC/ml la que se determinó mediante el estándar de Mc Farland.

**Procedimiento.-** Para estandarizar la densidad óptica del inóculo se utilizó una suspensión de sulfato de bario como estándar de turbidez (0.5 de la escala de Mc Farland). Para prepararlo se procedió de la siguiente manera: Se agrega 0,5 ml de  $\text{BaCl}_2$  a 99,5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Luego se verifica la densidad correcta del estándar usando un espectrofotómetro; la absorbancia a 625 nm debe ser 0,03 - 0,10 para el estándar 0,5 de Mc Farland. Se distribuyen 2 - 4 ml de la solución en tubos similares a los que se usan para preparar los inóculos y se mantienen guardados a temperatura ambiente al abrigo de la luz. Antes de su uso y para lograr una turbidez homogénea, se agita vigorosamente cada estándar.

### **Preparación del inóculo**

Las cepas ATCC (American Tipy Culture Colletion) *Escherichia coli* y *Candida albicans* fueron inoculadas en medio de cultivo TSA (Trypticasa Soya Agar) y SDA (Sabouraud Dextrosa Agar) respectivamente con 24 a 48 horas de ser cultivados, a

partir del cual se seleccionaron y recogieron con asa de Kolle, 4 a 5 colonias, bien aisladas y con similar morfología, teniendo el cuidado de no recoger medio de cultivo. Con estas colonias se preparó una suspensión en 4 ó 5 ml en solución salina. Luego la suspensión bacteriana fue incubada a 35°C hasta alcanzar o exceder la turbidez del estándar (2 horas). Finalmente se realizó el ajuste a la turbidez del inóculo por comparación visual, agregando solución salina, hasta una turbidez equivalente al tubo 0.5 del estándar de Mc Farland, para ello, se observaron los tubos contra un fondo blanco con una línea negra como contraste.

#### **Preparación de discos con aceite esencial y extracto etanólico de *E. arvensis* L. “cola de caballo”**

Utilizando el aceite esencial y el extracto etanólico de “cola de caballo”, se ensayaron las siguientes concentraciones, todas ellas por triplicado.

- Tratamiento 1 (T1): 1 µl de aceite esencial/extracto etanólico
- Tratamiento 2 (T2): 5 µl de aceite esencial/extracto etanólico
- Tratamiento 3 (T3): 10 µl de aceite esencial/extracto etanólico
- Tratamiento 4 (T4): 25 µl de aceite esencial/extracto etanólico
- Tratamiento 5 (T5): 35 µl de aceite esencial/extracto etanólico
- Tratamiento 6 (T6): 50 µl de aceite esencial/extracto etanólico
- Tratamiento control positivo (TC): Gentamicina (10 µg)/Fluconazol (25 µg)

Con la ayuda de micropipetas se empaparon las perforaciones de papel filtro Whatman No. 4 exento de cenizas a manera de discos de antibiograma, cada uno con las cantidades correspondientes y con tres repeticiones, para posteriormente ser utilizadas como inhibidores de *E. coli* y *C. albicans*.

### 3.5.1. DETERMINACION DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DEL ACEITE ESENCIAL Y EXTRACTO ETANÓLICO DE *Equisetum arvense* COLA DE CABALLO FRENTE A *Escherichia coli* ATCC 25922 Y *Candida albicans*.

Para obtener los resultados de este objetivo, se realizaron los procedimientos recomendados por Zuni (15)

**Método:** dilución en placa

**Fundamento.**- la técnica de dilución en agar según Kirby-Bauer, se utilizó para medir cuantitativamente la actividad *in vitro* de un antimicrobiano frente a un cultivo bacteriano, estos métodos se basan en la preparación de una serie de placas con caldos o agar, respectivamente, a los cuales se les agrega el antibiótico en distintas concentraciones. Luego se inoculan cada uno de las placas con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. Las pruebas se examinan después de incubar 18 a 24 horas a 37 °C y se determina la concentración mínima inhibitoria (CMI) del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado (48).

**Procedimiento.** Para determinar la concentración mínima inhibitoria se inoculo con la suspensión de  $1 \times 10^8$  UFC de la cepa de *Escherichia coli* ATCC y *Candida albicans* en estudio de acuerdo al estándar de Mc Farland, en las placas contenidas con agar Müller - Hinton mas aceite esencial o extracto etanólico de Cola de caballo, preparados en diferentes concentraciones o dosis de aceite esencial y extracto etanolico sin diluir 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2.5 y 5 % respectivamente, simultáneamente se colocó una placa control sin ninguna concentración de aceite sin tratamiento (control de crecimiento), posterior a ello se procedió a la incubación por 24 horas, después de la incubación las placas se examinaron en busca del desarrollo para demostrar a que concentración mínima inhibitoria (CMI) la bacteria mostraba sensibilidad.

### **3.5.2. DETERMINACIÓN LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *Escherichia coli* ATCC 25922 Y *Candida albicans* FRENTE AL ACEITE ESENCIAL Y EXTRACTO ETANÓLICO COMPARADO CON LOS FÁRMACOS GENTAMICINA Y FLUCONAZOL.**

**Método:** difusión con discos (48).

**Fundamento.-** el antibiograma disco-placa consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición.

#### **Procedimiento:**

Se sumergió un hisopo estéril en la suspensión bacteriana de  $1 \times 10^8$  UFC/ml (turbidez estándar de 0.5 de Mc Farlan), se inoculó la superficie en cada placa de Agar Müller Hinton, se dispersó en la superficie del medio con el hisopo en diferentes direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo, luego con la ayuda de una pinza estéril se colocaron los discos de papel filtro sobre la superficie del Agar con cada una de las concentraciones del aceite esencial o extracto etanólico de Cola de caballo. Como control positivo se utilizaron discos de gentamicina, fluconazol y como control negativo se utilizó agua destilada estéril. Posteriormente se incubó las placas en posición invertida a 37 °C durante 24 horas, para su posterior lectura e interpretación.

#### **Lectura de las placas e interpretación de resultados (48)**

Después del tiempo de la incubación se examinaron cada placa y se procedió a medir con una regla milimetrada, los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco.

**Tabla 3. Tabla estandarizada de medida de halos de inhibición (mm).**

ANTIBACTERIANO	CONCENTRACIÓN DEL DISCO	DIÁMETRO EN (MM)		
		R	I	S
Tetraciclina	30 µg	≤ 14	15-18	≥ 19
Cefotaxima	30 µg	≤ 14	15-22	≥ 23
Amikacina	30 µg	≤ 14	15-16	≥ 17
Ceftriaxona	30 µg	≤ 13	14-20	≥ 21
Gentamicina	10 µg	≤ 12	13-14	≥ 15

ANTIFÚNGICO	CARGA DE DISCO	DIÁMETRO (MM)		
		R	I	S
Fluconazol	25 µg	≤ 14	15 - 18	≥ 19
Voriconazol	1 µg	≤ 13	14 - 16	≥ 17
Caspofungina	5 µg	≤ 10	-	11

**Fuente: (48)**

En la tabla 3 se muestra medidas establecidas de halos de inhibición (en mm), con la dosis o carga de los antibióticos utilizados: R; resistente, I; intermedio, S; sensible.

### MÉTODO ESTADÍSTICO

Para la comparación del efecto inhibitorio *in vitro* del aceite esencial o extracto etanólico de cola de caballo *Equisetum arvense*, el antibiótico gentamicina y fluconazol frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Candida albicans*, al obtener los resultados, se evaluó las diferencias estadísticas entre las concentraciones de aceite esencial o extracto etanólico de la Cola de caballo y el control de los bioensayos (control positivo), para lo cual se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de un diseño completamente al azar (DCA). Para determinar la existencia de diferencias entre las concentraciones respecto a la inhibición producida en *Escherichia coli* y *Candida albicans*, por el efecto del aceite esencial o extracto, asimismo se realizó la prueba de rango múltiple de Tukey para realizar la prueba de comparación de medias entre los tratamientos, el análisis de varianza se realizó utilizando el siguiente modelo lineal aditivo:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Dónde:

$Y_{ij}$ = Variable de respuesta (halo de inhibición en mm).

$\mu$ = Promedio general.

$\tau_i$ =Efecto de la i-ésima concentración de aceite o extracto de Cola de caballo.

$\varepsilon_{ij}$  = Efecto del error experimental.

Las pruebas estadísticas se evaluaron:

Si el resultado es  $p < 0,05$  las pruebas son significativas

Si el resultado es  $p > 0,05$  las pruebas no son significativas

**Prueba de rango múltiple de Tukey.**

Tukey propuso un procedimiento para evaluar la hipótesis nula con  $\alpha$  siendo exactamente el nivel global de significancia, cuando las muestra tienen tamaños iguales, y en el máximo  $\alpha$ , cuando las muestras tienen tamaños diferentes.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSION

##### 4.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) *in vitro* del aceite esencial y extracto etanólico de *Equisetum arvense* “cola de caballo“, frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 Y *Candida albicans*.

###### a) Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Equisetum arvense* frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.

En los resultados del crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922 frente a las diferentes concentraciones de aceite esencial de *Equisetum arvense* L. (cola de caballo), se estableció que la concentración mínima inhibitoria en todos los bioensayos fue del 1.0 % evidenciado por la ausencia de crecimiento bacteriano. En los resultados de 3 repeticiones se observa que en el rango de concentración del aceite de 0.1% hasta 0.5 % presentó crecimiento de UFC (unidades formadoras de colonias) de la bacteria *Escherichia coli* ATCC 25922, es decir estas concentraciones no fueron las suficientes para inhibir el crecimiento de dicha bacteria, mientras que las dosis de 1.0 % hasta 5% se evidencia la inhibición del crecimiento de la bacteria. (Tabla 4).

**Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria (CMI) “*in vitro*” del aceite esencial de “cola de caballo” frente a *Escherichia coli* ATCC 25922. Obtenidos en la Facultad de Ciencias Biológicas UNA – Puno, durante abril a junio del 2017.**

Concentración de aceite esencial (%)	Crecimiento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (UFC)			Concentración mínima inhibitoria (CMI)
	R1	R2	R3	
Control (-) Agar	379	401	391	
0.1	380	400	389	
0.2	201	198	189	
0.5	180	175	168	
1	0	0	0	1% (CMI)
2.5	0	0	0	
5	0	0	0	

Para analizar estadísticamente las diferencias observadas se procedió con el análisis de varianza (ANOVA) respectivo. Las 6 concentraciones utilizadas para la determinación de la concentración mínima inhibitoria, resultaron con diferencia estadística significativa ( $F_c=1915,50$ ;  $gl=5$ ;  $p<0.0001$ ), demostrando que al menos una de las

concentraciones con aceite esencial fue diferente. Evidenciando así, que la CMI para el aceite esencial es de 1.0 %.

El aceite esencial de “cola de caballo” a concentraciones de 1% o mayores, es una sustancia inhibitoria frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, el cual se demostró en la presente investigación, en tanto que en la concentración de 0.1% es insuficiente, debido a que prácticamente no ejerció ningún efecto inhibitorio sobre la cepa ensayada. Resultado similar reporta un estudio realizado con aceite esencial de menta (*Mentha piperita L.*) frente a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), obteniendo como CMI al 2.5% de aceite esencial (15), mientras que el aceite esencial de *Equisetum arvense* se mostró más activa mostrando 1.0% de CMI a comparación de la “menta”. Por otro lado la CMI del aceite esencial de hojas de *Aloysia triphylla P.* “cedrón”, frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 fue de 3.7% (54), dicha CMI fue superior a lo obtenido en este trabajo de investigación.

Otro estudio realizado con aceite esencial de ajeno (*Artemisia absinthium*) obtuvo una CMI sobre *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) de 1% (12), este resultado concuerda con la CMI del aceite esencial de *Equisetum arvense* obtenida en este estudio. Mientras, (13) la CMI del aceite esencial de manzanilla es de 4% sobre cepas de *Staphylococcus aureus* resultó superior a lo obtenido en nuestro estudio. La concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del "chiri-chiri" (*Grindelia boliviana*) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC, fue estimada en 12 µl/ml (14). el cual equivale al 1.2%, esta CMI es similar a lo obtenido en este estudio.

Por otra parte un estudio propuso una clasificación para plantas medicinales, en base en los resultados de la CMI, considerando como fuerte inhibición la CMI hasta 50 µl/ml, inhibición moderada la CMI entre 60 y 150 µL/ml y como inhibición débil la CMI por encima de 160 µL/ml (55). Es así que el aceite esencial de *Equisetum arvense* una CMI de 1%, lo que equivale a 10 µL/ml, de acuerdo a la clasificación citada, el aceite esencial de *Equisetum arvense*, presentó una inhibición fuerte.

Un estudio manifiesta que la diferencia se puede atribuir a variación en la composición química del aceite, la cual está influenciada por las condiciones del medio ambiente donde se cultiva la planta, por otra parte, difieren en algunos casos las metodologías utilizadas para determinar la actividad antibacteriana, también mencionan el modo de acción de los aceites esenciales en cuestión a su carácter hidrófilo o hidrófobo se debe a

que tienen la capacidad de alterar y penetrar en la estructura lipídica de la pared celular perturbando estructuras celulares lo que lleva a la desnaturalización de las proteínas y a la destrucción de la membrana celular, haciéndolas más permeables, lo que conduce a rupturas o fugas citoplasmicas, lisis celular y eventualmente la muerte del microorganismo (33). En este sentido se puede resumir que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales depende principalmente de tres características; su carácter hidrófilo o hidrófobo, sus componentes químicos y el tipo de microorganismo al que se deben atacar.

**b) Concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de *Equisetum arvense* frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.**

En tanto los resultados del crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922 frente a las diferentes concentraciones de extracto etanólico de “cola de caballo”, se estableció que la concentración mínima inhibitoria en todos los bioensayos fue de 2.5 % evidenciado por la ausencia de crecimiento bacteriano. Los resultados de 3 repeticiones se observa que en el rango de concentración del aceite de 0.1% hasta 1.0 % presentó crecimiento de la bacteria patógena, mientras que en el rango de 2.5 % hasta 5% se evidencia la inhibición del crecimiento de la misma (Tabla 5)

**Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria (CMI) por acción antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de Cola de caballo frente a *Escherichia coli* ATCC 25922. Obtenidos en la Facultad de Ciencias Biológicas UNA – Puno, durante abril a junio del 2017.**

Concentración de extracto etanólico (%)	Crecimiento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (UFC)			Concentración mínima inhibitoria (CMI)
	R1	R2	R3	
Control (-)Agar*	400	385	405	
0.1	380	385	392	
0.2	300	325	315	
0.5	205	215	221	
1	180	185	192	
2.5	0	0	0	2.5% (CMI)
5	0	0	0	

\*Control (-): medio de cultivo (Mueller Hinton) sin extracto etanólico.

De igual manera que para el aceite esencial, se procedió con el análisis estadístico, análisis de varianza (ANOVA) respectivo:

Las 6 concentraciones aplicadas en la investigación resultaron con diferencia estadística significativa ( $F_c=2407.31$ ;  $g_l=5$ ;  $p<0.0001$ ), demostrando que al menos una de las concentraciones con extracto etanólico fue diferente. Teniendo en cuenta la significancia de la prueba de análisis de varianza, mostró que la CMI para el extracto etanólico fue de 2.5 %.

El extracto etanólico de “cola de caballo” a concentraciones mayores al 2.5% son sustancias inhibitorias frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, el cual se ha demostrado en la presente investigación, en tanto que en la concentración de 0.1% es insuficiente, debido a que prácticamente no ejerció ningún efecto inhibitorio sobre la cepa ensayada.

Mientras una concentración 0.21% es suficiente para inhibir el crecimiento de *S. aureus*, siendo esta la CMI al utilizar extracto etanólico y metanólico de *Equisetum arvense* “cola de caballo” (9), estos resultados fueron inferiores a los obtenidos por nuestro estudio, además mostraría que la planta “cola de caballo” sería más activa en bacterias Gram positivas. Por otra parte el extracto etanólico de *Cestrum buxifolium* K. mostró una CMI de 30  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (3%), frente a la cepa de *Escherichia coli*. (56), haciendo una conversión, la concentración de 2.5% de extracto etanólico de *Equisetum arvense* equivale a 25  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , por tanto se asemeja a lo determinado por el extracto etanólico de *Cestrum buxifolium* K.

Según a la clasificación citada anteriormente, el extracto etanólico de *Equisetum arvense* a una CMI de 2.5 %, lo que equivale a 25  $\mu\text{L}/\text{ml}$ , al igual que es aceite esencial presentó una inhibición fuerte. Si bien es cierto, ambas sustancias (aceite esencial y extracto etanólico), resultaron causar una inhibición fuerte. Al realizar el análisis estadístico, ambas CMI resultaron con diferencia estadística significativa ( $F_c= 238.09$ ,  $g_l=1$ ,  $p< 0.0001$ ).

Esta diferencia se debería a que ambos (aceite esencial y extracto etanolico), tendrían propiedades diferentes, debido a que los aceites esenciales poseen múltiples y diversas actividades debido a su variada composición molecular, ya que una corriente de vapor de agua a baja presión es capaz de extraerlas de las glándulas secretoras de esencia. Mientras un extracto etanólico se obtiene macerando la planta aromática en etanol, por

lo que sólo se extrae los compuestos solubles en este alcohol (33). Por tanto no tienen las mismas moléculas o en la misma concentración que en el aceite esencial. Por lo tanto, las propiedades del extracto etanólico no pueden ser las mismas que las del aceite esencial.

Además un estudio demuestra lo expuesto, donde el aceite esencial de *R. officinalis* “romero” exhibió un amplio espectro de acción antimicrobiana tanto para bacterias Gram positivas como Gram negativas con CIM menor al extracto etanólico. Esta actividad antimicrobiana se mostró contra las bacterias. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* y *Lactobacillus plantarum* (57). Otro estudio analizó la composición de 35 plantas aromáticas en forma de aceite esencial y de extracto etanólico y comprueban su actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli*, de las cuales 13 plantas (*Aloysia triphylla*, *Anthemis nobilis*, *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon winterianus*, *Cyperus articulatus*, *Cyperus rotundus*, *Lippia alba*, *Mentha arvensis*, *Mikania glomerata*, *Mentha piperita*, *Mentha* sp., *Stachys byzantina*, y *Solidago chilensis*, mostraron actividad antibacteriana, todas en forma de aceite esencial, mientras los extractos etanólicos no fueron eficaces a ninguna de las concentraciones testadas (58).

**c) Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial y extracto etanólico de *Equisetum arvense* frente a *Candida albicans*.**

En tanto para *Candida albicans* no se pudo determinar la concentración mínima inhibitoria debido a que las concentraciones aplicadas (0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0%) de aceite esencial y el extracto etanólico de *Equisetum arvense* no fueron las suficientes para determinar una CMI frente a *Candida albicans*. Si bien es cierto que para *Escherichia coli* estas concentraciones fueron suficientes para determinar la concentración mínima inhibitoria, para *Candida albicans* no lo fueron, por tanto existe la probabilidad de que la CMI para *Candida albicans* sea por encima del 5%. Como lo indican otros autores.

Según un estudio realizado con aceite esencial de orégano, se determinó que la CMI para la acción antifúngica fue de 1000 µL/ml y se atribuyó al carvacrol, como causante del efecto inhibitorio *in vitro* contra *Candida albicans* (59). Por otro lado Los resultados obtenidos en el trabajo de enfrentamiento de *Trichophyton mentagrophytes* con las

concentraciones al 2 % hasta el 12 % aceite esencial de *Schinus molle* permitieron observar que la CMI fue del 12 % (60), estos datos concuerdan con lo deducido en nuestro trabajo de investigación, ya que la concentración de 5% no fue la suficiente para causar dicha inhibición.

#### **4.2. Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* ATCC 25922 Y *Candida albicans* frente al aceite esencial y extracto etanólico de *Equisetum arvense* comparado con los fármacos gentamicina y fluconazol.**

##### **a) Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* ATCC 25922 frente al aceite esencial y extracto etanólico de *Equisetum arvense* comparado con el fármaco gentamicina**

- **Susceptibilidad de *Escherichia coli* frente al aceite esencial de *Equisetum arvense***

Las lecturas del ensayo de disco difusión a diferentes dosis del aceite esencial de la planta “cola de caballo” frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, resultaron de la siguiente manera: el control positivo (Gentamicina 10 µg), obtuvo un promedio de diámetro de halo de inhibición de 16.0 mm, el cual representa el 100% de inhibición, mientras para los discos con aceite esencial de *Equisetum arvense*, los cuales se evaluaron a dosis de 1, 5, 10, 25, 35, y 50 µL. frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, se encontraron diámetros de halos de inhibición de 9.2, 10.5, 13.3, 17.5, 19.3 y 25.1 mm respectivamente, mostrando así, que la menor dosis de 1 µL, que de acuerdo a la densidad del aceite equivale a 0.9 µg aproximadamente, formó un halo de inhibición de 9.2mm, cuyo porcentaje de inhibición con respecto al control Gentamicina es del 57% , en tanto la mayor dosis de 50 µL (45 µg), formó un halo de 25.1 mm, el cual sobre pasó a los valores obtenidos por el control Gentamicina (10 µg), con un porcentaje de inhibición del 157%. Mientras la dosis con 10 µL que equivale a 9 µg generó el 83% de inhibición, cercano al control Gentamicina. (Tabla 6).

**Tabla 6. Diámetro de halos de inhibición (en mm) y porcentajes de inhibición, tratados con diferentes dosis de aceite esencial (1, 5, 10, 25, 35, 50  $\mu$ l) de *Equisetum arvense*, comparado con el control positivo (Gentamicina) frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, obtenidos en la Facultad de Ciencias Biológicas UNA – Puno, durante abril a junio del 2017.**

Concentraciones de aceite esencial	Halos de inhibición (mm) frente a <i>E. coli</i> ATCC25922 (mm)			Promedio de halo (mm)	% de inhibición
	R1	R2	R3		
1 $\mu$ l	9.1	8.8	9.2	9.2	57%
5 $\mu$ l	12	9.8	9.8	10.5	66%
10 $\mu$ l	14	14.2	11.6	13.3	83%
25 $\mu$ l	17.4	18.3	16.7	17.5	109%
35 $\mu$ l	20.2	19.2	18.5	19.3	121%
50 $\mu$ l	26.1	25.2	24	25.1	157%
Gentamicina	16.5	15.3	15.5	16	100%

La categorización según el Manual de susceptibilidad antimicrobiana del Instituto Nacional de Salud (45), indica que una cepa es Resistente al antibiótico Gentamicina (10  $\mu$ g) con valores  $\leq 12$ , Intermedio =13-14 y Sensible con valores  $\geq 15$ . Esto esta estandarizado de acuerdo a tablas establecidas de sensibilidad para el tratamiento control (Gentamicina).

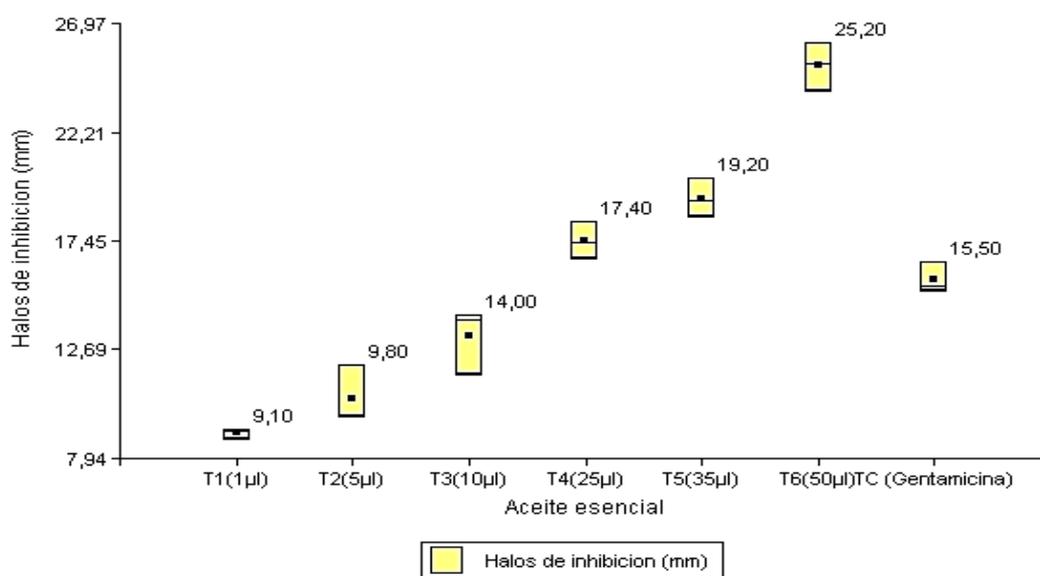
Para establecer la categorización de la susceptibilidad antimicrobiana del aceite esencial de la planta cola de caballo y el fármaco Gentamicina frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, se procedió a llevar los promedios a números enteros y resultaron de la siguiente manera: El tratamiento control positivo (Gentamicina) obtuvo un diámetro de inhibición de 16 mm, lo cual se categoriza como Sensible según dicho manual, así como también los tratamientos con 25, 35, 50  $\mu$ l del aceite esencial de *Equisetum arvense*, obtuvieron valores de halos de inhibición por encima de 15 mm, por lo cual se categorizan como Sensible, susceptibilidad Intermedia para el tratamiento con 10  $\mu$ l que resultó con 13 mm de halo de inhibición. Por ultimo resultaron Resistente para los tratamientos de 1 y 5  $\mu$ l de aceite esencial, quienes formaron halos de 9 y 11 mm (tabla 7).

**Tabla 7. Categorización de la susceptibilidad de *Escherichia coli* frente al aceite esencial de *Equisetum arvense* “Cola de caballo”, según diámetro del halo de inhibición, obtenidos en la Facultad de Ciencias Biológicas UNA – Puno, durante abril a junio del 2017.**

Dosis de aceite esencial	Halos de inhibición (mm)	Categorización
1µl	9	Resistente
5µl	11	Resistente
10µl	13	Intermedio
25µl	18	Sensible
35µl	19	Sensible
50µl	25	Sensible
Gentamicina 10µg	16	Sensible

Para analizar estadísticamente las diferencias observadas se procedió con el análisis de varianza (ANOVA) respectivo:

Los 7 tratamientos realizados en la investigación resultaron con diferencia estadística significativa ( $F_c=86.35$ ;  $gl=6$ ;  $p<0,0001$ ), demostrando que al menos uno de los tratamientos con aceite esencial de *Equisetum arvense* fue diferente y posee efecto antibacteriano en cepas de *Escherichia coli* ATCC. Teniendo en cuenta la significancia de la prueba de análisis de varianza, la prueba de Tukey resultó que el mejor tratamiento fue el T6 (Aceite esencial con 50 µL) (Figura 4).



**Figura 5. Diferencia estadística significativa del efecto antibacteriano del aceite esencial de *Equisetum arvense* a diferentes dosis, comparado con el antibiótico Gentamicina, obtenidos en la Facultad de Ciencias Biológicas UNA – Puno, durante abril a junio del 2017.**

Resultados similares al de esta investigación se obtienen al utilizar el efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare*, obteniendo un halo de inhibición de 22 mm frente a la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922, se categorizo como Sensible (20), similar efecto causo el tratamiento 6 con aceite esencial de *Equisetum arvense* con un promedio de halo de 25 mm. En la revisión realizada acerca de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales parece indicar que la actividad no se puede atribuir a un único componente mayoritario, sino que, al tratarse de mezclas muy complejas, su actividad antimicrobiana es el resultado de una sinergia entre todos sus componentes (61).

La acción bactericida de las plantas, depende mucho de los compuestos activos presentes, los más activos son los aceites esenciales ricos en fenoles, como es el caso del tomillo que contiene altos porcentajes de timol y carvacrol, clavo de olor (*Eugenia caryophyllus*) contiene eugenol e isoeugenol (20), y las esencias con alcoholes y cetonas: menta (mentol y mentona), orégano (carvacrol y timol). Gracias a esta actividad, las esencias son muy usadas para problemas de las vías respiratorias, como antiséptico bucal y para infecciones urinarias (18).

En tanto un estudio demuestra la composición del aceite esencial de *Equisetum arvense* (cola de caballo), identificando 25 componentes, siendo los de mayor porcentaje el Hexahydrofarnesyl acetone (18.34%), cis-geranyl acetone (13.74%), thymol (12.09%), trans-phytol (10.06%) y Carvacrol (7.5%), este mismo aceite esencial fue aplicado para determinar el efecto inhibitorio de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enteritidis*, los resultados fueron favorables ya que todas fueron sensibles a una dilución de 1:10 (19), este estudio concuerda con nuestro trabajo ya que se demostró también que *Escherichia coli* ATCC 25922 es sensible a todas las dosis de dicho aceite esencial.

Según la bibliografía revisada refiere que el Carvacrol y Timol son componentes que tienen la capacidad de destruir la estructura de la membrana celular de los microorganismos, causando el incremento de su permeabilidad y por consiguiente la salida de iones inorgánicos, ATP, ácidos nucleicos y aminoácidos, etc. (20) Y se sabe que el aceite esencial de *Equisetum arvense* tiene ciertos porcentajes mencionados anteriormente de carvacrol y timol, esto apoyaría al resultado obtenido en esta investigación, ya que serían estos componentes y otros más, los que causan el efecto inhibitorio de *Escherichia coli* ATCC 25922.

- **Susceptibilidad de *Escherichia coli* frente al extracto etanólico de *Equisetum arvense***

Del mismo modo que la anterior, las lecturas del ensayo de disco difusión a diferentes dosis del extracto etanólico de la planta cola de caballo frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, resultaron que el control positivo (Gentamicina 10 µg), obtuvo un promedio de diámetro de halo de inhibición de 15.7mm y representa el 100% del porcentaje de inhibición por ser control, mientras para los discos con extracto etanólico de *Equisetum arvense*, los cuales se evaluaron a dosis de 1, 5, 10, 25, 35, y 50 µL frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, se encontraron diámetros de halos de inhibición promedios de 7.1, 7.5, 9.1, 15.7, 17.4 y 20.3 mm respectivamente, mostrando así, que la menor dosis de 1 µL (0.9 µg) formó un halo de inhibición de 7,1mm, quien representa el 45% de inhibición y la mayor dosis de 50 µL (45 µg) formó un halo de 20.3mm, el cual es superior al control Gentamicina (10 µg) con un porcentaje de inhibición de 127%, en tanto las dosis con similares porcentajes de inhibición al control positivo fueron 10 y 25 µl con 98 y 109%, como se muestra en la (Tabla 8).

**Tabla 8. Diámetro de halos de inhibición en (mm) tratados con concentraciones de extracto etanólico, comparado con el control positivo (Gentamicina), obtenidos en la Facultad de Ciencias Biológicas UNA – Puno, durante abril a junio del 2017.**

concentraciones de extracto etanólico	Halos de inhibición frente a <i>E. coli</i> ATCC 25922 (mm)			Promedio de halo (mm)	% de inhibición
	R1	R2	R3		
1 µl	7.8	7.1	6.5	7.1	45%
5 µl	8.5	6.9	7.2	7.5	47%
10 µl	9.8	8.9	8.5	9.1	57%
25 µl	15	16.3	16.5	15.7	98%
35 µl	17.9	18.2	16.2	17.4	109%
50 µl	20	19.2	21.8	20.3	127%
Gentamicina	15.4	16.1	15.5	15.7	100%

Para establecer la categorización de la susceptibilidad antimicrobiana del extracto etanólico de la planta “cola de caballo” y el fármaco Gentamicina frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, se procedió de la misma manera que con el aceite esencial y estas resultaron de la siguiente manera: El tratamiento control positivo (Gentamicina) obtuvo un diámetro de inhibición de 16 mm, lo cual se categoriza como Sensible según el manual de procedimiento para la prueba de sensibilidad del INS, en tanto los tratamientos con las diferentes dosis del extracto etanólico de *Equisetum arvense*,

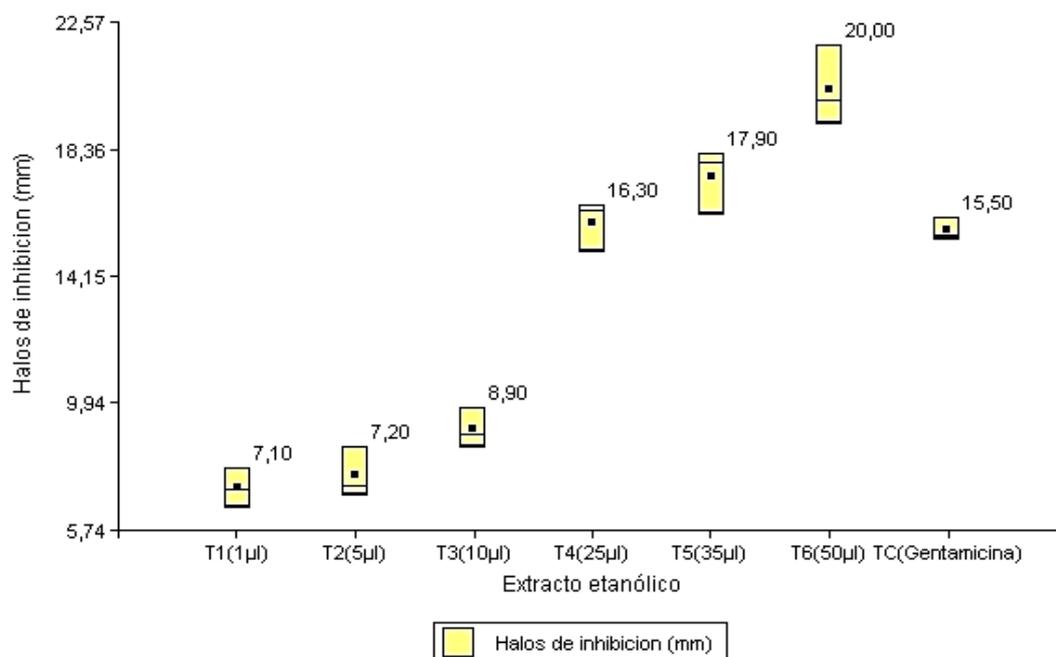
también resultaron Sensibles para *Escherichia coli* ATCC 25922 y se obtuvieron valores de halos de inhibición mayores a 15 mm, no obstante se mostró Resistente para aquellas dosis de menor concentración, las cuales formaron halos de 7, 8, 9 mm (tabla 9)

**Tabla 9. Categorización del Extracto etanólico de *Equisetum arvense* “Cola de caballo” frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 según diámetro del halo de inhibición, obtenidos en la Facultad de Ciencias Biológicas UNA – Puno, durante abril a junio del 2017.**

Dosis de extracto etanólico	Halos de inhibición (mm)	Categorización
1µl	7	Resistente
5µl	8	Resistente
10µl	9	Resistente
25µl	16	Sensible
35µl	17	Sensible
50µl	20	Sensible
Gentamicina 10µg	16	Sensible

Para analizar estadísticamente las diferencias observadas se procedió con el análisis de varianza (ANOVA) respectivo:

Los 7 tratamientos realizados en la investigación resultaron con diferencia estadística significativa ( $F_c=41,11$ ;  $gl=6$ ;  $p<0,0001$ ), demostrando que al menos uno de los tratamientos (de extracto etanólico *Equisetum arvense*) fue diferente y posee efecto antimicrobiano en cepas de *Escherichia coli* ATCC. Teniendo en cuenta la significancia de la prueba de análisis de varianza, la prueba de Tukey resultó que el mejor tratamiento fue el T6 (Extracto etanólico a una concentración de 50 µl) (Figura 4).



**Figura 6. Diferencia estadística significativa del efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Equisetum arvense* a diferentes dosis, comparado con el antibiótico Gentamicina, obtenidos en la Facultad de Ciencias Biológicas UNA – Puno, durante abril a junio del 2017.**

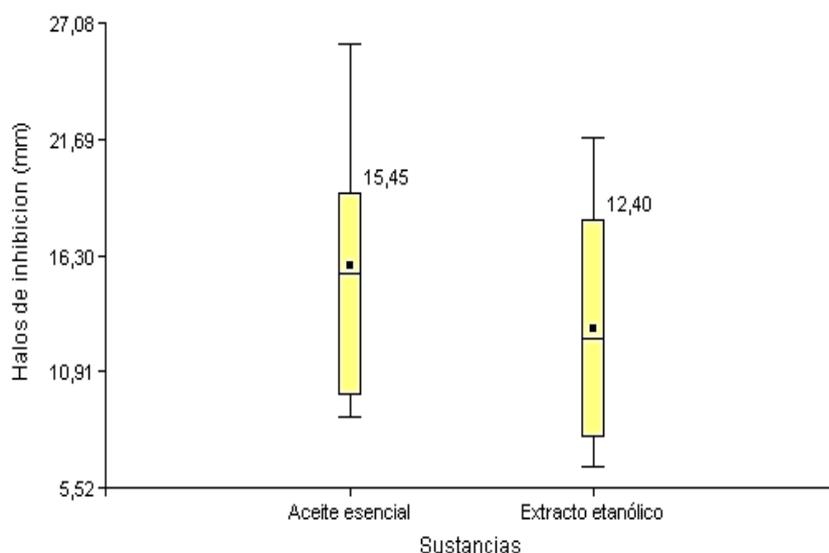
Los resultados obtenidos en esta investigación fueron favorables debido a que *Escherichia coli* ATCC 25922 se mostró sensible a las concentraciones del extracto etanólico y aceite esencial de la planta “cola de caballo”. Estos resultados concuerdan con un estudio realizado con extracto etanólico al 40% de *Psidium guajava* L., quien también mostró actividad inhibitoria contra *Escherichia coli* ATCC 25922, formando un halo de 16 mm (Sensible), el cual en este estudio a una concentración de 25 µl muestra resultados similares (62). Por otro lado cepas ATCC 33201 de *C. jejuni*, fueron resistentes a los extractos de “cola de caballo” ya que ninguna concentración inhibió el crecimiento de *C. jejuni*, quien mostraría resultados opuestos a la de esta investigación (63).

La planta “cola de caballo” contiene un número de flavonoides, alcaloides, minerales, petrosinas fenólicas, triterpenoides, saponinas, fitoesteroles, sales potásicas, una saponina tóxica llamada equisetonina. y principios amargos a quienes se les atribuiría el efecto antimicrobiano (64), otro estudio corrobora con lo mencionado anteriormente en la que determina la presencia de ciertos metabolitos secundarios como: flavonoides en un alto contenido, la presencia de alcaloides, lactonas, cumarinas, catequinas, resinas,

saponinas, taninos y antraquinonas, mientras que en poca cantidad se encuentran triterpenos y/o esteroides, azúcares reductores (65). Diferentemente de lo que ocurre con los agentes antibióticos y quimioterapéuticos, hay pocos registros en la literatura en cuanto al posible mecanismo de acción de productos de origen vegetal (9).

Resultados semejantes son reportados para el extracto etanólico de *Equisetum arvense*, demostrando actividad antibacteriana contra microorganismos Gram positivos y Gram negativos, siendo esta actividad asumida por la presencia de compuestos fenólicos, taninos, terpenoides, alcaloides y flavonoides en el extracto etanólico de *Equisetum arvense* (10). Por otro lado, el extracto metanólico de *Equisetum arvense* según un estudio realizado, se identificó 6 compuestos principales como son el 3, 7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol, Hexadecan-1-ol, Ácido linolénico Ester de metilo, ácido octadecanoico metil Esther, ácido ftálico y el ácido giberelico (66). No obstante el extracto acuoso de la planta “cola de caballo” inhibió los cultivos de *S. aureus* y que según el análisis químico realizado se informó la presencia de ácido silícico, azúcares, esteroides, compuestos fenólicos, alcaloides, flavonoides, taninos, glicósidos, saponinas y ácido aconítico (67).

Al hacer una comparación entre los tratamientos con aceite esencial y extracto etanólico de *Equisetum arvense*, estos no presentaron diferencia estadística significativa ( $F_c = 2.35$ ;  $GL = 1$ ;  $P = 0.1566$ ), lo que indica que el efecto inhibitorio causado por los tratamientos con aceite esencial y extracto etanólico de *Equisetum arvense*, son similares. Sin embargo los promedios son aritméticamente diferentes como se observa en la (Figura 7).

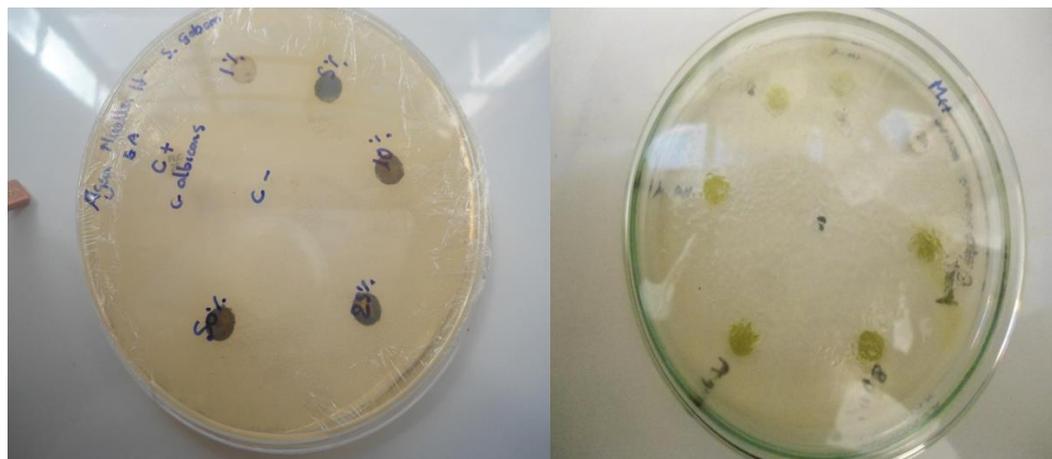


**Figura 7. Diferencia estadística no significativa de los diámetros de halos de inhibición según extractos etanólicos y aceites esenciales de *Equisetum arvense* a concentraciones de 1, 5, 10, 25, 35, 50  $\mu$ L, durante abril a junio 2017.**

Esta diferencia aritmética se debería a que ambos (aceite esencial y extracto etanólico), tendrían propiedades diferentes, ya que el aceite esencial es extraído por una corriente de vapor de agua a baja presión, la cual, es capaz de extraerlas de las glándulas secretoras de esencia, en tanto el extracto etanólico se obtiene macerando la planta aromática en etanol, por lo que sólo se extrae los compuestos solubles en este alcohol (33), por ende no tienen las mismas moléculas o en la misma concentración que en el aceite esencial.

**b) Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de *Candida albicans* frente al aceite esencial y extracto etanólico de *Equisetum arvense* comparado con el fármaco Fluconazol.**

Los resultados obtenidos con respecto al efecto del aceite esencial y extracto etanólico de *Equisetum avense L.* en *Candida albicans* (Figura 8), no se representan en una tabla en razón de que ésta levadura, resultó resistente a todas las concentraciones experimentales de aceite esencial y extracto etanólico de *Equisetum avense L.*, incluso se mostró también resistente al control positivo (Fluconazol), esta resistencia indicaría lo que viene sucediendo en la ciudad de Puno y en el Perú, el efecto de la resistencia antibiótica de los microorganismos, debido a la principal causa que es la automedicación.



**Figura 8. Susceptibilidad antimicrobiana de *Candida albicans* frente al extracto etanólico y aceite esencial de *Equisetum arvense* (cola de caballo), Facultad Ciencias Biológicas, UNA-Puno, abril - junio del 2017.**

Otro estudio demostró que *C. albicans* también es resistente al extracto etanólico de *Psidium guajava* L. (guayaba) a una concentración de 40% (62). Por otro lado no concuerda con el estudio realizado con aceite esencial de *Minthostachys mollis* “Muña” frente a cepas de *Candida albicans*, este obtuvo resultados favorables con hasta 29 mm de diámetro del halo de inhibición con una concentración de 250µl/ml, superando así al control positivo (Fluconazol) con un DHI de 25 mm, este último efecto no se dio en esta investigación ya que la cepa estudiada se mostró resistente al Fluconazol (17).

Por otro lado, *Candida albicans* se mostró sensible al extracto etanólico de *Schinus terebinthifolius* (copal), formando un halo de inhibición de hasta 25.3 mm al utilizar una concentración de 80% de extracto, mostrando incluso mayor efecto frente a cepas bacterianas (68).

La resistencia de *Candida albicans*, se debería a tres posibles mecanismos: el primero es la modificación de la enzima del blanco, el segundo la incapacidad de alcanzar concentraciones adecuadas del antibiótico en el sitio de acción por la presencia de barreras de permeabilidad o sistemas de bombeo activo y por último la inactivación del antibiótico por modificación del mismo (4).

En otros estudios realizados con aceite esencial de orégano en el que los compuestos mayoritarios también son los compuestos fenólicos carvacrol (43%) y thymol (22%) se obtuvieron muy buenos resultados frente a los hongos aislados del arroz *Fusarium culmorum* y *Fusarium verticillioides* y también frente a *Alternaria alternata*, *Bipolaris*

*oryzae*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium equiseti* y *Fusarium verticillioides*). Además, estudios recientes confirman que la eficacia del thymol como antifúngico es mayor cuando se encapsuló en material mesoporoso de sílice MCM-41 que cuando se encuentra en estado puro (61).

## V. CONCLUSIONES

1. El aceite esencial y extracto etanólico de *Equisetum arvense* “cola de caballo”, presentan actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, siendo el aceite esencial más activo con 1% de CMI frente al extracto etanólico quien posee una CMI de 2.5%. Por otro lado no se pudo determinar la CMI del aceite esencial y extracto etanólico frente a *Candida albicans*, puesto que las concentraciones aplicadas en este estudio, no fueron las suficientes para inhibir el crecimiento en *Candida albicans*.
2. *Escherichia coli* ATCC 25922 es susceptible a las dosis de aceite esencial y extracto etanólico aplicadas en este estudio, comparando con el fármaco Gentamicina, el aceite esencial y extracto etanólico a dosis similares con el fármaco, poseen susceptibilidad antibacteriana similar. Por otra parte la susceptibilidad de *Candida albicans*, frente al aceite esencial y extracto etanólico de *Equisetum arvense* “cola de caballo” fue nula, debido a que esta levadura se mostró resistente a todas las dosis aplicadas, incluyendo al fármaco Fluconazol.

## VI. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar estudios con concentraciones de aceite esencial y extracto etanólico de “cola de caballo” mayores al 5%, para determinar la concentración mínima inhibitoria de *Candida albicans*, debido a que las concentraciones aplicadas en este estudio no fueron las suficientes para alcanzar una CMI, para dicha levadura.
2. Determinar la susceptibilidad antimicrobiana de otras especies bacterianas como también fúngicas, frente al aceite esencial o extracto etanólico de *Equisetum arvense* y determinar la composición fitoquímica cuantitativa de los principios activos con potencial de efecto antimicrobiano.

## VII. REFERENCIAS

1. Tucto E., Hurtado T., Mercado P. Resistencia bacteriana de *Escherichia coli* uropatógena aislada en el laboratorio de microbiología del Hospital II Chocope – EsSalud. Rebiolest. 2014. 26 – 39.
2. MINSA, Dirección de Epidemiología. Boletín epidemiológico. Vol.26 SE13. 2017.
3. Organización Mundial de la Salud. *Escherichia coli*. 2016. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/>
4. Gómez C. Resistencia de levaduras del género *Candida* al fluconazol. Revista Infectio. 2010: 172- 180.
5. Organización Mundial de Salud. Primer informe de resistencia antimicrobiana. Ginebra. 2014 (citado 2016 set. 15). Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/>.
6. Castro R. Patrones de resistencia antimicrobiana en uropatógenos Gram negativos aislados de pacientes ambulatorios y hospitalizados. Revista de salud pública. 2010:1010 – 1019.
7. Villavicencio O. Criterios de aplicación clínica de las plantas medicinales. Lima. 2010.
8. Instituto Biológico. Manual de fitoterapia. Lima. 2011.
9. Baez M. Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos y metanólicos de “cola de caballo” sobre *Aeromonas spp.* y *Staphylococcus aureus*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Agrarias. Fundación Universitaria Juan de Castellanos - Colombia. 2015
10. Bohatch J., Esmerino L., Zanoni R., Volpato A. Efectos de la actividad antimicrobiana del extracto bruto etanólico de *Piper solmsianum* y *Equisetum arvense*. *Rev. Electrónica de farmacia*. 2015: Vol. (II). 53-62.
11. Santana R. Aplicación de cola de caballo (*Equisetum arvense*) para el control ecológico de roya (*Puccinia sp.*) en el cultivo de cebolla blanca (*Allium fistulosum*). 488 Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Técnica de Ambato – Ecuador. 2014.
12. Arapa, F. Actividad antibacteriana del aceite esencial de ajeno (*Artemisia absinthium* L) frente a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) “in vitro”, Puno.

- Tesis de licenciatura .Facultad de Ciencias Biológicas. UNA, Puno, Perú. 2013.  
Citado por Guevara J. (16 p8).
13. Castro A. Evaluación de la actividad *in vitro* del aceite esencial de *Matricaria recutita* (manzanilla), sobre cepas puras extraídas de lesiones bucofaríngeas de *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*. Universidad Católica Santa María, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Arequipa, Perú.2000. Citado por Guevara J. (16 p5).
  14. Guevara J. Actividad antibacteriana“*in vitro*” del aceite esencial del chiri-chiri *Grindelia boliviana* R., frente a *Staphylococcus aureus* ATCC. Tesis de licenciatura. Facultad de ciencias biológicas. UNA-PUNO. 2014.
  15. Zuni J. actividad antibacteriana “*in vitro*” del aceite esencial de menta (*Mentha piperita* L.). frente a *E.coli* enteropatógena (EPEC). tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. UNA- PUNO. 2017.
  16. Estrada S. Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*) y tomillo (*Thymus vulgaris*). Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. Escuela Superior Politecnica de Chimborazo. Ecuador. 2010.
  17. Salas A. Efecto antimicrobico del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña). Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. UNA – PUNO. 2016.
  18. Flores M. Investigación de los aceites esenciales, sus características y finalidad de uso. Tesis de licenciatura. Universidad de Chile. Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas. 2010.
  19. Radulovic N y Stajnovic. Composition and antimicrobial activity of *Equisetum arvense* L. essential oil. Rev. Fithoterapy. Vol 20(1).2006.
  20. Chavez L., efecto sinérgico del aceite esencial de *Origanum vulgare* a la gentamicina en cultivos de *E.coli*. Rev. CIMEL. Vol 13(2). 2006
  21. Ponce J. *Equisetum arvense*. Asociación de agricultura biodinámica. España. 2008.
  22. Soria Natural. Manual de fitoterapia “cola de caballo” *Equisetum arvense*. Disponible en :[http://www.sorianatural.es/es/soria-natural/fitoterapia/60/4/cola-de-caballo-equisetum-arvense-?id\\_producto=152&producto=COL%20\(Brassica%20Oleracea%20var.%20viridis\)](http://www.sorianatural.es/es/soria-natural/fitoterapia/60/4/cola-de-caballo-equisetum-arvense-?id_producto=152&producto=COL%20(Brassica%20Oleracea%20var.%20viridis))
  23. Organización Mundial de la Salud. Plantas medicinales. 1987.

24. Vila R. Análisis del uso de plantas medicinales en el mercado de abastos ventanilla. Tesis de licenciatura. Facultad de farmacia y bioquímica Universidad Mayor de San Marcos. 2009.
25. Instituto Nacional de Salud. Catalogo florístico de plantas medicinales peruanas. Lima. 2013.
26. Organización Mundial de la Salud. Nuevas directrices para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales. Ginebra. 2004.
27. Palacios M. Apuntes de metabolitos primarios y secundarios. Universidad católica Los Ángeles de Chimbote. Escuela de farmacia y Bioquímica.
28. Servicio Nacional de Aprendizaje. Introducción a la industria de los aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas. 2010.
29. Gonzales P. *et al.* Extracción de aceite esencial de *Myrtus communis* y su estudio de la actividad antibacteriana. Universidad Nacional Agraria la Molina. 2010.
30. Kuklinski G. farmacognosis. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Editorial Omega. Barcelona. 2003.
31. Burt. Essential oil their antibacterial properties and potencial applications in foods. Internacional journals of food microbiology 99(1). 2004.
32. Fisher K. *et al.* Potential antimicrobial uses of essential oils in food. Food science and technology. 19(1): 156-164 p. (2008).
33. Gonzales A. obtención de aceites y extractos etanólicos de plantas del amazonas. Tesis de licenciatura. Universidad nacional de Colombia. 2004.
34. Dueñas E. Cola de caballo. Laboratorio de remedios herbolarios. 2002.
35. León B. Cola de caballo (*Equisetum*, equicetaceae ) comercializada en el Perú y exportada del Perú. Rev. Peruana de biología. 19(3).345-346. 2012.
36. Linares N. plantas medicinales. Centro de empresas Loeches. Madrid. 2013.
37. Natural alternative remedy. 2010. ( citado 2017 julio 08) disponible en: <http://www.naturalalternativeremedy.pe>
38. Molina y Manjarrez. Infecciones de vías urinarias. Departamento de salud pública UNAM. 2015. Disponible en: <file:///H:/referencias%20para%20quemar%20CD/POSTPOLIO%20SINDROME%20IGNORADO%20%20INFECCIONES%20DE%20VÍAS%20URINARIAS%20-%20ESCHERI>
39. Pigrau C. infecciones del tracto urinario. SALVAT. 2013.

40. Rondon M., *et al.* Infecciones de tracto urinario. CODEPRE. 2007.
41. Reymaund A. infecciones vaginales por *Candida*. Rev. Per. de ginecología. Vol. (53): 159 – 166. 2007.
42. Vives E., Medvedovsky D., Rothlin R., Aminoglucosidos. Departamentno de farmacología II. 2004.
43. Rodriguez M. Rev Enf. Infect. y Micro. Gentamicina. 22(1): 20 – 30. 2002.
44. Rivas A. y Cardona N. antimicóticos de uso sistémico. Rev. CES Med. 23(1): 61 – 76. 2009.
45. Talhalt, *et al.* Infecciones urinarias fúngicas. 2008. (citado 2017 julio 09). Disponible en: <http://www.Insdmanuals.com/es>.
46. Arenas R. Micología medica ilustrada. 2da ed. 2003.
47. Bedout C. evaluación de la susceptibilidad de especies de *Candida* al fluconazol por el método de difusión de disco. Rev. Biomédica. 23(1): 31-37. 2003.
48. Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antibacteriana por el método de difusión de disco, serie de normas técnicas. 68 pag. Lima – Peru. 2002.
49. Sherris J, Ryan C. microbiología medica. 2 ed. 2002.
50. Bruneton J. Farmacognosis fitoquímica de plantas medicinales. 2 ed. Zaragoza. 2001
51. Castillo A. propagación de plantas por cultivo *In vitro* una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. INIA.
52. Sisa T. recolección de plantas medicinales. Medicina natural al alcance de todos. (citado 2017 julio 01). Disponible en: <http://ecoaldea.com/plmd/recoleccion.htm>. 2004.
53. Banhero L., Carballo S., Telesca J. Manual de secado solar de especies medicinales y aromáticas para predios familiares. INIA. Montevideo – Uruguay. 2008
54. Mamani P. Evaluación de la actividad antibacteriana “*in vitro*” del aceite esencial de hojas de *Aloysia triphylla* “cedron”. Frente a *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus*, Universidad Nacional Jorge Basadre de Tacna. 2007.
55. Aligiannis N., *et al.* Composition and antimicrobialactivity of the essential oils. Rev. J. Agric food chem. 49:4168 – 4170. 2001.
56. Corzo P. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos. Rev. Mexicana de ciencias farmacéuticas. 43(3):81 – 86. 2012.

57. Castaño H. Ciro G., Zapata J. actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis L.* sobre algunas bacterias de interés alimentario. Rev. Facultad de Química Farmacéutica. Vol. 17 (2), 2010.
58. Duarte M, Figueira G, Sartoratto A., Antibacterial activity of Brazilian medicinal plants. J Ethnopharmacol. 2005. 28;97(2):305-11.
59. Quintanilla J. efecto antimicótico *In vitro* del carvacrol (aceite de oregano) sobre *Candida albicans*. Universidad Norbert Wiemer. 2010.
60. Velasquez J. efecto antimicótico del aceite esencial de molle (*Schinus molle*) sobre *Trichophyton mentagrophytes*. Universidad Alas Peruanas.
61. Marquez M. composición química de los aceites esenciales de lavanda y tomillo. Tesis de licenciatura. Universidad Politecnica de Valencia. 2015.
62. Martinez M. Molina E. evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajava L.* Rev. cubana de plants. Med. 2(1): 12-14. 1997
63. Velasquez V. Evaluación del efecto bactericida en *Campylobacter jejuni*, *Menta spicata*, *Litsea guatemalensis*, *Thymus vulgaris* y *Apium graveolens*, tesis de licenciatura, Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. 2011.
64. Singh N. *et al.* Equisetum arvense: pharmacology and phytochemistry. Rev. Pharmaceutical and clinical research. Vol (3)3. 2010.
65. Orozco M. evaluación de la actividad cicatrizante de un gel elaborado a base de los extractos de molle (*Schinus molle*), cola de caballo (*Equisetum arvense L.*), linaza (*Linum usitatissimum L.*) en ratones (*Mus musculus*)”. Tesis de pregrado. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. 2013
66. Yilmaz *et al.* Determination of bioactive compounds of Equisetum arvense by gas chromatography – mass spectrometry method. International journal pharmacognosy. Vol 1 (3). 184 – 188. 2014.
67. Pontón J y Quindet G. Mecanismo de resistencia a la terapia antifúngica. Departamento de inmunología, microbiología y parasitología.
68. Lopez M. *et al.* Actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 80% de *Schinus terenbinthifolium Raddi* (copal). Rev, cubana plant, med. 5(1): 23-5. 2011.

## ANEXOS

## ANEXO A



**Figura 9. Recolección de plantas de *Equisetum arvense* (cola de caballo), recolectado en Marangani, durante febrero a marzo del 2017.**



**Figura 10. Secado de plantas de *Equisetum arvense* (cola de caballo), realizado en Puno, durante marzo del 2017**

## ANEXO B



**Figura 11.** Obtención de aceite esencial de *Equisetum arvense* por el método de destilación de arrastre por vapor, Facultad de Ingeniería Química, UNA-Puno, durante abril a junio 2017.



**Figura 12.** Obtención de extracto etanólico por el método de maceración al frío. Facultad de Ciencias Biológicas UNA – Puno, durante abril a junio del 2017.

## ANEXO C



**Figura 13. *Escherichia coli* sensible a concentraciones de aceite esencial y extracto etanolico de *Equisetum arvense* (cola de caballo). Realizado en la Facultad Ciencias Biológicas UNA-Puno, durante abril a junio de 2017.**