



Universidad
Norbert Wiener

Powered by Arizona State University

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA

Tesis

Acción antibacteriana del extracto etanólico de Azadirachta Indica (Neem) en comparación con el Gluconato de Clorhexidina al 0.12% con Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% frente a las cepas de Porphyromonas gingivalis. Estudio in vitro. Lima. 2023

Para optar el Título Profesional de
Cirujano Dentista

Presentado por:

Autora: Rosas Benites, Viviangelli Vanessa


Código ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-0448-3468>

Asesora: Mg. Morante Maturana, Sara Angélica

Código ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9715-728X>

Lima – Perú

2024

	DECLARACIÓN JURADA DE AUTORIA Y DE ORIGINALIDAD DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN		
	CÓDIGO: UPNW-GRA-FOR-033	VERSIÓN: 01 REVISIÓN: 01	FECHA: 08/11/2022

Yo, Viviangelli Vanessa Rosas Benites egresado de la Facultad de ciencias de la Salud y Escuela Académica Profesional de Odontología de la Universidad privada Norbert Wiener declaro que el trabajo académico “Acción antibacteriana del extracto etanólico de Azadirachta Indica (Neem) en comparación con el Gluconato de Clorhexidina al 0.12% con Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% frente a las cepas de Porphyromonas gingivalis. Estudio in vitro. Lima. 2023” Asesorado por el docente: Mg CD. Sara Angelica Morante Maturana DNI 10138106 ORCID 0000-0001-9715-728X tiene un índice de similitud de 18% con código [oid:14912:301752786](https://orcid.org/0000-0001-9715-728X) verificable en el reporte de originalidad del software Turnitin.

Así mismo:

1. Se ha mencionado todas las fuentes utilizadas, identificando correctamente las citas textuales o paráfrasis provenientes de otras fuentes.
2. No he utilizado ninguna otra fuente distinta de aquella señalada en el trabajo.
3. Se autoriza que el trabajo puede ser revisado en búsqueda de plagios.
4. El porcentaje señalado es el mismo que arrojó al momento de indexar, grabar o hacer el depósito en el turnitin de la universidad y,
5. Asumimos la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión en la información aportada, por lo cual nos sometemos a lo dispuesto en las normas del reglamento vigente de la universidad.




.....
Firma de autor 1
 Viviangelli Vanessa Rosas Benites
 DNI: 73690641



.....
Firma
 Mg CD. Sara Angelica Morante Maturana
 DNI: 10138106

Lima, 03 de enero de 2024

 Universidad Norbert Wiener	DECLARACIÓN JURADA DE AUTORIA Y DE ORIGINALIDAD DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN		
	CÓDIGO: UPNW-GRA-FOR-033	VERSIÓN: 01 REVISIÓN: 01	FECHA: 08/11/2022

Es obligatorio utilizar adecuadamente los filtros y exclusión del turnitin: excluir las citas, la bibliografía y las fuentes que tengan menos de 1% de palabras. EN caso se utilice cualquier otro ajuste o filtros, debe ser debidamente justificado en el siguiente recuadro.

Se realizó la eliminación de coincidencia en la similitud de índice. La informa-
 información excluida no afecta la originalidad de la investigación.

Tesis

Acción antibacteriana del extracto etanólico de *Azadirachta Indica* (Neem) en comparación con el Gluconato de Clorhexidina al 0.12% con Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% frente a las cepas de *Porphyromonas gingivalis*. Estudio *in vitro*. Lima. 2023

Línea de investigación general

Salud, Enfermedad y Ambiente

Línea de investigación específica

Microbiología

ASESORA

Mg. Esp. CD. Sara Angélica Morante Maturana

Código ORCID:

<https://orcid.org/0000-0001-9715-728X>

Índice

CAPÍTULO I: EL PROBLEMA	1
1.1. Planteamiento del problema	2
1.2. Formulación del problema	3
1.2.1. Problema general	3
1.2.2. Problemas específicos	3
1.3. Objetivos de la investigación	4
1.3.1. Objetivo general	4
1.3.2. Objetivos específicos	4
1.4. Justificación de la investigación	5
1.4.1. Teórica	5
1.4.2. Metodológica	5
1.4.3. Práctica	6
1.5. Delimitación de la investigación	6
1.5.1. Temporal	6
1.5.2. Espacial	6
1.5.3. Población o unidad de análisis	7
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	8
2.1. Antecedentes	8
2.2. Marco teórico	15
2.3. Formulación de hipótesis	36
2.3.1. Hipótesis general	36
2.3.2. Hipótesis específicas	36
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	38
3.1. Método de la investigación	38
3.2. Enfoque de la investigación	38
3.3. Tipo de investigación	38
3.4. Diseño de la investigación	38
3.4.1. Corte	39
3.4.2. Nivel o alcance	39
3.5. Población, muestra y muestreo	39
3.5.1. Población	39
3.5.2. Muestra	39
3.5.3. Muestreo	40
3.5.4. Criterios de inclusión	41
3.5.5. Criterios de exclusión	41
3.6. Variables y operacionalización	42
3.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	43
3.7.1. Técnica	43
3.7.2. Descripción de instrumentos	43
3.7.3. Validación	43
3.7.4. Confiabilidad	44
3.8. Plan de procesamiento y análisis de datos	47

3.9. Aspectos éticos.....	48
CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN DE RESULTADOS.....	50
4.1. Resultados.....	50
4.1.1. Análisis descriptivo de los resultados	50
4.1.2. Análisis de normalidad de resultados.....	57
4.1.3. Pruebas de Kruskal Wallis y U de Mann Whitney.....	58
4.1.4. Pruebas de Friedman y Wilcoxon	59
4.1.5. Comprobación de hipótesis.....	60
4.1.6. Discusión de resultados.....	67
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	71
5.1. Conclusiones	71
5.2. Recomendaciones.....	73
CAPÍTULO VI: REFERENCIAS	74
ANEXOS.....	86
Anexo 1: Matriz de consistencia	87
Anexo 2: Instrumento.....	90
Anexo 3: Certificados de validez del instrumento	93
Anexo 4: Constancia de exoneración de revisión	96
Anexo 5: Informe de resultados	97
Anexo 6: Certificado de bacteria en estudio <i>Porphyromonas gingivalis</i>	101
Anexo 7: Constancia de recolección de datos	102
Anexo 8: Constancia de eliminación de material de ensayo biocontaminado	103
Anexo 9: Procedimiento de elaboración del extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i>	104
Anexo 10: Ficha técnica del estándar de sulfato de bario Mc Farland 0.5	106
Anexo 11: Informe de Turnitin	107
Anexo 12: Informe del asesor.....	110
Anexo 13: Fotografías del ensayo.....	111

Índice de tablas y figuras

Tabla A. Clasificación de periodontitis por estadios, según la gravedad del diagnóstico inicial y la complejidad, sobre la base de factores locales.....	19
Tabla B. Clasificación de la periodontitis por grados que se fundamenta en factores modificados, así como en pruebas indirectas y directas.....	21
<u>Tabla n° 1.</u> Diferencia en la acción antibacteriana in vitro entre el extracto etanólico del <i>Azadirachta indica</i> comparado con el gluconato de clorhexidina al 0,12% con CPC al 0,05% sobre <i>Porphyromonas gingivalis</i>	50
<u>Figura n° 1.</u> Diferencia en la acción antibacteriana in vitro entre el extracto etanólico del <i>Azadirachta indica</i> comparado con el gluconato de clorhexidina al 0,12% con CPC al 0,05% sobre <i>Porphyromonas gingivalis</i>	50
<u>Tabla n° 2.</u> Acción antibacteriana del extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> al 25% frente a <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 (n=15) a las 24, 48 y 72 horas en agar Schaedler enriquecido.....	51
<u>Figura n° 2.</u> Acción antibacteriana del extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> al 25% frente a <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 (n=15) a las 24, 48 y 72 horas en agar Schaedler enriquecido.....	51
<u>Tabla n° 3.</u> Acción antibacteriana del extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> al 75% frente a <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 (n=15) a las 24, 48 y 72 horas en agar Schaedler enriquecido.....	52

Figura n° 3. Acción antibacteriana del extracto etanólico de *Azadirachta indica* al 75% frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (n=15) a las 24, 48 y 72 horas en agar Schaedler enriquecido.....52

Tabla n° 4. Acción antibacteriana del extracto etanólico de *Azadirachta indica* al 100% frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (n=15) a las 24, 48 y 72 horas en agar Schaedler enriquecido.....53

Figura n° 4. Acción antibacteriana del extracto etanólico de *Azadirachta indica* al 100% frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (n=15) a las 24, 48 y 72 horas en agar Schaedler enriquecido.....53

Tabla n° 5. Acción antibacteriana del gluconato de clorhexidina al 0.12% y CPC 0.05% frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (n=15) a las 24, 48 y 72 horas en agar Schaedler enriquecido.....54

Figura n° 5. Acción antibacteriana del digluconato de clorhexidina al 0.12% y CPC 0.05% frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (n=15) a las 24, 48 y 72 horas en agar Schaedler enriquecido.....54

Tabla n° 6. Acción antibacteriana in vitro del extracto etanólico de *Azadirachta indica* al 25%, 75% y 100% comparado con el gluconato de clorhexidina al 0,12% con CPC al 0,05% frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 dentro las 24, 48 y 72 horas.....55

Figura n° 6. Acción antibacteriana in vitro del extracto etanólico de *Azadirachta indica* al 25%, 75% y 100% comparado con el gluconato de clorhexidina al 0,12% con CPC al 0,05%

frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 dentro las 24, 48 y 72 horas.....55

Figura n° 7. Análisis de Normalidad por Shapiro Wilk (n=15) de los extractos etanólicos de *Azadirachta indica* frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 a las 24, 48 y 72 horas de estudio.....57

Tabla n° 8. Comparaciones múltiples de las acciones antibacterianas de extractos etanólicos de *Azadirachta indica* 25%, 75%, 100%, gluconato de clorhexidina al 0,12% y cloruro de cetilpiridinio al 0,05% y el suero fisiológico al 0,9%.....58

Tabla n° 9. Análisis de varianzas de los extractos etanólicos de *Azadirachta indica* 25%, 75%, 100%, gluconato de clorhexidina al 0,12% y cloruro de cetilpiridinio al 0,05% y el suero fisiológico al 0,9%.....59

Tabla n° 10. Prueba de Mann Whitney de la comparación del extracto etanólico de *Azadirachta indica* frente al Gluconato de clorhexidina al 0,12% con cloruro de cetilpiridinio 0,05%.....60

Tabla n° 11. Prueba de Mann Whitney de extracto etanólico de *Azadirachta indica* 25% comparado con Suero fisiológico al 0,9% (Control negativo).....61

Tabla n° 12. Prueba de Mann Whitney de extracto etanólico de *Azadirachta indica* 75% comparado con Suero fisiológico al 0,9% (Control negativo).....62

Tabla n° 13. Prueba de Mann Whitney de extracto etanólico de *Azadirachta indica* 100% comparado con Suero fisiológico al 0,9% (Control negativo).....63

Tabla n° 14. Prueba de Mann Whitney de Gluconato de clorhexidina al 0,12% con cloruro de cetilpiridinio 0,05% comparado con Suero fisiológico al 0,9% (Control negativo).....64

Tabla n° 15. Prueba de Mann Whitney de las concentraciones de extracto etanólico de *Azadirachta indica* comparado Gluconato de clorhexidina al 0,12% con cloruro de cetilpiridinio 0,05% a las 24, 48 y 72 horas.....65

Resumen

Con el propósito de aportar un enfoque terapéutico diferente y natural, se efectuó una investigación en la que se evaluó dicha diferencia en la acción antibacteriana *in vitro* entre el extracto etanólico del *Azadirachta indica* comparado con la clorhexidina al 0,12% con CPC al 0,05% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*. Cabe resaltar que la muestra estuvo conformada por 15 de muestra por sustancia de prueba; fraccionadas en grupos: tres grupos con el extracto etanólico al 25%, 75% y 100% y dos grupos con los respectivos controles tanto positivo como negativo que, en total se emplearon 75 placas de agar Schaedler enriquecido Es una investigación hipotética/ deductivo, desde un enfoque cuantitativo, de tipo aplicada, diseño experimental *in vitro*. Los resultados demostraron que existe acción antibacteriana significativo en relación con la medida de Duraffourd. Tratándose en el caso de la clorhexidina al 0,12% y CPC al 0,05% los valores medios después de transcurridas 24 h (14,34 mm), 48 h (14,22 mm) y 72 h (14,11mm); en cuanto al extracto etanólico al 100% presentó promedios, a las 24 h (11,38 mm), 48 h (11,27 mm) y 72 horas (11,15 mm); el extracto etanólico al 75% registró valores estadísticos, en 24 h (9,19 mm), 48 h (9,08 mm) y 72 h (8.97 mm); a la vez el extracto etanólico al 25% no presentó acción antibacteriana. Se llegó a la conclusión, que el gluconato de clorhexidina al 0,12% y CPC al 0,05% presenta mayor actividad antibacteriana en contraste con los extractos etanólicos en estudio.

Palabras clave: Clorhexidina, cetilpiridinio, periodontitis, *Azadirachta indica*, *Porphyromonas Gingivalis*.

Abstract

With the purpose of providing a different and natural therapeutic approach, an investigation was carried out in which this difference in the antibacterial action in vitro was evaluated between the ethanolic extract of *Azadirachta indica* compared to chlorhexidine at 0.12% with CPC at 0.05% on *Porphyromonas gingivalis* strains. It should be noted that the sample consisted of 15 samples per test substance; fractionated into groups: three groups with the ethanolic extract at 25%, 75% and 100% and two groups with the respective positive and negative controls that, in total, 75 plates of enriched Schaedler agar were used. It is a hypothetical/deductive investigation, since a quantitative approach, applied type, in vitro experimental design. The results demonstrated that there is significant antibacterial action in relation to the Duraffourd measure. In the case of 0.12% chlorhexidine and 0.05% CPC, the mean values after 24 hours (14.34 mm), 48 hours (14.22 mm) and 72 hours (14.11 mm) were used. ; As for the 100% ethanolic extract, it presented averages at 24 hours (11.38 mm), 48 hours (11.27 mm) and 72 hours (11.15 mm); the 75% ethanolic extract recorded statistical values, in 24 h (9.19 mm), 48 h (9.08 mm) and 72 h (8.97 mm); At the same time, the 25% ethanolic extract did not present antibacterial action. It was concluded that chlorhexidine gluconate at 0.12% and CPC at 0.05% presents greater antibacterial activity in contrast to the ethanolic extracts under study.

Keywords: Chlorhexidine, cetylpyridinium, periodontitis, *Azadirachta indica*, *Porphyromonas Gingivalis*.

Introducción

La investigación actual tuvo como lugar el Perú debido a que se ha observado que la periodontitis es uno de los principales problemas y cuestiones muy frecuentes dentro la región oral. Esta afección inflamatoria resulta de la acción de distintos microorganismos, principalmente de la incipiente bacteria anaerobia gramnegativa *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), que provoca cambios crónicos e irreversibles en el tejido periodontal. Hasta el momento, la clorhexidina (CHX) es ampliamente utilizada y estudiada en el ámbito de la odontología, junto con el cloruro de cetilpiridinio (CPC) para combatir microorganismos orales con éxito, no obstante, la aplicación prolongada podría ocasionar efectos secundarios indeseables. Por eso, existe el interés por hallar opciones que proporcionen una eficacia antimicrobiana equivalente con una reducida o casi nula de probabilidades de efectos adversos.

Este informe final se encuentra organizado en un total de cinco capítulos distintas que cada una, proporciona la descripción de su contenido y del proceso realizado para la ejecución del estudio. En el primer capítulo, se centra en la situación problemática asociado con las variables de estudio, que lleva un análisis de los entornos a nivel mundial, nacional y local, además de plantear las incógnitas fundamentales o las principales cuestiones como define el objetivo de la investigación y se expone la justificación que respalda la realización de la investigación, además de señalar sus delimitaciones. El foco del capítulo dos concentra su

atención en la base teórica donde respalda y fundamenta a las variables, también menciona y toma como referencia trabajos similares como sustento. El tercer capítulo relata la metodología utilizada, que explica y argumenta la tipología de la investigación y detalla el enfoque y diseño empleado en el estudio, además, incluye la explicación detallada de las variables y los instrumentos utilizados para recopilar la información. Como cuarto capítulo, ilustra los resultados hallados, analiza y constata las hipótesis, debate los hallazgos, además de presentar las correspondientes conclusiones al igual que exponer las recomendaciones para los futuros estudios. En última instancia, el quinto capítulo, se añaden las referencias bibliográficas usadas y una secuencia de anexos como datos extra e información complementaria.

A través del estudio desarrollado y los resultados alcanzados existe la posibilidad y condición de aportar una nueva alternativa terapéutica periodontal más eficaz y garantizada para la exterminación de dichos microorganismos empleando un producto de origen natural.

CAPÍTULO I: EL PROBLEMA

1.1 Planteamiento del problema

La enfermedad periodontal se caracteriza clásicamente por la destrucción progresiva de los tejidos blandos y duros del complejo periodontal, mediada por una interacción entre comunidades microbianas disbióticas y respuestas inmunes aberrantes dentro de los tejidos gingivales y periodontales. (1). Los datos brindados por la entidad sanitaria global, la cual es la Organización Mundial de la Salud (OMS) revela que dicha enfermedad periodontal, origina un impacto, daño y deterioro a la salud bucodental (2). Esta patología tiene su origen por la presencia de patógenos periodontales, principalmente bacterias anaerobias, estas bacterias logran colonizar y formar un biofilm subgingival, lo que provoca una disbiosis en el huésped susceptible. Uno de los microorganismos patógenos más comunes en este biofilm y una de las principales responsables tanto del inicio como de la progresión de esta enfermedad es la *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) (3).

Los factores principales que aumentan la posibilidad vinculada a esta condición es la ausencia de medidas adecuadas de higiene bucodental y el tabaquismo (4). Existe la convicción de que esta patología repercute negativamente en la capacidad de masticación, la situación de nutrición y la condición de vida de los individuos afectados (5) y su incidencia tiende a aumentar con la edad y se observa con mayor frecuencia en grupos socioeconómicos desfavorecidos (6).

De acuerdo con estudios realizados la enfermedad periodontal es la segunda afección oral más común después de la caries dental a nivel mundial en el año 2021(6). Según las estimaciones de la OMS, alrededor del 35-50% de la población a nivel global se ve afectada por las periodontopatías, lo cual equivale a una cifra de casos que supera los 1000 millones (7).

En los Estados Unidos, se ha calculado que alrededor del 47.2% de los adultos mayores de 30 años presentan periodontitis (8) y en América Latina se está mostrando tasas preocupantes de entre el 15% y el 18% (6). En Perú, según un estudio epidemiológico a nivel nacional realizado en 1990 y citado por el Ministerio de Salud (MINSA) en 2019, se encontró que la enfermedad periodontal tuvo una prevalencia del 85% (9), y que la ciudad de Lima presenta una prevalencia del 70,91% de enfermedad periodontal (10).

El 75% de los recursos económicos destinados a enfermedades odontológicas se emplea en la atención y tratamiento de la periodontitis (11,12). Se dispone de una amplia gama de agentes antibacterianos para el abordaje terapéutico de la enfermedad periodontal, incluyendo los enjuagues bucales (1). A través de diferentes estudios se ha demostrado que los enjuagues bucales con clorhexidina (CHX) y el cetilpiridinio (CPC) y la mezcla de ambos son utilizados comúnmente como un complemento de la terapia periodontal mecánica, conduciendo a una reducción de la acumulación de placa dental, actuando contra la halitosis, la gingivitis y periodontitis (13). La CHX es probablemente la molécula más utilizada en diversas disciplinas de la salud oral. No obstante, estos medicamentos presentan efectos secundarios, es por ello que se está llevando a cabo investigaciones sobre la utilización de productos naturales (14). Se han empleado varios extractos de plantas y hay evidencia clínica que respalda su potencial y resultados positivos para controlar la progresión de la periodontitis (15).

Se ha propuesto el uso de la planta medicinal de Neem como una alternativa en el tratamiento de trastornos periodontales debido que puede ser efectivo contra los microorganismos anaerobios (16). Dado esto, resulta apropiado desarrollar una indagación investigativa con el objetivo de efectuar una comparación de actividad antibacteriana de extracto

etanólico del *Azadirachta indica* (Neem) y clorhexidina al 0,12% con CPC al 0,05% frente a las cepas de *Porphyromonas gingivalis*.

1.2 Formulación del problema

1.2.1 Problema general

¿Cuál es la diferencia en la acción antibacteriana *in vitro* entre el extracto etanólico del *Azadirachta indica* (Neem) comparado con el gluconato de clorhexidina al 0,12% con cloruro de cetilpiridinio al 0,05% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, Lima-2023?

1.2.2 Problemas específicos

- ✓ ¿Cuál es la acción antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 25% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas?
- ✓ ¿Cuál es la acción antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 75% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.
- ✓ ¿Cuál es la acción antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 100% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas?
- ✓ ¿Cuál es la acción antibacteriana *in vitro* del gluconato de clorhexidina al 0,12% con cloruro de Cetilpiridinio 0,05% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, Lima-2023 dentro las 24, 48 y 72 horas?
- ✓ ¿Cuál es la acción antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 25%, 75% y 100% comparado con el gluconato de clorhexidina al

0,12% con cloruro de cetilpiridinio al 0,05% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, Lima- 2023 dentro las 24, 48 y 72 horas?

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Evaluar la diferencia en la acción antibacteriana *in vitro* entre el extracto etanólico del *Azadirachta indica* (Neem) comparado con el gluconato de clorhexidina al 0,12% con CPC al 0,05% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*. Lima- 2023.

1.3.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar la acción antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 25% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.
- ✓ Determinar la acción antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 75% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.
- ✓ Determinar la acción antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 100% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.
- ✓ Determinar la acción antibacteriana *in vitro* del gluconato de clorhexidina al 0,12% con cloruro de Cetilpiridinio 0,05% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, estudio *in vitro*, Lima- 2023 dentro las 24, 48 y 72 horas.
- ✓ Determinar la acción antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 25%, 75% y 100% comparado con el gluconato de clorhexidina al

0,12% con cloruro de cetilpiridinio al 0,05% frente las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, - estudio in vitro, Lima- 2023 dentro las 24, 48 y 72 horas.

1.4 Justificación de la investigación

1.4.1 Teórica

Teniendo en cuenta que la enfermedad periodontal se trata de una de las patologías más comunes y con consecuencias graves para la salud bucal en general, fue importante identificar y evaluar cualquier tratamiento potencial que pueda ser efectivo y a la vez que no presente efectos secundarios. Así mismo, la importancia de investigar fue determinar la efectividad de estos dos productos en el control de las cepas de la *Porphyromonas gingivalis*. Además, de proporcionar información relevante que contribuye a las teorías científicas actuales y a la ciencia sobre la planta analizada. Además, convierte los conocimientos empíricos en conocimientos científicos por medio del estudio realizado. También posibilita la evaluación de si la planta seleccionada tiene propiedades antibacterianas y puede aplicarse en enfoques terapéuticos alternativos. Este proceso fomenta la búsqueda de nuevos resultados en el ámbito de la medicina tradicional, con el objetivo de lograr beneficios sanadores y abordar infecciones contra la multitud de patógenos que afectan a la salud humana mostrando una amplia eficacia contra microorganismos tanto *Gram +* como *Gram -*, en especial frente a la *Porphyromonas gingivalis*.

1.4.2 Metodológica

La justificación metodológica de este estudio hace empleo de una ficha de observación de datos como instrumento, el cual registró la formación y el control de los halos de inhibición en tres diferentes horarios a partir del procesado de las muestras. Esta ficha fue validada por el método conocido como juicio de expertos que fueron tres profesionales quienes corroboraron la

viabilidad de la herramienta de estudio (instrumento) para tales análisis estadísticos rigurosos que se realizaron, lo que permitió obtener resultados confiables y relevantes.

1.4.3 Práctica

Debido a la necesidad del estudio se pretende buscar cambios, explorar alternativas efectivas, pero sobre todo seguras para el tratamiento de enfermedades periodontales, específicamente contra las cepas de *Porphyromonas gingivalis*. Actualmente, la clorhexidina es ampliamente utilizado en el ámbito odontológico debido a su acción antibacteriana eficaz contra diversas especies bacterianas. No obstante, la utilización continua de CHX podría tener efectos no deseados, como la decoloración dental y alteración del sabor. Por lo tanto, surge la necesidad de investigar y encontrar alternativas terapéuticas que sean igualmente efectivas, pero con un perfil de seguridad y tolerabilidad mejorado. Así mismo, permitirá expandir las opciones terapéuticas disponibles y explorar una nueva alternativa natural para el tratamiento de las infecciones periodontales, promoviendo así el bienestar oral y el nivel de vida en los individuos con tratamiento.

1.5 Delimitaciones de la investigación

1.5.1 Temporal:

- Inició su evolución en julio de 2023 y se extendió hasta diciembre de ese mismo periodo anual.

1.5.2 Espacial:

- Este estudio experimental realizó su ejecución dentro del laboratorio Scientific Quality S.A.C. en Villa el Salvador- Lima por el biólogo microbiólogo parasitólogo Oniel Elías Juárez Vilcapuma.

1.5.3 Población o unidad de análisis:

- Dichas unidades analizadas del estudio fueron las cepas de *Porphyromonas gingivalis*.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Nayak (2023) en Bangalore – India, presentaron como objetivo central con respecto a su investigación en “*Determinar y comparar la actividad antimicrobiana de extractos acuosos y etanólicos de A. paeoniifolius sobre patógenos periodontales*”. Para el presente estudio se utilizaron cepas estándar de *P. gingivalis* (ATCC 33227), *P. intermedia* (JCM 11150) y *F. nucleatum* (ATCC 25886). Además, se empleó un hidrocloreuro de tetraciclina para realizar las pruebas. Se aplicaron las pruebas de concentraciones en niveles mínimos tanto inhibitoria y bactericida. Después en Excel se registraron y se sometieron a un análisis todos los datos utilizando el software SPSS 20.0. Además, llevaron a cabo análisis estadísticos descriptivos y se empleó el test de Mann-Whitney que permite contrastar diferencias entre grupos, con un grado de significancia establecido en $P < 0,05\%$. Los hallazgos obtenidos durante la determinación de la MIC se encontraron que todos los organismos probados fueron sensibles al extracto acuoso de *A. paeoniifolius* con una concentración del 0,4 miligramo por mililitro. Además, se comprobó en el que *P. gingivalis* y *F. nucleatum* registró sensibilidad ante la concentración del extracto etanólico del 0,2 mg/ml. En los valores de MBC los extractos acuosos y etanólicos junto con el clorhidrato de tetraciclina, tuvieron un efecto bactericida contra *F. nucleatum* en todas las concentraciones evaluadas. El extracto acuoso mostró una actividad bacteriostática, mientras que el extracto etanólico y el clorhidrato de tetraciclina exhibieron una actividad bactericida contra Pg con un porcentaje de 0,2 mg/ml. Además, se constató que los dos extractos demostraban actividad bacteriostática contra *P. intermedia*. Como conclusión, el extracto de *A. paeoniifolius* en forma de etanol evidenció una actividad antibacteriana significativa en comparación con el extracto acuoso de la misma planta. (17)

Alarcón (2022) en Arequipa – Perú, enfocó su propósito en “*Determinar si el extracto hidroalcohólico de coca, el gluconato de clorhexidina y la sangre de grado son efectivos para reducir el diámetro del halo inhibitorio alrededor de cepas aprobadas de Porphyromona gingivalis*”. La prueba de sensibilidad frente a discos Kirby-Bauer se utilizó a fin de evaluar dicha susceptibilidad de *P. gingivalis* después a la aplicación de el extracto de coca en solución hidroalcohólica en concentraciones de 25%, 50% y 100%, clorhexidina al 0,12%, sangre de drago al 100% y bicarbonato sódico. Posteriormente, se realizó la aplicación radial del agar en respuesta a los estímulos y filtros mencionados anteriormente. Fue realizado e incluyeron varios estudios estadísticos utilizando estadísticas como centralización, frecuencia y dispersión. Se aplicó el análisis ANOVA unidireccional como método de evaluación. Según los resultados obtenidos, se encontró que *P. gingivalis* manifestó una susceptibilidad elevada (0,12%) tanto a la clorhexidina al igual que al extracto de coca en solución hidroalcohólica, alcanzando una sensibilidad del 100% en este último caso. En resumen, se llegó a la conclusión que se comprobó una diferencia estadística relevante sobre los resultados de los compuestos según el tamaño de la zona inhibida a la Pg. (18)

Saquib et al (2022) en Dammam – Arabia Saudita, centraron el objetivo principal en “*Determinar el efecto antibacteriano sinérgico de los extractos etanólicos de Punica granatum (pericarpio), Commiphora molmol, Azadirachta indica(corteza) en combinación con amoxicilina, metronidazol, tetraciclina y azitromicina en bacterias periodontopáticas: Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia, Treponema denticola y Aggregatibacter actinomycetemcomitans*”. Se utilizó un diseño experimental in vitro en el estudio. En el estudio, se recolectó biofilm de pacientes con periodontitis y se aislaron cepas bacterianas periodontopáticas. Se examinaron el efecto sinérgico del extracto de las plantas combinado con

antibióticos y la capacidad de las bacterias a estos empleando la técnica de agar. Además, se determinaron tanto MIC y la MBC de extractos de plantas contra cada bacteria y calibrar la extensión del área o halo de inhibición (ZOI). Se descubrió que todos los extractos de plantas evaluados inhibieron el crecimiento de bacterias periodontopáticas. El extracto de *C. molmol* mostró el máximo efecto antibacteriano contra *Pg* manifestando que ZOI tiene un valor de 20 con un margen de error de más o menos 0,55 mm, mientras que MIC se sitúa en 0,53 con una variabilidad de 0,24 mg/mL, y MBC muestra un resultado de 5,21 con una fluctuación de 1,81 mg/mL ($p < 0,05$), mientras que el extracto de *P. granatum* no mostró actividad antibacteriana contra *T. forsythia*. Se observó un efecto sinérgico cuando se combinaron los extractos de plantas con antibióticos, destacando la sinergia entre el extracto de *P. granatum* y la amoxicilina contra *A. actinomycetemcomitans* ($24 \pm 1,00$ mm) ($p < 0,05$). En conclusiones, se pudo demostrar que la combinación de extractos de plantas con antibióticos tiene una actividad antibacteriana significativa en todas las bacterias probadas durante la prueba sinérgica. (19)

Stigler (2021) en Lima – Perú, centró como finalidad “*Determinar la efectividad antibacteriana del extracto etanólico del Equisetum giganteum L, sobre la cepa de Porphyromona gingivalis*”. De acuerdo al propósito del objetivo, el diseño del estudio fue experimental, prospectivo, transversal. La muestra consistió en 36 placas Petri que contenían cepas de *Porphyromonas gingivalis*. Divididos en tres grupos: 1 grupo con el extracto de *E. giganteum*, 2 grupos con los controles. Se empleó un enfoque de observacional. Para llevar a cabo el procedimiento, se utilizó una serie de enfoques estadísticos, que abarcaron desde la evaluación de Shapiro-Wilk para la normalidad, test (T de Student), (ANOVA) y una evaluación post hoc HSD Tukey. Todos estos procedimientos analíticos fueron ejecutados empleando programa informático estadístico SPSS, en su edición #25. Los resultados encontrados fueron

que el extracto al 25% no mostró resultados significativos, pero el extracto al 100% demostró un efecto sensible. A las 24 horas, el extracto al 100% presentó halos de inhibición de 13,50 mm, a diferencia de la CHX exhibió halos de 12,50 milímetros. Para los 2 días, la solución completa al 100% continuó exhibiendo rendimientos superiores de 13,80 mm, en comparación con los halos de 12,50 mm de la clorhexidina. Se concluyó, que a las 48 horas se observó el extracto etanólico al 100% mostró una mayor eficacia, con una diferencia de $13,40 \pm 0,30$ de tamaño de halos entre ambas muestras de referencia como el de estudio. (20)

Müller et al. (2022) en Mainz – Alemania, enfocaron el propósito de su estudio en “*Cuantificar la eficacia antimicrobiana de los extractos de plantas crudas contra Porphyromonas gingivalis, un patógeno asociado con la periodontitis*”. Se realizaron pruebas de diluciones microbianas en líquidos (caldos) para determinar la concentración de inhibición mínima (MIC) de los extractos de cada planta frente *P. gingivalis* ATCC® 33277. Para los resultados las CIM para los extractos de *E. globulus*, *A. indica* y *G. glabra* oscilaron en un rango de 64 mg/L a 1024 mg/L. Se llevaron a cabo pruebas de los extractos en bruto utilizando un sistema Agilent Infinity II 1260. En los resultados se observó que los extractos de hoja de *E. globulus*, hoja de *A. indica* y raíz de *G. glabra* presentaron concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) más bajas cuando se utilizaron acetona como solvente en comparación con el etanol acuoso al 70%. Específicamente, los extractos de raíz de *G. glabra* mostraron una CIM promedio 16 veces menor en el extracto de acetona en comparación con el extracto de etanol al 70%. Además, se encontró que el extracto de *R. palmatum* disuelto en etanol acuoso al 50% y la *Antraquinona rhein* tuvieron las CIM más bajas de todos los extractos, con valores de 4 mg/L y 0.125 mg/L. En conclusión, los extractos de *E. globulus*, *A. indica*, *G. glabra*, *R. palmatum* y *A. rhein* demostraron actividad antimicrobiana contra *P. gingivalis* y cabe resaltar la importancia de

llevar a cabo una investigación más exhaustiva de los extractos de raíz de *R. palmatum* para comprender su potencial terapéutico. (15)

Alqahtani (2021) en Riad, - Arabia Saudita, en su estudio tuvieron como finalidad “*Formular colutorios de nim al 2% y regaliz al 2% y comparar la eficacia antimicrobiana de estos colutorios con el colutorio estándar de clorhexidina al 0,2%*”. Este estudio fue de tipo experimental. Se realizó un análisis de una serie de diluciones escalonadas para identificar el mínimo nivel inhibitorio requerido (CIM) de *A. indica* al 2%, *G. glabra* al 2% y clorhexidina al 0,2% contra *Lactobacillus*, *A. naeslundii*, *S. sanguis* y *S. mutans*. Los resultados demostraron que el *S. mutans* era sensible a las tres soluciones bucales con una cantidad de dosificación mínima del 0,2 µg/ml. El *Lactobacillus* fue sensible a la *A. indica* y clorhexidina a una mínima concentración del 1,6 µg/ml, mientras que el *G. glabra* mostró efectividad a partir de una concentración mínima de 3,125 µg/ml. El *S. sanguis* fue sensible a la clorhexidina y *G. glabra* a partir de 25 µg/ml, y al Neem a partir de 50 µg/ml. El *A. naeslundii* fue sensible a la clorhexidina y *A. indica* a partir de 1,6 µg/ml, y al *G. glabra* a partir de 3,125 µg/ml. En conclusión, el efecto de los enjuagues bucales formulados sobre los colonizadores primarios demostró una que la MIC era semejante a la de la clorhexidina al 0,2%. (13)

Neira (2019) en Lima- Perú, expuso como propósito fundamental en su estudio “*Comparar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales Schinus molle L. (molle) y Thymus vulgaris (tomillo) con el gluconato de clorhexidina al 0.12% frente a Porphyromona gingivalis*”. Dicha información se caracterizó por ser práctico, prospectiva, descriptiva de carácter transversal. Utilizando una muestra compuesta que consistía en 40 placas conteniendo bacterias de Pg, con el fin de examinar los efectos relacionados a los aceites esenciales y su de *T. vulgaris* y *S. molle* en concentraciones del 100% y 50%. Se confrontaron en comparación con la

CHX al 0,12%, también se utilizó dimetilsulfóxido en función de control (-). Se recurrió al enfoque de difusión mediante discos, seguido de una incubación a una temperatura de 37° C durante un lapso de 15 días. Con fines de análisis para el informe y las estadísticas, se hizo uso de la plataforma estadística SPSS en su edición 22, y aplicaron pruebas estadísticas Pos Hoc Duncan junto con la aplicación de herramientas en Excel. De acuerdo con los resultados, se observó una media de 7,5 mm para los halos de inhibición en el caso de *S. molle* L., cuando la concentración alcanzó el 50%, y 9,15 mm al 100% de concentración, mientras que para *T. vulgaris* fue de 11,27 mm al 50% de concentración y 12,43 mm al 100% de concentración. Además, se encontró que ambos aceites esenciales demostraron una actividad antibacteriana superior a la del gluconato de clorhexidina al 0,12%. Se identificaron disparidades con relevancia estadística ($p < 0,05$) mediante la aplicación del test de Student. En conclusión, se evidenció acerca del que el aceite de tomillo tuvo un resultado y efectividad más pronunciado para la *P. gingivalis* en comparación con el *molle* en la presentación de aceite esencial (21)

Pardo et al (2019) en Lima – Perú, tuvieron como propósito “*Evaluar la actividad antimicrobiana, mediante el método de difusión en agar con pocillos, de camu camu (CC) contra microorganismos bucales*”. El estudio se realizó de manera experimental, in vitro. Las bacterias de estudio se pusieron en los recipientes de cultivo. En los compartimentos que presentaban un diámetro (6 mm) se dispusieron los extractos etanólicos de los derivados de la fruta en experimento, junto con las respectivas comprobaciones que comprendían la clorhexidina 0,12%, solución de alcohol al 70% y agua purificada incubados a 35°C durante 24-48 horas y 11 días, y posterior a esos días, se estudió la eficacia antibacteriana a través de la aparición de regiones que inhibe el crecimiento de microorganismos. Se utilizó un examen estadístico que comprende tanto el análisis de descripción e inferencia, con $p < 0,05$. Se utilizó el software para investigación de

información estadística Stata v. 14.0 compatible con el sistema operativo Windows para analizar los datos. Se aplicó ANOVA para determinar la variabilidad y realizar la comparación de la actividad de todos los efectos experimentales y de cada control. Se aplicó el método de Scheffe y para verificar la asunción de normalidad, se efectuó con aplicación del test de Shapiro-Wilk con un valor crítico de probabilidad que (p) que excedía o igualaba 0,10011. Adicionalmente, para analizar la uniformidad en las variabilidades, aplicando el test de Bartlett, donde el valor de p es igual o excede 0,89. De acuerdo con los hallazgos del extracto disuelto en etanol de la semilla demostró capacidad de inhibición contra las cuatro cepas investigadas. En relación con cada bacteria, se registró una destacada variación en términos de acción contra microorganismos en comparación con el conjunto en experimentación ($p < 0,0000$), así como entre las distintas agrupaciones de grupos ($p < 0,0010$). Como resultado final, el CC mostró un potencial antimicrobiano prometedor contra las bacterias bucales, mostrando similitud o superioridad a los productos antisépticos orales. (22)

BinShabaib et al. (2022) en Riad - Arabia Saudita, tuvieron como finalidad en su trabajo de investigación “*Comparar la efectividad antibacteriana in vitro de dos extractos de hierbas Saussurea-costus (S. costus) y Melaleuca alternifolia (M. alternifolia) contra Porphyromonas gingivalis, Streptococcus mutans y Enterococcus faecalis*”. Las cepas de *P. gingivalis*, *E. faecalis* y *S. mutans* fueron divididas en tres grupos. En los grupos 1 y 2, se aplicaron extractos acuosos de *S. costus* y *M. alternifolia* a las cepas bacterianas, respectivamente. En el grupo de control, las cepas fueron expuestas a agua destilada. fueron evaluados aplicando la técnica de agar. Se utilizaron métodos estadísticos, como el ANOVA junto con la corrección de Bonferroni, haciendo uso del programa SPSS 20. Los valores de p que fueron $< 0,01$ consideraron como indicativos de significancia estadística. Como resultados, se encontraron que los extractos

acuosos de *M. alternifolia* mostraron una fuerte actividad antimicrobiana contra las cepas de *Pg* se observó un valor de p inferior a 0,001, para *E. faecalis*, se obtuvo un valor de p menor a 0,01, así mismo, para *S. mutans*, se identificó un valor de p <0,001, superando a los extractos de *S. costus*. *M. alternifolia* también mostró una mayor actividad antibacteriana contra *E. faecalis* y *S. mutans*. La concentración inhibitoria mínima (CMI) fue más baja para *M. alternifolia* en comparación con *S. costus* en todas las cepas bacterianas. Sin embargo, la CMI para *P. gingivalis* fue más alta en comparación con las cepas de *E. faecalis* y *S. mutans* tratadas con *M. alternifolia*. Por lo tanto, se concluyó que la eficacia antibacteriana in vitro de *M. alternifolia* es mayor que la de *S. costus*, sin embargo, la CMI es mayor con *S. costus* en comparación con *M. alternifolia*. (23)

2.2.Bases teóricas

- ***Azadirachta indica* (Neem)**

El Neem es una planta originaria del subcontinente indio, es miembro de la familia *Meliaceae*, y se encuentra presente en amplias zonas geográficas como el sudeste asiático, Australia, África oriental y varios países de América Latina, donde se cultiva (24). Es reconocido como una planta medicinal extremadamente versátil, con un amplio rango de aplicaciones terapéuticas. Los compuestos activos presentes en el Neem y sus derivados se utilizan tanto en terapias alternativas como en tratamientos modernos para diversas enfermedades infecciosas, metabólicas y cancerosas. Estudios anteriores han demostrado las múltiples actividades biológicas y farmacológicas del Neem, incluyendo propiedades antiinflamatorias y antibacterianas. (25, 26)

- **Extracto etanólico del Neem**

Se han realizado estudios que demuestran que el extracto etanólico del Neem posee una actividad antibacteriana efectiva tanto contra especies bacterianas Gram-positivas como Gram-negativas. Esta observación sugiere que la planta del Neem podría ser una fuente prometedora para la búsqueda de compuestos con propiedades antibacterianas, además de ser efectivo en virus, hongos y protozoos (27). Se evidenció que la ingestión oral de una cantidad inferior a 2000 mg/kg en relación a la masa corporal proveniente de un concentrado de hoja del Neem en etanol no provocó la muerte de los ratones. Sin embargo, al aplicar un concentrado de corteza de tallo de Neem en etanol a ratas en dosis de 50 a 200 mg/kg se notó que alteraba los marcadores bioquímicos de toxicidad, lo que podría tener efectos consecuentes en la función de los órganos. También existen pruebas que indican que *A. indica* muestra actividad contra cepas que forman biopelículas de algunos de estos patógenos. Por ejemplo, se descubrió que un extracto etanol de hojas de Neem inhibía la adherencia del biofilm de *S. aureus* y *S. aureus* meticilinorresistente (MRSA) a concentraciones del 62,5 y 125 µg/ml. (20)

- **Periodontitis**

La alteración de las estructuras de soporte dental se caracteriza por ser una afección inflamatoria persistente ocasionando la deterioración de los tejidos que mantienen en su lugar a los dientes (28), eventualmente llevando a la extracción dental pero que principalmente presenta bolsas periodontales y recesión gingival como características distintivas. Este trastorno inmunoinflamatorio surge a partir de la formación de un biofilm complejo subgingival y de la disbiosis del microbiota periodontal (29). Desde que se describió por primera vez la enfermedad periodontal, se han implementado varios sistemas de clasificación para organizarlas según su etiología, patogenia, localización y progreso. Sin embargo, siempre surgen particularidades o

complicaciones que dificultan realizar un diagnóstico adecuado y personalizado para cada paciente. Según la clasificación de enfermedades y alteraciones periodontales y periimplantarias del 2017, e establece que el diagnóstico periodontal debe fundamentarse en una anamnesis médica y dental exhaustiva, acompañada de exámenes intraorales y extraorales, así como de una serie de radiografías periapicales verticales. Este enfoque integral es esencial para identificar la enfermedad periodontal y distinguir las causas de la reabsorción ósea que son independientes de la periodontitis. El diagnóstico diferencial también incluye la consideración de signos y síntomas específicos que son indicativos de enfermedades periodontales necrosantes, así como la evaluación de la presencia o ausencia de comorbilidades sistémicas que pueden modificar la respuesta inmunológica del paciente. (30)

La reciente definición de la periodontitis también fue objeto de discusión. Se consensuó que la periodontitis se caracteriza fundamentalmente por la pérdida de soporte de los tejidos periodontales, consecuencia de un proceso inflamatorio: habitualmente se utiliza como umbral una pérdida de inserción clínica interproximal de ≥ 2 mm o ≥ 3 mm en dos o más dientes no adyacentes o si hay un pérdida de inserción clínica de ≥ 3 mm y una profundidad de bolsa (PD) ≥ 4 mm en sentido vestibular o lingual en al menos dos dientes, disminución de las crestas óseas evaluada por medio de radiografías y sangrado gingival. (31)

- **Fisiopatología**

Las bacterias comensales de la cavidad oral desempeñan un papel crucial en la iniciación y progresión de la enfermedad mediante un proceso de disbiosis, es decir, un desequilibrio microbiano. La patología evoluciona de manera cíclica, alternando entre fases de actividad y remisión, hasta que se implementan intervenciones terapéuticas. Si estas medidas no se adoptan, el diente y las estructuras adyacentes pueden sufrir destrucción debido al proceso patológico, lo

que podría culminar en la pérdida dental. A medida que la enfermedad periodontal avanza de gingivitis a periodontitis, se observa una colonización incrementada de organismos anaeróbicos en las bolsas periodontales más profundas, incluyendo especies como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis*, lo que provoca una respuesta inflamatoria en el huésped. Esta reacción inmunológica se caracteriza por la producción y liberación de proteína C reactiva (PCR), un importante biomarcador de inflamación, junto con diversos compuestos liberados por neutrófilos y macrófagos, tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), las metaloproteinasas de matriz (MMP), y las interleucinas (IL-1 e IL-8). (32)

- **Nueva clasificación de la periodontitis**

La reciente clasificación ha distinguido tres formas distintas de periodontitis, fundamentadas en su fisiopatología. Además, el proceso de estadificación se determina en función de la gravedad de la enfermedad y la magnitud del tratamiento necesario, asignando una etapa específica de acuerdo con factores como la pérdida de inserción clínica, la pérdida ósea observable en radiografías y la pérdida dental. (33)

- Periodontitis necrosante.
- Periodontitis como manifestación directa de enfermedades sistémicas.
- Periodontitis, a cuál debe ser caracterizada adicionalmente mediante un enfoque de clasificación que considere tanto los estadios como los grados de la enfermedad.

- **Estadio y extensión de la periodontitis**

El estadio y extensión hacen referencia tanto a la severidad de la enfermedad como a la complejidad del tratamiento. La severidad se evalúa a partir de la pérdida de inserción, la destrucción ósea observable en radiografías y la ausencia de piezas dentales relacionada con

estos factores; Por otro lado, la complejidad del tratamiento contempla la profundidad de las bolsas periodontales y el tipo de defectos óseos presentes, ya sean horizontales o verticales, compromiso de furca, abanicamiento dental, trauma oclusal, colapso de mordida, entre otros. La extensión de la periodontitis se establece mediante el análisis de la proporción de piezas dentales afectadas con defectos óseos y el nivel de inserción clínica en comparación con áreas sanas. Si más del 30% de los dientes presentan estos criterios, se clasifica como periodontitis generalizada; en caso de que estas características se observen en menos del 30%, se considera localizada. (30)

Tabla A. Clasificación de periodontitis por estadios, según la gravedad del diagnóstico inicial y la complejidad, sobre la base de factores locales. (34)

Etapa de la periodontitis		Estadio I	Estadio II	Estadio III	Estadio IV
Gravedad	CAL (perdida de inserción clínica) interdental con la mayor pérdida	1-2mm	3-4 mm	≥5 mm	≥5 mm
	Perdida ósea radiográfica	Tercio coronal (< 15 %)	Tercio coronal (15-33 %)	Extensión a tercio medio	Extensión a tercio apical
	Perdidas dentarias	Sin pérdidas dentarias por razones periodontales	dentarias por razones periodontales	Pérdida de dientes por periodontitis de ≤4 dientes	Pérdida de dientes por periodontitis de ≥5 dientes
		Profundidad de sondaje máxima ≤ 4 mm	Profundidad máxima de sondeo ≤5 mm.	Profundidad de sondaje de 6-7 mm	Profundidad de sondaje ≥ 8 mm
Complejidad Local		Pérdida ósea principalmente horizontal	Pérdida ósea principalmente horizontal	Además de complejidad Estadio II: Pérdida ósea vertical ≥ 3 mm	Además de la complejidad del estadio III: Disfunción masticatoria, Trauma oclusal

		secundario; movilidad dentaria ≥ 2
Afectación de furca grado II o III	Colapso de mordida, migraciones, abanicamiento dentario	
21-28 dientes residuales	< 20 dientes residuales	
Defecto de cresta moderado	Defecto de cresta grave	

Extensión y distribución <30% de los dientes afectados (localizado), $\geq 30\%$ de los dientes afectados (generalizado) o patrón molar/incisivo.

Fuente: Basado en lo propuesto por Tonetti y cols. (2018).

- **Grado de la periodontitis**

El avance de la periodontitis puede variar significativamente entre pacientes, y la respuesta al tratamiento puede resultar menos predecible o estar influenciada por condiciones sistémicas subyacentes. El grado proporciona información sobre las características biológicas de la enfermedad, dado su origen multifactorial, lo cual influye en la respuesta del huésped, considerando factores genéticos, ambientales y conductuales. Se toman en cuenta variables como el porcentaje de pérdida ósea, la edad del paciente y factores de riesgo, tales como el tabaquismo y la diabetes, entre otros. (30)

Tabla B. Clasificación de la periodontitis por grados que se fundamenta en factores modificados, así como en pruebas indirectas y directas. (34)

Grado de periodontitis		Grado A: velocidad lenta de progresión	Grado B: Tasa moderada de progresión	Grado C: tasa rápida de progresión
Evidencia directa	Radiografías o evaluación periodontal en los 5 años anteriores	No evidencia de pérdida De hueso/ inserción	Pérdida < 2 mm	Pérdida ≥ 2 mm
	Pérdida ósea vs. edad	< 0,25	0,25-1,0	> 1,0
Evidencia indirecta	Fenotipo	Grandes depósitos de biofilm con niveles bajos de destrucción	Destrucción proporcional a los depósitos de biofilm	El grado de destrucción supera las expectativas teniendo en cuenta los depósitos de biofilm; patrones clínicos específicos que sugieren periodos de progresión rápida y/o patología de aparición temprana.
Factores modificadores	Tabaquismo	No fumador	< 10 cigarros/día	≥ 10 cigarros/ día
	Diabetes	Normal con/sin diabetes	HbA1c < 7 con diabetes	HbA1c > 7 con diabetes

Fuente: Basado en lo propuesto por Tonetti y cols. (2018).

- **Tratamiento de periodontitis: Estadios I, II, III**

Los pacientes, tras ser diagnosticados, deben seguir un enfoque terapéutico gradual que se ajusta a la etapa de la enfermedad, integrando diferentes intervenciones en cada fase del tratamiento. Un prerrequisito fundamental y esencial comunicar al paciente el diagnóstico,

causas, factores de riesgo y opciones terapéuticas, así como los riesgos y beneficios, incluyendo la opción de no tratar la enfermedad. Posteriormente, se debe establecer un acuerdo sobre un plan de atención personalizado, que puede ajustarse según preferencias del paciente, hallazgos clínicos y cambios en la salud. (35, 36)

1) La fase inicial de la terapia busca promover un cambio conductual, incentivando al paciente a eliminar el biofilm dental supragingival y controlar los factores de riesgo, a través de diversas intervenciones específicas:

- Control del biofilm dental supragingival
- Intervenciones destinadas a optimizar la eficacia de la higiene bucal, que incluyen la motivación del paciente y la provisión de instrucciones detalladas sobre técnicas adecuadas de cuidado oral.
- Terapias complementarias para la inflamación gingival
- La eliminación mecánica profesional de la placa (PMPR) es un procedimiento realizado por profesionales para eliminar la placa supragingival y el sarro, y tratar los factores que facilitan la retención de placa y dificultan la higiene bucal.
- El control de los factores de riesgo implica intervenciones para modificar conductas de salud, con el fin de reducir o eliminar los factores asociados con la aparición y progresión de la periodontitis. Esto incluye dejar de fumar, mejorar el control de la diabetes y, posiblemente, incorporar ejercicio, asesoramiento dietético y pérdida de peso. (35,36)

La fase inicial de la terapia periodontal debe aplicarse a todos los pacientes, independientemente del estadio de la enfermedad. Es crucial reevaluar regularmente para mantener la motivación y el cumplimiento, o explorar alternativas. Además, es importante

desarrollar y ajustar las habilidades en la eliminación de biopelículas dentales según sea necesario. (35,36)

2) La segunda fase de la terapia, está relacionada con la causa, se enfoca en controlar, reducir o eliminar el biofilm subgingival y el sarro mediante la instrumentación subgingival, complementada con las siguientes intervenciones:

- Se pueden considerar antisépticos coadyuvantes, específicamente enjuagues bucales con clorhexidina durante un período de tiempo limitado como complemento.
- Se puede considerar la administración local de clorhexidina de liberación sostenida como complemento.
- Uso complementario de agentes antisépticos en aquellos sujetos que no son capaces de eliminar eficazmente las biopelículas supragingivales mediante el uso exclusivo de procedimientos mecánicos.
- Se pueden considerar antibióticos específicos de liberación sostenida administrados localmente como complemento a la instrumentación subgingival.
- Administración local subgingival de antimicrobianos: el uso de antibióticos (doxiciclina y clorhidrato de minociclina) de liberación sostenida aplicados localmente puede considerarse como complemento a la instrumentación subgingival).
- El uso de antimicrobianos sistémicos como tratamiento complementario puede considerarse en pacientes seleccionados para casos específicos (por ejemplo, periodontitis generalizada en estadio III en adultos jóvenes). (35,36)

Esta segunda fase de la terapia debe aplicarse a todos los pacientes con periodontitis, independientemente del estadio, pero únicamente en los dientes que presenten pérdida de soporte periodontal y/o formación de bolsas periodontales. (35,36)

La respuesta al segundo paso de la terapia se debe evaluar tras la cicatrización de los tejidos mediante una reevaluación periodontal. Si no se cumplen los objetivos (ausencia de bolsas periodontales >4 mm con sangrado al sondaje o ausencia de bolsas periodontales profundas [≥ 6 mm]), se debe considerar el tercer paso de la terapia. En caso de que el tratamiento haya tenido éxito, los pacientes deben ingresar a un programa de mantenimiento periodontal. (35,36)

3) La tercera fase de la terapia aborda áreas que no respondieron al segundo paso, con bolsas de ≥ 4 mm con sangrado o bolsas profundas de ≥ 6 mm. Su objetivo es mejorar el acceso a la instrumentación subgingival y tratar lesiones complicadas, como las intraóseas y de furcación, mediante intervenciones específicas:

- Instrumentación subgingival repetida con o sin terapias complementarias
- Cirugía periodontal con colgajo de acceso (en pacientes con periodontitis en estadio III, si después de los primeros pasos del tratamiento persisten bolsas profundas (≥ 6 mm), se recomienda realizar una cirugía de colgajo de acceso. Para bolsas moderadamente profundas (4-5 mm), se sugiere repetir la instrumentación subgingival.
- Cirugía periodontal resectiva (en pacientes con periodontitis estadio III y bolsas residuales profundas (≥ 6 mm), se recomienda la cirugía periodontal resectiva, aunque debe tenerse en cuenta el riesgo de aumentar la recesión gingival.

- Cirugía periodontal regenerativa (se recomienda tratar los dientes con bolsas profundas residuales y defectos intraóseos de 3 mm o más mediante cirugía regenerativa periodontal.)

Las intervenciones quirúrgicas deben contar con el consentimiento explícito del paciente y ser precedidas por una evaluación exhaustiva de riesgos y contraindicaciones médicas. (35,36)

La respuesta al tercer paso de la terapia debe reevaluarse con una revisión periodontal. Idealmente, se deben cumplir los objetivos terapéuticos y los pacientes deben ingresar a un programa de mantenimiento. No obstante, en periodontitis grave estadio III, no siempre se logran los objetivos en todos los dientes. (35,36)

El tratamiento de la periodontitis en estadio III debe seguir un enfoque escalonado. Primero, se asegura que el paciente adopte una buena higiene bucal y controle los factores de riesgo. Luego, en la segunda fase, se elimina profesionalmente el biofilm y sarro supra y subgingival, con o sin terapias complementarias. En pacientes con periodontitis, la eliminación total del biofilm y sarro subgingival en dientes con sondajes profundos o superficies complejas puede ser difícil, lo que podría requerir tratamientos adicionales si no se logran los objetivos terapéuticos. (35,36)

- 4) El cuidado periodontal de mantenimiento busca mantener la estabilidad periodontal en pacientes tratados por periodontitis mediante intervenciones preventivas y terapéuticas de las fases uno y dos, ajustadas al estado de la dentición. Debe realizarse a intervalos regulares, y se puede requerir un nuevo tratamiento si se detecta recurrencia de la enfermedad. Además, incluye el seguimiento de la higiene bucal y la adopción de estilos de vida saludables (35,36).

- Para el control de la inflamación gingival en pacientes con periodontitis en cuidado de mantenimiento, se sugiere el uso complementario de dentífricos antisépticos que contengan clorhexidina, triclosán con copolímero, o fluoruro de estaño-hexametafosfato de sodio (37).
- Se recomienda el uso de enjuagues bucales con clorhexidina, aceites esenciales y cloruro de cetilpiridinio como complemento para controlar la inflamación gingival en pacientes con periodontitis con cuidado periodontal de apoyo (37).

- **Tratamiento de periodontitis: Estadio IV**

La periodontitis en estadio IV, según la nueva clasificación, se diferencia de la periodontitis en estadio III, la cual presenta inflamación periodontal y pérdida de inserción que afecta al tercio medio de la raíz o más. El estadio IV se caracteriza por requerir una rehabilitación compleja debido a la presencia de uno o más factores específicos. (37):

- Traumatismo oclusal secundario o hipermovilidad dental causado por una reducción en la inserción periodontal atribuible a periodontitis.
- La migración dental, el desplazamiento y la aparición de diastemas están relacionados con una severa pérdida de inserción en los dientes afectados.
- Pérdida de cinco o más dientes debido a periodontitis.
- Pérdida de soporte en los dientes posteriores y/o expansión de los dientes anteriores como resultado de periodontitis.
- Disminución de la función masticatoria (disfunción masticatoria) derivada de una combinación de los factores previamente mencionados.

El tratamiento de la periodontitis en estadio IV debe contemplar la obtención de resultados exitosos tras la implementación de las intervenciones de las fases 1, 2 y 3 de las directrices clínicas de la EFP para los estadios I-III, pero incluye intervenciones adicionales específicas para este estadio, ya que alcanzar los resultados terapéuticos esperados es de suma relevancia en los casos de periodontitis en estadio IV, de modo que, esto es esencial para poder proceder con las intervenciones restauradoras u ortodóncicas previstas. Además, justifica la considerable inversión de recursos necesarios para continuar con el tratamiento. Es crucial planificar y a menudo implementar simultáneamente la rehabilitación de la función, la restauración del confort masticatorio, el tratamiento del trauma oclusal secundario y, si es necesario, la restauración de la dimensión vertical de la oclusión. Hay diversas herramientas terapéuticas disponibles para la rehabilitación en distintos tipos de casos (37):

- Control temporal del trauma oclusal secundario, como la ferulización extracoronal.
- Uso de ferulización protésica con prótesis dentales fijas.
- Intervenciones de ortodoncia.
- Prótesis parciales fijas o removibles soportadas o retenidas por dientes.
- Prótesis parciales fijas o removibles soportadas o retenidas por implantes.
- Prótesis de arcada cruzada soportadas o retenidas por dientes, prótesis completas convencionales, o prótesis completas soportadas o retenidas por implantes.

Al finalizar el tratamiento periodontal activo, es fundamental evaluar si un diente puede funcionar como pilar para una prótesis fija o removible. Aunque los dientes con un periodonto reducido pero estable pueden ser adecuados como pilares, el soporte periodontal residual mínimo

necesario (10%-20%) es discutido y depende del diseño de la prótesis, el número de pilares y la estabilidad de la restauración (37).

Para tratar la periodontitis en estadio IV, al igual que en los estadios I a III, es fundamental informar al paciente sobre el diagnóstico, la etiología, los factores de riesgo, las opciones de tratamiento y sus riesgos y beneficios, incluyendo la opción de no recibir tratamiento. Tras esta explicación, se debe acordar un plan personalizado, que puede ajustarse según los resultados iniciales y la evolución del paciente. En el estadio IV, no se recomienda la opción de no tratar la enfermedad debido al alto riesgo de pérdida dental que conlleva (37).

- ***Porphyromonas gingivalis***

Se trata de un microorganismo bacteriano en forma de cocobacilar, Gram (-) estrictamente anaerobia. Pertenece al filo *Bacteroidetes* y tiene una longitud de 1 a 3,5 μm y un ancho de 0,5 a 0,8 μm . Su pared celular contiene lipopolisacáridos en la membrana externa. La bacteria presenta una cápsula, numerosas fimbrias y vesículas en su superficie que contienen enzimas relacionadas con su virulencia, así como enzimas proteolíticas. No posee flagelos ni forma esporas. Si bien la placa subgingival humana alberga más de 500 especies bacterianas, se ha demostrado que la *Porphyromonas gingivalis*, es el principal agente etiológico que contribuye a la periodontitis. Este patógeno si bien se encuentra comúnmente en el microbiota oral, pero en cantidades controladas o raramente está frecuente en un tejido periodontal en buen estado. (38).

Este organismo microscópico se une y establece colonias sobre la superficie dental y la encía, creando capas compuestas por microorganismos llamadas biopelículas presente alrededor del diente y dentro las bolsas periodontales. Estas biopelículas constituyen complejas formaciones microbianas cumpliendo un papel en la destrucción gradual del aparato de sostén

dental a medida que persiste la inflamación o infección. (39). Por consiguiente, es de suma importancia controlar la presencia de *P. gingivalis* en la boca como parte fundamental para prevenir y tratar la afección del tejido de soporte. Por esta razón y situación se debe mantener la higiene bucal de manera adecuada, que incluye cepillarse los dientes de manera regular y adecuada, utilizar hilo dental y acudir periódicamente al dentista para someterse a una profilaxis dental y una evaluación para el control de la salud periodontal. (40).

- **Simbiosis y disbiosis de *Porphyromonas gingivalis***

La boca alberga en su interior al segundo grupo microbiano más grande del cuerpo, con más de 700 especies diversas identificadas que colonizan las superficies duras de los órganos dentales y los tejidos blandos de la mucosa oral. El complicado equilibrio que existe entre estas especies bacterianas influye en el estado saludable (eubiosis) o en un estado asociado a enfermedad (disbiosis). En diversos estudios se ha observado que la composición cualitativa del microbiota oral en individuos sanos se mantiene en un equilibrio constante y, por lo general, el ambiente no se considera patógeno. Por el contrario, la simbiosis de las bacterias comensales induce una respuesta inmune proporcionada a la biomasa escasa, aunque en algunos casos este desequilibrio puede volverse dañino y contribuir a la inflamación, hasta la aparición de enfermedades orales, como la periodontitis (42,43).

Algunas bacterias patógenas, como las que forman parte del complejo rojo (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), evaden el sistema inmune y se ocasiona una respuesta inmune desregulada a causa de los factores de virulencia asociados a daño, lo que ocasiona la disbiosis franca patogénica e hiperinflamación por la alteración de procesos como estrés oxidativo, secreción de citocinas proinflamatorias, prostaglandinas y metaloproteinasas, eso provoca fallo

en la resolución de la inflamación y la pérdida de la homeóstasis, lo que conlleva un daño al tejido conectivo, el hueso (44,45). Desafortunadamente, algunas de esas especies bacterianas Gram negativas, anaeróbicas subgingivales, son resistentes a algunos antibióticos como la clindamicina (46). Por ello, la eliminación mecánica habitual de todos los depósitos bacterianos de las superficies bucales no descamativas es un requisito fundamental para prevenir enfermedades (47).

La transición desde un estado de salud periodontal hacia las fases avanzadas de la periodontitis está vinculada con un cambio microbiano desde las principales bacterias simbióticas conocidas como "simbiontes" a la disbiosis, con altas proporciones de bacterias patógenas, los llamados "patobiontes". Este proceso de cambio está modulado por diversos factores estresantes, entre los cuales destacan la respuesta inmunoinflamatoria del huésped, la susceptibilidad individual y factores de riesgo conductuales como el tabaquismo (48).

Entre las bacterias odontopatógenas implicadas en la periodontitis, *Porphyromonas gingivalis* destaca como uno de los principales responsables en la patogénesis de la enfermedad, transformando una comunidad microbiana benigna en un estado de disbiosis. (46). Su participación en la disbiosis no se basa únicamente en su abundancia, sino también en su capacidad para alterar el equilibrio microbiano y modificar la respuesta inmune del huésped. Su presencia puede desencadenar un cambio en la comunidad microbiana oral, favoreciendo la proliferación de otras bacterias patógenas y promoviendo un ambiente inflamatorio causando destrucción de los tejidos periodontales. (49,50)

Así mismo, la cantidad de *Porphyromonas gingivalis* en una simbiosis depende del contexto, el ambiente y el tipo de simbiosis que se esté considerando. En situaciones de equilibrio saludable o simbiosis, la cantidad de *Porphyromonas* suele ser menor y controlada

por otras bacterias del microbioma, manteniendo una relación que no causa daño al hospedador. Si nos referimos a una simbiosis en el cuerpo humano, como en la cavidad oral, el equilibrio de bacterias es dinámico y depende de muchos factores, como la dieta, la higiene y el estado de salud del hospedador (48).

Sin embargo, cuando las condiciones cambian, como en casos de mala higiene oral, tabaquismo o enfermedades sistémicas, puede producirse una disbiosis (un desequilibrio bacteriano), lo que permite que *P. gingivalis* se multiplique y aumente su número. En la enfermedad periodontal, esta bacteria puede proliferar en las bolsas periodontales alrededor de los dientes. La cantidad de *P. gingivalis* puede variar ampliamente, pero estudios han reportado que, en bocas con enfermedad periodontal en estadios graves, el porcentaje de esta bacteria puede llegar a representar hasta el 10-15% de las bacterias presentes en las bolsas periodontales. En condiciones saludables, este porcentaje es significativamente menor, generalmente por debajo del 1% (49). En otros estudios se detectó en el 85,75 % de la placa subgingival de pacientes con periodontitis crónica. La prevalencia de *P. gingivalis* está relacionada con la gravedad de la enfermedad periodontal (51). En otro estudio, se reporta que *P. gingivalis* puede ser identificada mediante un ensayo de PCR altamente sensible y específico en el 25% de los individuos con salud periodontal o periodontitis leve, caracterizada por profundidades de sondaje de bolsas de 5 mm o menos. En contraste, la bacteria se detecta en el 79% de los sujetos con bolsas periodontales profundas. Es probable que las interacciones con otras especies microbianas en las biopelículas subgingivales, junto con los productos inflamatorios liberados por el huésped, jueguen un papel determinante en la capacidad de *P. gingivalis* para colonizar con éxito el entorno subgingival. (52).

- **Gluconato de clorhexidina al 0.12%**

Considerado y destacado por ser un antiséptico que presenta una mejor y máxima efectividad entre los demás y se le considera el *gold estándar* en su categoría. A un pH mayor que 3,5, este compuesto exhibe propiedades de base fuerte dicatiónica bicargado positivamente localizadas por ambos extremos constituido por un enlace hexametilénico. Estas características le otorgan una alta capacidad de interacción con los aniones presentes en el medio. La forma más estable de la clorhexidina se encuentra en su forma de sal, siendo la sal de digluconato la más comúnmente utilizada debido a su alta solubilidad en agua. (53)

Efectividad antibacteriana

Impide que una capa adquirida se forme de nuevo al reducir la unión de glucoproteínas situados dentro del fluido salival lo largo de la parte superficial del diente. Esto se consigue al inhibir unidades de ácidos sin enlace, al igual que los compuestos sulfato, grupos carboxilo y componentes de fosfato (53). Además, al prevenir la adhesión bacteriana al biofilm previamente establecida al interferir con los elementos perjudiciales presentes en la capa exterior de las células bacterianas, como moléculas teicoicos ácidos, también desorganiza las estructuras del biofilm dental existente la clorhexidina (54). Esto se logra mediante la eliminación del calcio de los grupos sulfato presentes en la placa, lo que resulta en una desorganización de su estructura y evita tal adherencia entre las bacterias y el biofilm (55, 56). En un estudio se demostró que el enjuague bucal con clorhexidina resultó una ganancia significativa del nivel de inserción clínica, reducción de la profundidad de la bolsa de sondaje, el índice de placa, el índice gingival y acción microbiana cuando se utilizó como complemento del raspado y alisado radicular en el tratamiento como complemento del raspado y alisado radicular en el tratamiento de la periodontitis grado B en estadio II y estadio III (57).

Sustantividad

La CHX se libera de manera gradual una vez adsorbida y se activa en un periodo de 8-12 horas. Incluso después de las 24 horas, es posible identificar niveles bajos, lo que impide formar colonias de microbios en ese periodo de tiempo. Su elevada capacidad de permanencia se debe a su rápida adsorción sobre las superficies bacterianas, facilitada por el nivel de acidez neutro y con una ligera alcalinidad (53). Esta sustancia permite adherirse a los elementos bacterianos presentes en el biofilm oral, al esmalte y todas las estructuras que conforman al diente, liberándose gradualmente consiguiendo consecuencias desfavorables en el interior de las bacterias exactamente en el citoplasma, lo cual obstaculiza la viabilidad de las bacterias orales (58). Mediante el enlace de grupos radicales carboxilo que se encuentran en la capa más interna o de mucina que se halla alrededor de la mucosa. Después, como resultado de la secreción de partículas iónicas de calcio desde el sistema glandular salival, se produce una dinámica lenta gradual para liberar partículas de la sustancia mencionada anteriormente. (59)

Efectos secundarios

El efecto adverso más prevalente de la clorhexidina es la aparición de pigmentación en los dientes, material para obturación, al igual que en tejidos mucosos, especialmente al dorso lingual. Estos efectos pueden darse a través de la interrelación de sustancias iónicas de clorhexidina presentes en el interior oral, conjuntamente con compuestos taninos que se encuentran por toda una amplia selección de productos comestibles, aunque la concentración y dosis del compuesto también pueden tener un papel en este fenómeno (53,60). A pesar de ello, parece que la coloración se limita a la superficie y puede eliminarse fácilmente mediante una limpieza profesional. Otro efecto frecuentemente mencionado es la alteración del sentido del gusto, la cual puede minimizarse prescindiendo al usar agua tras utilizar el antiséptico a base de

clorhexidina. Es importante destacar que esta alteración del gusto desaparece por completo al concluir el tratamiento (53,57).

- **Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% (CPC)**

Antiséptico que presenta una acción abarcadora y amplia contra microorganismos *gram* (+), *gram* (-), patógenos víricos y fúngicos; más eficaz contra gram positiva. Se clasifica como un amonio cuaternario monocatiónico, caracterizado por tener nitrógeno cuaternario conectado a una o más cadenas laterales hidrofóbicas (61). La molécula del CPC incluye amonio cuaternario (quacs) que se encuentra dentro de la categoría de los tensoactivos, tiene una carga positiva monovalente, posee la capacidad de mezclarse con alcohol, además de soluciones con base acuosa; puede funcionar como un agente desinfectante y de limpieza, no exhibe propiedades oxidantes ni corrosivas y mantiene un nivel de pH neutral. Demuestra una efectiva permeabilidad en el pH de la cavidad oral y muestra una permanencia en la cavidad bucal de aproximadamente 3 a 5 horas. Adicionalmente, muestra una acción contra el biofilm y en respuestas a sustancias tóxicas que promueven la inflamación secretada por los microorganismos bacterianos. (53).

Efectividad antibacteriana

Su estructura química le confiere propiedades surfactantes catiónicas, gracias a las regiones polar y no polar presentes en la molécula, lo que resulta en una carga positiva. Estas propiedades permiten que las moléculas se adhieran a la capa externa de la membrana celular que está electrónicamente cargada en forma negativa. La zona molecular apolar, con propiedades análogas con los lípidos anfipáticos que componen la membrana, puede introducir la membrana celular bacteriana, perturbando su estructura y generando una inestabilidad en la regulación osmótica (61). Esto conduce el daño del contenido citoplasmático y, en última instancia, a la

muerte celular de las bacterias afectadas. Además, exhibe actividad antigingival al neutralizar las toxinas bacterianas proinflamatorias. Al interactuar con los liposacáridos presentes en estas toxinas, altera su estructura y neutraliza su efecto perjudicial. Así mismo, se ha comprobado la actividad antimicrobiana del CPC al 0,05 % contra diversos microorganismos aerobios y anaerobios, como *A. actinomycescomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* (62). De igual manera, se ratifica la efectividad del enjuague bucal con cloruro de cetilpiridinio (CPC) al 0,05 % sin alcohol en su acción antiplaca y antigingivitis como complemento del cepillado dental. Cuando se emplea dos veces al día, su eficacia ha demostrado ser equiparable a la de la clorhexidina (CHX), especialmente en individuos con gingivitis leve. Además, el CPC presenta notablemente menos efectos adversos, lo que lo posiciona como una alternativa viable a la CHX, un compuesto ampliamente utilizado en el ámbito odontológico. (63).

2.3. Formulación de hipótesis

2.3.1. Hipótesis general

- **Hi:** El extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) tiene mayor acción antibacteriana *in vitro* comparado con el gluconato de Clorhexidina al 0,12% con cloruro de cetilpiridinio 0,05% sobre las cepas de *Porphyromonas Gingivalis*, Lima. 2023
- **Ho:** El extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) no tiene mayor acción antibacteriana *in vitro* comparado con el gluconato de Clorhexidina al 0,12% con cloruro de cetilpiridinio 0,05% sobre las cepas de *Porphyromonas Gingivalis*, Lima. 2023

2.3.2. Hipótesis específicas

- **Hi¹:** Existe acción antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 25% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.
- **Ho:** No existe acción antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 25% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.
- **Hi²:** Existe acción antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 75% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.

- **Ho:** No existe acción antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 75% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.
- **Hi³:** Existe acción antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 100% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.
- **Ho:** No existe acción antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 100% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.
- **Hi⁴:** Existe acción antibacteriana *in vitro* del gluconato de clorhexidina al 0,12% con cloruro de cetilpiridinio 0,05% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.
- **Ho:** No existe acción antibacteriana *in vitro* del gluconato de clorhexidina al 0,12% con cloruro de cetilpiridinio 0,05% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.
- **Hi⁵:** Existe acción antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 25%, 75% y 100% comparado con el gluconato de clorhexidina al 0,12% con cloruro de cetilpiridinio 0,05% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.
- **Ho:** No existe acción antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 25%, 75% y 100% comparado con el gluconato de clorhexidina al 0,12% con cloruro de cetilpiridinio 0,05% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1. Método de la investigación

La actual investigación fue desarrollada utilizando un enfoque de tipo deductivo de hipótesis (hipotético/ deductivo), por el hecho que se planteó hipótesis y que, mediante el proceso de recolectar y analizar la información de los datos, se comprobó o refutó estas mismas, que finalmente se llegó a conclusiones basada en los resultados obtenidos del análisis de datos (64).

3.2. Enfoque de la investigación

Presentó un abordaje basado de índole cuantitativa, la cual destacó por dar prioridad a la lógica basada en la observación y el razonamiento deductivo, mediante la implementación de rigurosos procedimientos, métodos experimentales y la aplicación de técnicas para recopilar datos estadísticos (65).

3.3. Tipo de investigación

Fue explicada con una orientación aplicada porque propuso buscar y adquirir un conocimiento novedoso con miras a hallar respuestas aplicables a situaciones problemáticas prácticas, pero, sobre todo, entregar soluciones que causen impacto social.

3.4. Diseño de investigación

Investigación experimental- *in vitro*: Debido a que permitió recolectar datos y comprobó hipótesis de manera precisa, por otro lado, permitió al investigador manipular o

controlar, observar y medir una o más variables independientes y observó la variable dependiente, buscando una posible variación que coincida con la manipulación de las variables independientes (66).

3.4.1. Corte:

- Longitudinal: Se observó el análisis durante un período de tiempo y para recopilar los datos fueron tomados en diferentes horas e identificar la evolución de los resultados (67).
- Prospectivo: Se le denominó así puesto que es una investigación en el tiempo que se planificó y empezó en el momento actual, pero los datos se examinaron después de un periodo específico, en el futuro (67), y que las hipótesis tienen como objetivo interpretar los posibles futuros de una línea de investigación específica.

3.4.2. Nivel o alcance:

- Explicativo: Se trató de explicar un fenómeno mediante el experimento planteando el uso de dos variables independientes; extracto etanólico del *Azadirachta indica* y Gluconato de clorhexidina más cloruro de cetilpiridinio, otra dependiente la Acción antibacteriana y una interviniente el tiempo, donde se produce un cambio debido a la intervención durante el experimento.

3.5. Población, muestra y muestreo

3.5.1. Población

Placas Petri con agar Schaedler enriquecido con cepas de *Porphyromonas gingivalis*.

3.5.2. Muestra

La muestra estuvo conformada por placas de agar Schaedler enriquecido con cepas de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) según la siguiente fórmula:

$$n = \frac{Z^2 \cdot \sigma^2}{E^2}$$

En el que:

n : tamaño de muestra.

Z : factor de confiabilidad. Es 1,96 para un 95% de nivel de confianza.

E^2 : representa el rango de error aceptable que el investigador ha establecido ($E=5$).

σ : 9.997, obtenido analizando resultados de investigaciones anteriores.

$$n = \frac{(1.96)^2 \cdot 9.997^2}{E^2}$$

$$n=15$$

Se tomó como final $n=15$ de muestra por sustancia de prueba. En total, se emplearon 75 placas de agar Schaedler enriquecido.

3.5.3. Muestreo

Se realizó un muestreo aleatorio simple de variables cuantitativas para poblaciones infinitas, cuya fórmula se expresa en la muestra (3.5.3)

GRUPOS DE CONTROL

- ✓ Grupo de experimentación: Constituido de 15 placas de cultivo Petri que contenían cepas de la bacteria en estudio expuestas al extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 25%.
- ✓ Grupo de experimentación: Constituido de 15 placas de cultivo Petri que contenían cepas de la bacteria en estudio expuestas al extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 75%.
- ✓ Grupo de experimentación: Constituido de 15 placas de cultivo Petri que contenían cepas de la bacteria en estudio expuestas al extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 100%.
- ✓ Grupo control +: Constituido de 15 placas de cultivo Petri que contenían cepas de la bacteria en estudio expuestas con gluconato de clorhexidina al 0,12% con cloruro de cetilpiridinio 0,05%.
- ✓ Grupo control -: Constituido por 15 placas de cultivo Petri que contenían cepas de la bacteria en estudio con suero fisiológico al 0,9%.

3.5.4. Criterios de inclusión

- ✓ Las placas de agar contenían cepas de *Porphyromonas gingivalis*.
- ✓ Las placas de agar libres de contaminantes.
- ✓ Los discos de cultivo en agar se incubaron dentro un lapso de tiempo determinado a una temperatura específica.

3.5.5. Criterios de exclusión

- ✓ Las placas de agar que se manipularon de forma incorrecta, se dañaron o se contaminaron durante el almacenamiento o el transporte.
- ✓ Las placas de agar que se encontraron visiblemente microbios contaminantes
- ✓ Las placas de agar que no mostraron crecimiento de *Porphyromonas gingivalis*.

3.6. Variables y operacionalización

Variables		Definición operacional	Dimensiones	Indicadores	Escala de dimensión	Escala valorativa
Variable independiente	Extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i>	Acción del agente antibacteriano adquirido de la planta del Neem macerado en etanol (alcohol etílico)	Concentración del extracto etanólico	25%, 75% y 100%	Nominal	- Tuvo acción antibacteriana - No tuvo acción antibacteriana
	Gluconato de clorhexidina con cloruro de cetilpiridinio	Acción del antiséptico bucal especialmente utilizado para la eliminación de las bacterias patógenas causantes de las enfermedades periodontales.	Concentración de la solución	0,12% + 0,05%	Nominal	- Tuvo acción antibacteriana - No tuvo acción antibacteriana
Variable dependiente	Acción antibacteriana	La inhibición del crecimiento del <i>Porphyromonas gingivalis</i> se produce debido a la acción antibacteriana que ejerce sobre esta bacteria.	Halo de inhibición	Diámetro de halo de inhibición (según la escala de Duraffourd)	Ordinal	- ≤ 8 mm (nula / -) - 9 a 14 mm (sensible / +) - 15 a 19 mm (muy sensible / ++) - ≥ 20 mm (sumamente sensible / +++)
Variable interviniente	Tiempo	Magnitud física que establece la duración de la exposición del agar de la <i>Porphyromonas gingivalis</i> al producto antibacteriano	Horas	Tiempo de exposición	Nominal	- 24 horas - 48 horas - 72 horas

Fuente: Elaboración propia

3.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.7.1. Técnica

- Observacional:

Fue empleada con fines de examinar detenidamente y de manera meticulosa un fenómeno dentro un espacio, recopilar información y documentarlos con el fin de analizarlos posteriormente. En esta investigación, dado que es fue un estudio con escenario de experimentación - in vitro, se contó con la colaboración del Biólogo Microbiólogo para el análisis y evaluación de las muestras.

3.7.2. Descripción de los instrumentos

- Ficha de recolección de datos

Este formato (Anexo 2) fue corroborado y validado a través de una evaluación conocido como juicio de expertos, donde fue llenado desde el inicio hasta el final de la observación de los resultados de la efectividad antimicrobiana de cada sustancia a prueba en agar (n=15), los cuales se obtuvieron de los halos de inhibición producidos por la clorhexidina al 0,12% con CPC al 0,05%, extracto etanólico de Azadirachta indica (Neem) al 25%, extracto etanólico de Azadirachta indica (Neem) al 75%, extracto etanólico de Azadirachta indica (Neem) al 100% y suero fisiológico al 0,9% a las 24, 48 y 72 horas, los cuales fueron medidos por un Pie de Rey (Regla Vernier) calibrado. (Anexo 4)

3.7.3. Validación

Fue validada mediante el método establecido conocido como juicio de expertos que constó de tres docentes. Esto se evidenció en el documento Validación de instrumento (Anexo 3), la cual fue calificada y firmada individualmente por cada docente experto. Este instrumento

validado sirvió para registrar el tamaño del halo en cada una de las muestras evaluadas contra la *Porphyromonas gingivalis*.

3.7.4. Confiabilidad

En esta investigación, se realizó la medición del tamaño del halo de inhibición de cada sustancia a prueba del antibiograma con una regla Vernier calibrada. Además, dichas cepas bacterianas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 contó con Certificado de análisis (Anexo 6) donde se describió sus características macroscópicas y microscópicas. Asimismo, el proceso de elaboración de las concentraciones de extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Anexo 9), los resultados del ensayo microbiológico de las muestras evaluadas contra la *Porphyromonas gingivalis* (Anexo 5. Informe de resultados) y la correcta eliminación del material de ensayo biocontaminado (Anexo 8) fue supervisado por un microbiólogo colegiado y habilitado.

❖ Obtención de las sustancias de prueba

Clorhexidina al 0,12% con CPC al 0,05%, extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 25%, extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 75% y extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 100% y suero fisiológico al 0,9%. El primer antiséptico oral se consiguió de manera comercial, mientras que los extractos etanólicos y suero fisiológico se realizará en un laboratorio especializado (Scientific Quality S.A.C.).

❖ Preparación del agar para el ensayo antibiograma

Para el ensayo antibiograma, es decir, para medir la acción antibacteriana de las sustancias de prueba, se realizó pocillos (orificios) en el agar Schaedler enriquecido, y se utilizó sacabocado estéril para realizar dichos orificios en el agar. En estos pocillos se inocularon: clorhexidina al 0,12% con CPC al 0,05%, extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al

25%, extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 75% y extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 100% y suero fisiológico al 0,9%.

❖ **Cepa bacteriana seleccionada para el proyecto de investigación.**

El tipo de cepa utilizada para este proyecto fue *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, producida por Lab. MICROBIOLOGICS de Estados Unidos e importada a través de la Empresa GENLAB DEL PERU S.A.C.

❖ **Preparación y esterilización del Agar Schaedler enriquecido**

Para preparar de Agar Schaedler enriquecido, se pesó en una balanza la cantidad empleó en el ensayo antibiograma en un frasco de vidrio para luego combinarlo con la adecuada proporción de agua destilada. Se homogenizó el agar Schaedler hidratado con el calor de un microondas por unos minutos. Luego, fue esterilizado en autoclave a 121°C, 15 PSI, durante el periodo de un cuarto de hora. Posterior a lo anterior, se enfrió a baño de María a 45°C por 20 minutos. En la sala de análisis, frente al mechero de Bunsen, se agregó Sangre desfibrinada al 5% y vitamina K en el frasco de agar Schaedler e inmediatamente se depositó en placas Petri estériles. Para terminar, se dejó enfriar el agar por unos minutos, para posteriormente utilizarse en el ensayo de antibiograma. Se realizó un control de esterilidad introduciendo una placa Petri a la incubadora con agar Schaedler enriquecido a 37°C por un día.

❖ **Reconstitución de cepa liofilizada**

La cepa *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 fue reconstruido en medio Tioglicolato fluido frente a la llama de un mechero de Bunsen, el cual fue colocado de una jarra anaeróbica. Luego, junto a dicha jarra, se incubó por 24 horas a 37°C. Posterior a la incubación, se realizó el

estriado de la cepa en estudio en placas Petri de agar Schaedler enriquecido, para verificar la morfología en placa de las colonias jóvenes y tinción Gram de *Porphyromonas gingivalis*.

❖ **Estandarización del inóculo de la cepa en estudio**

Se procedió a colocar una fracción de colonia aislada en el agar Schaedler enriquecido y se trasladó a medio Tioglicolato fluido, el cual se colocó en una incubadora por 24 horas a 37°C. Este medio Tioglicolato fluido con *Porphyromonas gingivalis* se estandarizó a un nivel de concentración del $1,5 \times 10^8$ UFC/ml, utilizando una solución estándar de sulfato de Bario al 0,5 en la Escala de McFarland.

❖ **Realización de los pocillos para el ensayo de antibiograma**

Con un sacabocado estéril, se realizó pocillos antibiograma de un diámetro de 5,5mm en las placas con agar Schaedler enriquecido.

❖ **Inoculación de la cepa objeto de estudio en el agar Schaedler enriquecido.**

Las *Porphyromonas gingivalis*, cultivado en medio Tioglicolato fluido y estandarizado al 0,5 de McFarland, se inoculó mediante hisopo estéril en las placas con Agar Schaedler enriquecido con los pocillos antibiograma a ensayar. Para dicha inoculación de la cepa se procedió con hisopo, en la totalidad de la placa, en dos direcciones perpendiculares y sobrepuestas, además de una diseminación circular en los bordes del agar para reafirmar el cultivo de *Porphyromonas gingivalis*. Luego de la inoculación, se realizó la rotulación de los grupos de placas Petri con las sustancias de ensayo como el extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 25%, extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 75%, extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 100%, Clorhexidina al 0,12% más CPC al 0,05% (control +) y suero fisiológico al 0,9% (Control -).

❖ Colocación de las sustancias de prueba

Se procedió a trabajar con los grupos de placas y las sustancias de prueba, las cuales fueron rotulados en dichas placas. Se inocularon 15µL, con micropipeta, de las sustancias de ensayo en cada pocillo antibiograma y las mencionadas sustancias eran: Extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 25%, extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 75%, extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 100%, clorhexidina al 0,12% más CPC al 0,05% y suero fisiológico de 0,9%. Estas sustancias se dejaron difundir 20 minutos en el agar antes de ser colocadas en la jarra de anaerobiosis, en la cual se extrajo el oxígeno interno por la combustión de una vela (generación de CO₂). Luego de haberse extraído el oxígeno, este sistema anaeróbico se incubó en tres periodos distintos de 24, 48 y 72h a 37°C.

❖ Resultados. Medición de halos de inhibición

Posterior al tiempo de incubación, se midieron en milímetros con Regla Vernier, cada sustancia de ensayo fue formando halos de inhibición sobre los cultivos y placas con agar Schaedler enriquecido. Se procedieron a medir a las 24, 48 y 72h de incubación la actividad antimicrobiana frente a *Porphyromonas gingivalis* con la ayuda de un instrumento con lupa y que brinda iluminación en la base de la placa (Contador de colonias). Los resultados se expresaron en milímetros.

3.8. Plan de procesamiento y análisis de datos

Cuando se concluyó las evaluaciones microbiológicas del antibiograma junto con la recopilación de la información resultante; y con miras de verificar la veracidad y confiabilidad, se procesó y organizó la base de datos con asistencia del programa de cálculo Excel 2016 y la

aplicación IBM.SPSS en su edición 25. Mediante el software inicialmente señalado, se halló la media muestral, desviación estándar, valores mínimo y máximo con la finalidad de describir cada conjunto de resultados por sustancia de prueba. Con el segundo programa estadístico se realizó la estadística inferencial, la cual, se dio comienzo con la aplicación del test de Shapiro-Wilk con la finalidad de verificar la normalidad de los resultados obtenidos de las sustancias de prueba, los cuales no presentaron una distribución normal. Por lo tanto, se utilizó estadísticas no paramétricas como la prueba U de Mann Whitney y Kruskal Wallis para comparar los resultados de las sustancias. Luego, se analizó los resultados entre tiempos o datos estadísticos dependientes, para ello se aplicaron las pruebas de Friedman y Wilcoxon. Se trabajó con un grado de significación del 0,05 y con un nivel de confianza del 95%.

3.9. Aspectos éticos

A fin de asegurar el nivel y calidad de este proyecto, en lo que respecta a sus conceptos teóricos como a las conclusiones y resultados experimentales obtenidos mediante la explicación de técnicas y el empleo de una herramienta que recopila los datos e información, se siguió un registro basado en el manual que ofrece instrucciones sobre cómo elaborar tesis utilizando una perspectiva cuantitativa, así como la sección de la guía que trata sobre citación y referencias al estilo Vancouver de nuestra casa de estudio UPNW. Esta elección de formatos de citación y referencia tiene como propósito respetar y acatar las normativas de derechos de autor y proteger los conceptos y las partes teóricas utilizadas. De igual modo, para fomentar la transparencia y el mejoramiento del rendimiento del estudio, se utilizó como herramienta para la prevención de plagio el PROGRAMA TURNITIN®, el cual verificó la similitud diversas fuentes de información anexadas como artículos científicos y bases de datos. Se realizó la validación de la ficha a través de un juicio de expertos, que aseguró así el cumplimiento de los criterios técnicos

que garantizó la fidelidad y precisión de la investigación. Como último paso, todos los criterios mencionados anteriormente fueron sujetos de observación por las bases del Manual de Procedimientos del Comité Institucional de Ética para la Investigación (CIEI-UPNW). Una vez concluido la actividad dentro las instalaciones del laboratorio, se siguieron con los protocolos y regulaciones para la gestión a los residuos biológicos, asegurando el adecuado tratamiento de los residuos contaminados.

CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1. Resultados

4.1.1. Análisis descriptivo de los resultados

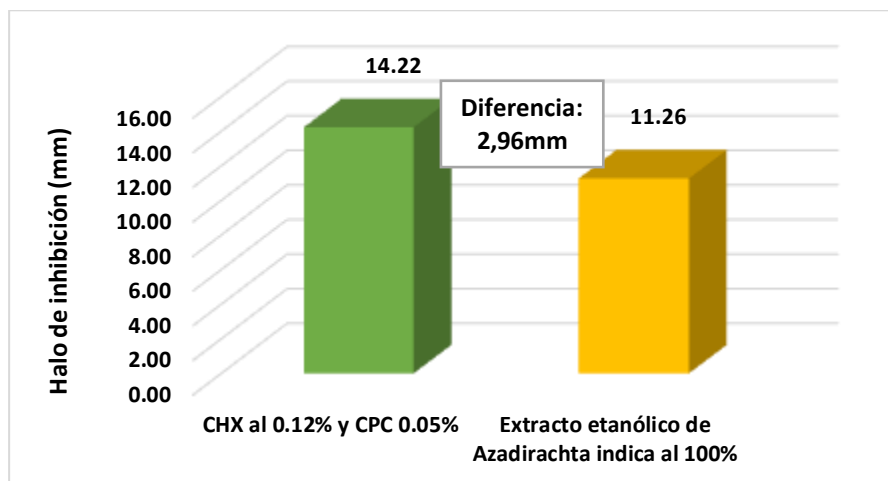
Tabla n° 1. Diferencia en la acción antibacteriana *in vitro* entre el extracto etanólico del *Azadirachta indica* comparado con el gluconato de clorhexidina al 0,12% con CPC al 0,05% sobre *Porphyromonas gingivalis*.

Periodo de Tiempo	\bar{X}		Min	Máx.
	mm	Duraffourd*		
Extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> al 100%	11,26	(+)	8,40	14,40
Gluconato de clorhexidina al 0,12% y CPC 0,05% (Control positivo)	14,22	(++)	9,79	19,70

(*) Escala de sensibilidad de Duraffourd: ≤ 8 mm (nula / -); 8 a 14 mm (sensible / +); 14 a 20 mm (muy sensible / ++); 20mm a más (sumamente sensible / +++)

Fuente: Elaboración propia

Figura n° 1. Diferencia en la acción antibacteriana *in vitro* entre el extracto etanólico del *Azadirachta indica* comparado con el gluconato de clorhexidina al 0,12% con CPC al 0,05% sobre *Porphyromonas gingivalis*.



Fuente: Elaboración propia

Según la tabla n° 1 y la figura n° 1, se observó, como diferencia en la acción antibacteriana, que *Porphyromonas gingivalis* fue muy sensible (++) frente a la clorhexidina al 0,12% con cloruro de cetilpiridinio 0,05% y sensible (+) con el extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem). Esta observación se obtuvo comparando el tamaño en milímetros de cada halo de

inhibición recopilado mediante cada sustancia de prueba utilizando la escala de sensibilidad de Duraffourd.

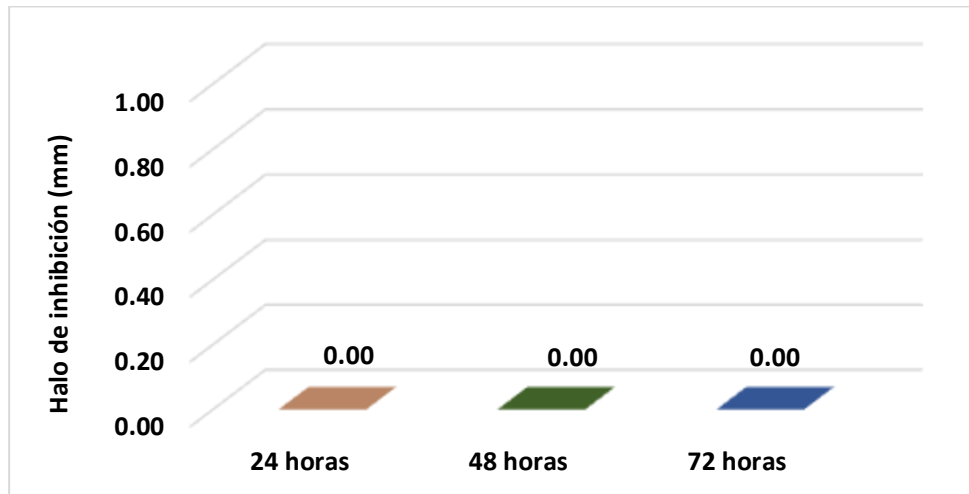
Tabla n° 2. Acción antibacteriana del extracto etanólico de *Azadirachta indica* al 25% frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (n=15) a las 24, 48 y 72 horas en agar Schaedler enriquecido

Periodo de Tiempo	X		DE	Min	Máx.
	mm	Duraffourd*			
24 horas	0,00	(-)	0,00	0,00	0,00
48 horas	0,00	(-)	0,00	0,00	0,00
72 horas	0,00	(-)	0,00	0,00	0,00

(*) Escala de sensibilidad de Duraffourd: ≤ 8 mm (nula / -); 8 a 14 mm (sensible/ +); 14 a 20 mm (muy sensible/ ++); 20mm a más (sumamente sensible / +++)

Fuente: Elaboración propia

Figura n° 2. Acción antibacteriana del extracto etanólico de *Azadirachta indica* al 25% frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (n=15) a las 24, 48 y 72 horas en agar Schaedler enriquecido



Fuente: Elaboración propia

Según la tabla n° 2 y la figura n° 2, se comprobó que el extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 25% a las 24 (0,00mm), 48 (0,00mm), y 72 horas (0,00mm) no presentó acción antibacteriana *in vitro* sobre *Porphyromonas gingivalis*.

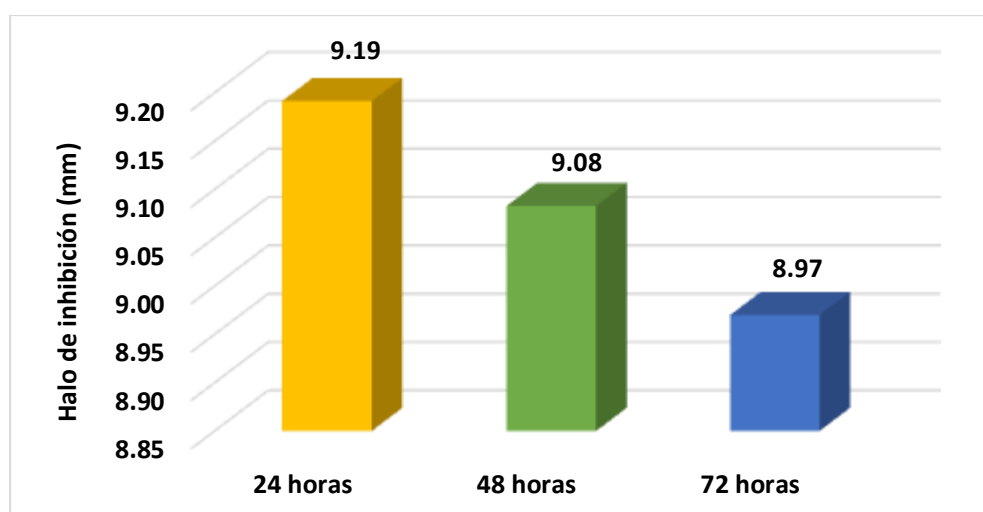
Tabla n° 3. Acción antibacteriana del extracto etanólico de *Azadirachta indica* al 75% frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (n=15) a las 24, 48 y 72 horas en agar Schaedler enriquecido

Periodo de Tiempo	X		DE	Min	Máx.
	mm	Duraffourd*			
24 horas	9,19	(+)	1,196	7,01	11,45
48 horas	9,08	(+)	1,194	6,90	11,34
72 horas	8,97	(+)	1,198	6,79	11,25

(*) Escala de sensibilidad de Duraffourd: : ≤ 8 mm (nula / -); 8 a 14 mm (sensible / +); 14 a 20 mm (muy sensible / ++); 20mm a más (sumamente sensible / +++)

Fuente: Elaboración propia

Figura n° 3. Acción antibacteriana del extracto etanólico de *Azadirachta indica* al 75% frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (n=15) a las 24, 48 y 72 horas en agar Schaedler enriquecido



Fuente: Elaboración propia

Según la tabla n° 3 y la figura n° 3, manifestó que el extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 75% a las 24 (9,19mm), 48 (9,08mm) y 72 horas (8,97mm) si presentó acción antibacteriana *in vitro* sobre *Porphyromonas gingivalis*, es decir esta bacteria es sensible (8mm a 14mm) según escala de Duraffourd frente a esta concentración de extracto etanólico de *Azadirachta indica*.

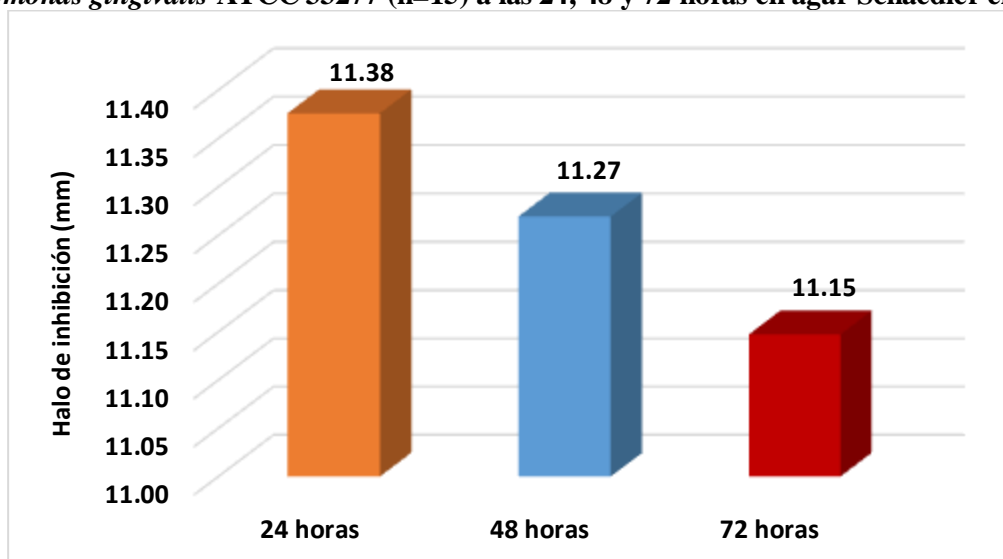
Tabla n° 4. Acción antibacteriana del extracto etanólico de *Azadirachta indica* al 100% frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (n=15) a las 24, 48 y 72 horas en agar Schaedler enriquecido

Periodo de Tiempo	X		DE	Min	Máx.
	mm	Duraffourd*			
24 horas	11,38	(+)	1,383	8,64	14,40
48 horas	11,27	(+)	1,382	8,51	14,31
72 horas	11,15	(+)	1,374	8,40	14,16

(*) Escala de sensibilidad de Duraffourd: : ≤ 8 mm (nula / -); 8 a 14 mm (sensible/ +); 14 a 20 mm (muy sensible/ ++); 20mm a más (sumamente sensible / +++)

Fuente: Elaboración propia

Figura n° 4. Acción antibacteriana del extracto etanólico de *Azadirachta indica* al 100% frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (n=15) a las 24, 48 y 72 horas en agar Schaedler enriquecido



Fuente: Elaboración propia

Según la tabla n° 4 y la figura n° 4, se infirió que el extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 100% a las 24 (11,38 mm), 48 (11,27 mm) y 72 horas (11,15 mm) si presentó acción antibacteriana *in vitro* sobre *Porphyromonas gingivalis*, es decir esta bacteria es sensible (8mm a 14mm) según escala de Duraffourd frente a esta concentración de extracto etanólico de *Azadirachta indica*.

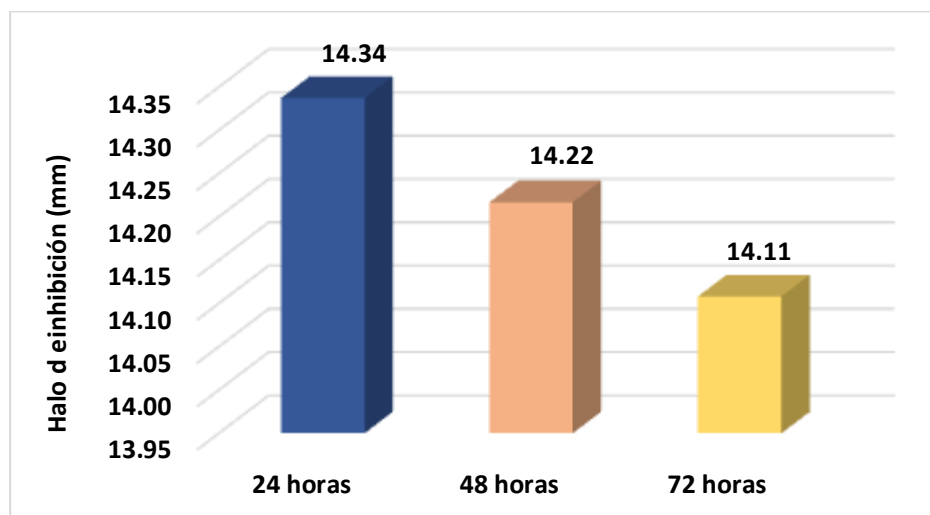
Tabla n° 5. Acción antibacteriana del gluconato de clorhexidina al 0.12% y CPC 0.05% frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (n=15) a las 24, 48 y 72 horas en agar Schaedler enriquecido

Periodo de Tiempo	X		DE	Min	Máx.
	mm	Duraffourd*			
24 horas	14,34	(++)	3,769	9,95	19,70
48 horas	14,22	(++)	3,758	9,88	19,59
72 horas	14,11	(++)	3,756	9,79	19,47

(*) Escala de sensibilidad de Duraffourd: ≤ 8 mm (nula / -); 8 a 14 mm (sensible / +); 14 a 20 mm (muy sensible / ++); 20mm a más (sumamente sensible / +++)

Fuente: Elaboración propia

Figura n° 5. Acción antibacteriana del gluconato de clorhexidina al 0.12% y CPC 0.05% frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (n=15) a las 24, 48 y 72 horas en agar Schaedler enriquecido



Fuente: Elaboración propia

Según la tabla n° 5 y la figura n° 5, se evidenció que la clorhexidina al 0,12% con CPC al 0,05% a las 24 (14,34 mm), 48 (14,22 mm) y 72 horas (14,11 mm) si presentó acción antibacteriana *in vitro* sobre *Porphyromonas gingivalis*, es decir esta bacteria fue muy sensible (14mm a 20mm) según escala de Duraffourd frente a este colutorio oral.

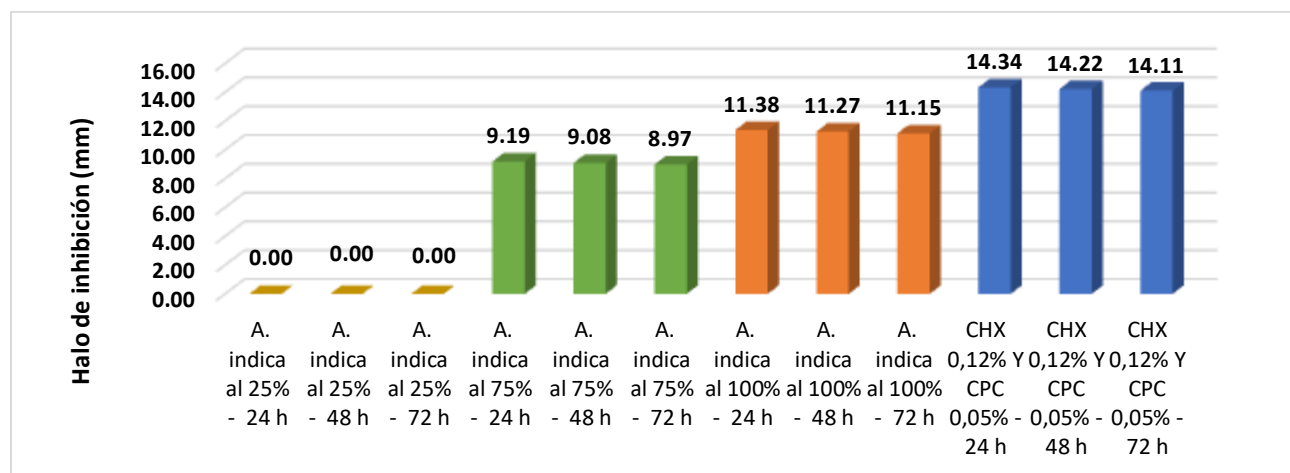
Tabla n° 6. Acción antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* al 25%, 75% y 100% comparado con el gluconato de clorhexidina al 0,12% con CPC al 0,05% frente a *Porphyromonas gingivalis* dentro las 24, 48 y 72 horas.

Sustancia de prueba	Prueba de Mann Whitney (Valor p)		
	24 horas	48 horas	72 horas
Extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> 25% vs. Gluconato de Clorhexidina al 0,12% y cloruro de cetilpiridinio al 0,05%	0,000	0,000	0,000
Extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> 75% vs. Gluconato de Clorhexidina al 0,12% y cloruro de cetilpiridinio al 0,05%	0,000	0,000	0,000
Extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> 100% vs. Gluconato de Clorhexidina al 0,12% y cloruro de cetilpiridinio al 0,05%	0,237	0,074	0,074
PRUEBA DE KRUSKAL WALLIS	0,000	0,000	0,000

Nivel de significancia estadística: $\alpha = 0,05$

Fuente: Elaboración propia

Gráfico n° 6. Acción antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* al 25%, 75% y 100% comparado con el gluconato de clorhexidina al 0,12% con CPC al 0,05% frente a *Porphyromonas gingivalis* dentro las 24, 48 y 72 horas.



Fuente: Elaboración propia

Según la tabla n° 6 y la figura n° 6, se demostró que los extractos etanólicos de *Azadirachta indica* (Neem) al 25% ($p < 0,05$) y 75% ($p < 0,05$), fue inferior la acción antibacteriana comparado con clorhexidina al 0,12% con CPC al 0,05% a las 24, 48 y 72 horas. Sin embargo, el extracto

etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 100% ($p>0,05$) tuvo efecto similar a la acción antibacteriana de la clorhexidina al 0,12% con CPC 0,05% *in vitro* sobre *Porphyromonas gingivalis* a las 24, 48 y 72 horas.

4.1.2. Prueba de normalidad de resultados

Se realizó para determinar qué análisis estadístico (paramétrico o no paramétrico) usar en los objetivos de la investigación.

Tabla n° 7. Análisis de Normalidad por Shapiro Wilk (n=15) de los extractos etanólicos de *Azadirachta indica* frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 a las 24, 48 y 72 horas de estudio

Sustancia de prueba	Valor p		
	24 horas	48 horas	72 horas
Extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> al 100%	0,599	0,574	0,578
Extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> al 75%	0,909	0,910	0,929
Gluconato de clorhexidina al 0,12% y CPC 0,05% (Control positivo)	0,042	0,041	0,039

Nivel de significancia ($\alpha = 0,05$)

Fuente: Elaboración propia

Según la tabla n° 7, infirió que todos los resultados de los halos de los dos extractos etanólicos de *Azadirachta indica* tanto del 100%, como del 75% frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 presentaron una distribución normal ($p > 0,05$) a las 24, 48 y 72 horas de incubación. Sin embargo, el control positivo, clorhexidina al 0,12% con CPC al 0,05% no presentó distribución normal ($p < 0,05$) a las 24, 48 y 72 horas de incubación en agar Schaedler enriquecido. Se pudo determinar que, ya que existen agrupaciones de datos tanto de distribución normal como no normal, se decidió emplear herramientas estadísticas no paramétricas como, por ejemplo, los tests Kruskal Wallis, U de Mann Whitney, Friedman y Wilcoxon, orientado al análisis de los resultados.

4.1.3 Pruebas de U de Mann Whitney y Kruskal Wallis (Análisis de muestras independientes)

Se utilizó este análisis para evaluar la existencia de diferencias significativas en el grupo de los extractos etanólicos de *Azadirachta indica* de 25%, 75% y 100% y el control positivo, clorhexidina al 0,12% con CPCP al 0,05% a las 24, 48 y 72 horas de estudio.

Tabla n° 8. Comparaciones múltiples de las acciones antibacterianas de extractos etanólicos de *Azadirachta indica* 25%, 75%, 100%, gluconato de clorhexidina al 0,12% y cloruro de cetilpiridinio al 0,05% y el suero fisiológico al 0,9%

Sustancia de prueba	Prueba de Mann Whitney (Valor p)		
	24 horas	48 horas	72 horas
Extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> 75% vs. Extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> 100%	0,000	0,000	0,000
Extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> 75% vs. Gluconato de Clorhexidina al 0,12% y cloruro de cetilpiridinio al 0,05%	0,000	0,000	0,000
Extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> 100% vs. Gluconato de Clorhexidina al 0,12% y cloruro de cetilpiridinio al 0,05%	0,237	0,074	0,074
Extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> 100% vs. Extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> 25%	0,000	0,000	0,000
Extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> 75% vs. Extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> 25%	0,000	0,000	0,000
Extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> 100% vs. Suero fisiológico al 0,9%	0,000	0,000	0,000
Extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> 75% vs. Suero fisiológico al 0,9%	0,000	0,000	0,000
Extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> 25% vs. Gluconato de Clorhexidina al 0,12% y cloruro de cetilpiridinio al 0,05%	0,000	0,000	0,000
PRUEBA DE KRUSKAL WALLIS	0,000	0,000	0,000

ancia estadística: $\alpha = 0,05$

Fuente: Elaboración propia

Tabla n°8: Demostró que la acción antibacteriana frente a *Porphyromonas gingivalis* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* al 100 % es significativamente superior a las siguientes sustancias de prueba: Extracto etanólico de *Azadirachta indica* 75%, Extracto etanólico de *Azadirachta indica* 25% y suero fisiológico al 0,9% a los 24, 48 y 72 horas de incubación ($p < 0,05$). Sin embargo, la

acción antibacteriana de la clorhexidina al 0,12% con CPC al 0,05% fue similar al del extracto etanólico de *Azadirachta indica* 100 % para los tres tiempos de incubación. ($p > 0,05$).

4.1.4. Pruebas de Friedman y Wilcoxon (Análisis de muestras dependientes)

Se ejecutó para demostrar la existencia de diferencias significativas con respecto a las observaciones y resultados obtenidos a las 24h , 48h y 72 h de incubación a efectos de una misma sustancia experimental.

Tabla n° 9. Análisis de varianzas de los extractos etanólicos de *Azadirachta indica* 25%, 75%, 100%, gluconato de clorhexidina al 0,12% y cloruro de cetilpiridinio al 0,05% y el suero fisiológico al 0,9%

Sustancia de prueba	Valor p			
	Prueba de Friedman	Prueba de Wilcoxon		
		24 y 48 horas	24 y 72 horas	48 y 72 horas
Extractos etanólicos de <i>Azadirachta indica</i> 75%	0,000	0,001	0,001	0,001
Extractos etanólicos de <i>Azadirachta indica</i> 100%	0,000	0,001	0,001	0,001
Gluconato de clorhexidina al 0,12% y cloruro de cetilpiridinio al 0,05% (Control positivo)	0,000	0,001	0,001	0,001

Nivel de significancia estadística: $\alpha = 0,05$

Fuente: Elaboración propia

Según la tabla n° 9, infirió presencia de diferencias significativas en la acción antibacteriana a los 24 y 48 horas, 48 y 72 horas y 24 y 72 horas ($p < 0,05$) de incubación para cada sustancia de prueba como Extracto etanólico de *Azadirachta indica* al 75%, el extracto etanólico de *Azadirachta indica* al 100% y para el control positivo, clorhexidina al 0,12% más CPC al 0,05%. Por lo tanto, la mayor acción antibacteriana frente a *Porphyromonas gingivalis* fue en 24 h de estudio para los extractos etanólicos de *Azadirachta indica* al 75%, 100% y clorhexidina al 0,12% y CPC al 0,05%.

4.1.5. Comprobación de hipótesis

Prueba de hipótesis- Hipótesis general

- **Hi:** El extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) tiene mayor acción antibacteriana *in vitro* comparado con el gluconato de Clorhexidina al 0,12% con cloruro de cetilpiridinio 0,05% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, Lima. 2023.
- **Ho:** El extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) no tiene mayor acción antibacteriana *in vitro* comparado con el gluconato de Clorhexidina al 0,12% con cloruro de cetilpiridinio 0,05% sobre las cepas *Porphyromonas gingivalis*, Lima. 2023.

Tabla n°10. Prueba de Mann Whitney de la comparación del extracto etanólico de *Azadirachta indica* frente al Gluconato de clorhexidina al 0,12% con cloruro de cetilpiridinio 0,05%

Sustancia de prueba	Prueba de Mann Whitney		
	Valor p		
	24 horas	48 horas	72 horas
Extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> 100% vs. Gluconato de Clorhexidina al 0,12% y cloruro de cetilpiridinio al 0,05%	0,237	0,074	0,074

Nivel de significancia ($\alpha=0,05$). Estadístico de prueba: U de Mann Whitney

Toma de decisión:

Los valores de "p" encontrados fueron de 0,237; 0,074 y 0,074 a las 24, 48 y 72 horas, respectivamente y mayores al valor alfa ($\alpha=0,05$), los cuales quisieron decir que no existió diferencia significativa con el control positivo en los tres periodos de tiempo señalados. Dado lo anterior, la hipótesis nula general (H0) fue corroborada con el 95 % de confianza, se pudo afirmar que la sustancia del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) no tuvo mayor acción antibacteriana *in vitro* comparado con la clorhexidina al 0,12% más CPC 0,05% sobre las *Porphyromonas gingivalis*, Lima. 2023.

Prueba de hipótesis - Hipótesis específica 1

- **Hi¹**: Existe acción antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 25% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.
- **Ho¹**: No existe acción antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 25% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.

Tabla n°11. Prueba de Mann Whitney de extracto etanólico de *Azadirachta indica* 25% comparado con Suero fisiológico al 0,9%

Sustancia de prueba	Prueba de Mann Whitney		
	Valor p		
	24 horas	48 horas	72 horas
Extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> 25% vs. Suero fisiológico al 0,9% (Control negativo)	1,000	1,000	1,000

Nivel de significancia ($\alpha = 0,05$). Estadístico de prueba: U de Mann Whitney

Toma de decisión:

El valor "p" encontrado fue de 1,000 a las 24, 48 y 72 horas y mayor al valor alfa ($\alpha=0,05$) lo cual quiso decir que no existió diferencia significativa con el control negativo en los tres periodos de tiempo señalados. Por ello, se aceptó la hipótesis nula (H_0^1) y con el 95 % de confianza, se pudo afirmar que no existió acción antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 25% frente las *Porphyromonas gingivalis*, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.

Prueba de hipótesis - Hipótesis específica 2

- **Hi²:** Existe acción antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 75% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.
- **Ho²:** No existe acción antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 75% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.

Tabla n°12. Prueba de Mann Whitney de extracto etanólico de *Azadirachta indica* 75% comparado con Suero fisiológico al 0,9% (Control negativo)

Sustancia de prueba	Prueba de Mann Whitney		
	Valor p		
	24 horas	48 horas	72 horas
Extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> 75% vs. Suero fisiológico al 0,9% (Control negativo)	0,000	0,000	0,000

Nivel de significancia ($\alpha=0,05$). Estadístico de prueba: U de Mann Whitney

Toma de decisión:

El valor "p" encontrado fue de 0,000 a las 24, 48 y 72 horas y menor al valor alfa ($\alpha=0,05$), lo cual quiso decir que existió diferencia significativa comparado con el control negativo en los tres periodos de tiempo señalados. Por ello, se aceptó la hipótesis alternativa (Hi²) y con el 95 % de confianza, se pudo afirmar que existió acción antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 75% frente las *Porphyromonas gingivalis*, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.

Prueba de hipótesis - Hipótesis específica 3

- **Hi³**: Existe acción antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 100% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.
- **Ho³**: No existe acción antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 100% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.

Tabla n°13. Prueba de Mann Whitney de extracto etanólico de *Azadirachta indica* 100% comparado con Suero fisiológico al 0,9%

Sustancia de prueba	Prueba de Mann Whitney		
	Valor p		
	24 horas	48 horas	72 horas
Extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> 100% vs. Suero fisiológico al 0,9% (Control negativo)	0,000	0,000	0,000

Nivel de significancia ($\alpha=0,05$). Estadístico de prueba: U de Mann Whitney

Toma de decisión:

El valor "p" encontrado fue de 0,000 a las 24, 48 y 72 horas y menor al valor alfa ($\alpha=0,05$), lo cual quiso decir que existió diferencia significativa comparado con el control negativo en los tres periodos de tiempo señalados. Por ello, se aceptó la hipótesis alternativa (Hi³) y con el 95 % de confianza, se pudo afirmar que existió acción antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 100% frente las *Porphyromonas gingivalis*, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.

Prueba de hipótesis - Hipótesis específica 4

- **Hi⁴:** Existe acción antibacteriana *in vitro* del gluconato de clorhexidina al 0,12% con cloruro de cetilpiridinio 0,05% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.
- **Ho⁴:** No existe acción antibacteriana *in vitro* del gluconato de clorhexidina al 0,12% con cloruro de cetilpiridinio 0,05% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.

Tabla n°14. Prueba de Mann Whitney de Gluconato de clorhexidina al 0,12% con cloruro de cetilpiridinio 0,05% comparado con Suero fisiológico al 0,9%

Sustancia de prueba	Prueba de Mann Whitney		
	Valor p		
	24 horas	48 horas	72 horas
Gluconato de clorhexidina al 0,12% con cloruro de cetilpiridinio 0,05% vs. Suero fisiológico al 0,9% (Control negativo)	0,000	0,000	0,000

Nivel de significancia ($\alpha = 0,05$). Estadístico de prueba: U de Mann Whitney

Toma de decisión:

El valor "p" encontrado fue de 0,000 a las 24, 48 y 72 horas y menor al valor alfa ($\alpha = 0,05$), lo cual quiso decir que existió diferencia significativa comparado con el control negativo en los tres periodos de tiempo señalados. Por ello, se aceptó la hipótesis alternativa (Hi⁴) y con el 95 % de confianza, se pudo afirmar que existió acción antibacteriana *in vitro* de la clorhexidina al 0,12% más CPC al 0,05% sobre las *Porphyromonas gingivalis*, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.

Prueba de hipótesis - Hipótesis específica 5

- **Hi⁵**: Existe acción antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 25%, 75% y 100% comparado con el gluconato de clorhexidina al 0,12% con cloruro de cetilpiridinio 0,05% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.
- **Ho⁵**: No existe acción antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 25%, 75% y 100% comparado con el gluconato de clorhexidina al 0,12% con cloruro de cetilpiridinio 0,05% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.

Tabla n°15. Prueba de Mann Whitney de las concentraciones de extracto etanólico de *Azadirachta indica* comparado Gluconato de clorhexidina al 0,12% con cloruro de cetilpiridinio 0,05% a las 24, 48 y 72 horas

Sustancia de prueba	Prueba de Mann Whitney		
	Valor p		
	24 horas	48 horas	72 horas
Extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> 25% vs. Gluconato de Clorhexidina al 0,12% y cloruro de cetilpiridinio al 0,05%	0,000	0,000	0,000
Extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> 75% vs. Gluconato de Clorhexidina al 0,12% y cloruro de cetilpiridinio al 0,05%	0,000	0,000	0,000
Extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> 100% vs. Gluconato de Clorhexidina al 0,12% y cloruro de cetilpiridinio al 0,05%	0,237	0,074	0,074

Nivel de significancia ($\alpha=0,05$). Estadístico de prueba: U de Mann Whitney

Toma de decisión:

Extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 25%: El valor "p" encontrado fue de 0,000 a las 24, 48 y 72 horas y menor al valor alfa ($\alpha = 0,05$), lo cual quiso decir que existió diferencia significativa con el control positivo en los tres periodos de tiempo señalados.

Extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 75%: El valor "p" encontrado fue de 0,000 a las 24, 48 y 72 horas y menor al valor alfa ($\alpha = 0,05$), lo cual quiso decir que existió diferencia significativa con el control positivo en los tres periodos de tiempo señalados.

Extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 100%: Los valores de "p" encontrados fueron de 0,237; 0,074 y 0,074 a las 24, 48 y 72 horas, respectivamente y mayores al valor alfa ($\alpha = 0,05$), los cuales quisieron decir que no existió diferencia significativa con el control positivo en los tres periodos de tiempo señalados.

Por lo anterior, se aceptó la hipótesis alternativa (H_1^5) y con el 95 % de confianza, se pudo afirmar que existió acción antibacteriana del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) *in vitro* al 100% comparable con la clorhexidina al 0,12% más CPC al 0,05% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.

4.1.6. Discusión de resultados

Este estudio consistió en una investigación hipotética y deductiva que adopta un enfoque cuantitativo. Se clasificó como una investigación aplicada y siguió un modelo experimental *in-vitro* y longitudinal desde una perspectiva prospectiva; además fue diseñado para evaluar la diferencia en la acción antibacteriana *in vitro* entre el extracto etanólico del *Azadirachta indica* (Neem) comparado con el gluconato de clorhexidina al 0,12% con CPC al 0,05% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*. Perú- 2023.

De acuerdo con los resultados, se evidenció que las dos sustancias en estudio mostraron la presencia de acción antibacteriana con halos de inhibición con valores distintos (según Escala de Duraffourd) tanto el extracto etanólico del *Azadirachta indica* (Neem) como el gluconato de clorhexidina al 0,12% con CPC al 0,05% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*. En lo que respecta al gluconato de clorhexidina al 0,12% y CPC al 0,05% los valores promedios, a las 24 horas (14,34 mm), 48 horas (14,22 mm) y 72 horas (14,11mm); lo cual de acuerdo a la escala con la que se está midiendo, la clorhexidina con el CPC se clasifican como muy sensible/ ++; en tanto al extracto etanólico al 100% presentó promedios, a las 24 horas (11,38 mm), 48 horas (11,27 mm) y 72 horas (11,15 mm); en tanto, el extracto etanólico al 75% registró valores estadísticos, a las 24 horas (9,19 mm), 48 horas (9,08 mm) y 72 horas (8,97 mm) en ambas concentraciones según la escala se clasifica como sensibles; mientras que el extracto etanólico al 25% no presentó acción antibacteriana o como nula. En consecuencia, la clorhexidina al 0,12% con CPC al 0,05% presenta mejor acción antibacteriana y superior sensibilidad que los extractos

con etanol del 75% e igualmente del 100% contra la *P. gingivalis*. Del mismo modo, guarda similitud con lo expresado por **Pardo et al. (22)** en Perú, dispusieron extractos etanólicos de los derivados de la *Myrciaria dubia* (Camu-camu) (pulpa, semilla, cáscara) vs la clorhexidina 0,12% a las 24-48 horas y 11 días, donde identificaron que la actividad antibacteriana de los tres extractos etanólicos contra la *P. gingivalis* fueron inferiores a la de la clorhexidina al 0,12%. Así mismo, **Alarcón (18)** en Perú, reporta en su tesis que los resultados obtenidos son variables, la clorhexidina al 0,12% demostró que tuvo una alta sensibilidad con un diámetro de halo de (31,2 mm) frente a la *P. gingivalis*; mientras con el extracto de coca al 100% fue sensible con un diámetro de (16,6 mm); al 50% se manifestó como poco sensible con un diámetro de (10,2 mm) y, en cambio, no respondió de manera efectiva al extracto del 25%, ni a la corteza de *Croton lechleri* (sangre de drago), ni con el control (-) mediante el uso del bicarbonato sódico. Por lo tanto, así como en el presente estudio realizado se descubrió que la *P. gingivalis* manifestó notable susceptibilidad, tanto a la CHX 0,12% como al extracto hidroalcohólico de coca al 100%.

No obstante, con lo encontrado por **Stigler (20)** en Perú, evaluó a una sustancia natural distinta, en este caso, extracto etanólico del *Equisetum giganteum L* en porcentajes de 25%, 50%, 75% y 100% vs Clorhexidina al 0,12% sobre *P. gingivalis* a dos horas diferentes, Coincidiendo con lo encontrado en este estudio en el porcentaje del 25% no tuvo efecto, y de lo contrario al presente trabajo, el extracto etanólico del *Equisetum giganteum L* al 100% tuvo mayores resultados y fue más eficaz a las dos horas estudiadas demostrando halos de (13,50 mm) vs Clorhexidina que presentó halos de (12,50 mm) a las 24 horas, y a las 48 horas continuó ofreciendo resultados superiores con halos de (13,80 mm) vs clorhexidina con diámetros (12.50 mm). Estos hallazgos se encuentran en coincidencia con lo encontrado por **Neira (21)** en Perú, evaluó la actividad antibacteriana contra la *P. gingivalis* en esencias naturales de aceite de *Schinus molle L.* y

Thymus vulgaris al 50% al igual que al 100% vs CHX de 0,12%, y concluyó que ambos aceites esenciales demostraron una actividad antibacteriana superior a la clorhexidina frente a este microorganismo.

Por otro lado, también existe hallazgos sobre la planta del Neem que fueron descubiertos por **Saquib et al. (19)** en Arabia Saudita, revelaron una buena acción antibacteriana exhibida por el extracto etanólico de *A. indica* (13 ± 0.36 mm) y una actividad antibacteriana mayor contra la *P. gingivalis*, los valores de MIC fueron 0.64 ± 0.24 mg/mL, y los de MBC fueron 10.42 ± 3.61 mg/mL con relevancia estadística ($p < 0,05$); así mismo, *A indica* mostró sinergismo en combinación con metronidazol, tetraciclina y amoxicilina contra *P. gingivalis*. Del mismo modo, se asemeja a lo que menciona **Müller et al. (15)** en Alemania, evidenciaron actividad antimicrobiana del extracto de hoja de *A. indica*, la cual mostró en una concentración mínima inhibitoria de 1024 mg/L con etanol acuoso al 70% contra *P. gingivalis* ATCC 33277 y 256 mg/L para el extracto de acetona.

Por otra parte, se encontraron trabajos de diferentes plantas y extractos contra la bacteria en estudio. En el trabajo realizado por **Nayak et al. (17)** en India, evaluaron y determinaron la MIC y MBC del extracto etanólico y acuoso del *A. paeoniifolius*. Los resultados derivados de la evaluación de la MIC mostraron que todos los microorganismos examinados demostraron sensibilidad al extracto acuoso de *A. paeoniifolius* a un grado de concentración del 0,4 mg en cada mililitro. Pero, al ser expuesto al extracto etanólico con menor concentración al 0,2 mg en cada mililitro, evidenció que la *P. gingivalis* y *F. nucleatum* fue sensible y al ser combinado con clorhidrato de tetraciclina exhibió una actividad bactericida contra Pg con un porcentaje de 0,2 mg/ml. Por lo que se concluye que el extracto de *A. paeoniifolius* en etanol demostró una actividad antibacteriana notable en contraste con el extracto acuoso procedente de la misma

planta. De la misma manera al trabajo anterior, lo expuesto por **BinShabaib et al. (23)** en Arabia Saudita, elaboraron extractos acuosos de *S. costus* y *M. alternifolia*, donde este último exhibió una notable actividad antimicrobiana significativamente alta contra *P. gingivalis* ($P < 0,001$), en relación con el extracto de *S. costus*.

Finalmente, **Alqahtani (13)** en Arabia Saudita, elaboró soluciones de enjuague bucal para ver la sensibilidad a bacterias anaerobias, dichas soluciones estuvieron compuestas por una concentración mínima inhibitoria del 2% de Neem, un 2% de regaliz y como control positivo utilizó 0,2% de clorhexidina. Dando como resultado y comparando los productos utilizados en el presente trabajo manifestó que *S. mutans* es susceptible al de Neem y clorhexidina a un porcentaje del 0,2 $\mu\text{g/mL}$ o superior, no obstante, *Lactobacillus* es receptivo a los enjuagues de Neem y clorhexidina cuando la concentración es de 1,6 $\mu\text{g/ml}$ o más. *Sanguis* fue sensible a los colutorios de clorhexidina desde de 25 $\mu\text{g/ml}$, y al Neem desde 50 $\mu\text{g/ml}$ en adelante. *A. naeslundii* es susceptible a los enjuagues de clorhexidina y Neem desde una concentración de 1,6 $\mu\text{g/ml}$ en adelante.

CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- **Primero:**

El extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) no demuestra mayor acción antibacteriana que el gluconato de Clorhexidina al 0,12% con cloruro de cetilpiridinio 0,05% frente a *Porphyromonas gingivalis*, *in vitro*, las 24, 48 y 72 horas de estudio.

- **Segundo:**

El extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 25% no demuestra acción antibacteriana frente a *Porphyromonas gingivalis*, *in vitro*, las 24, 48 y 72 horas de estudio.

- **Tercero:**

El extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 75% si demuestra acción antibacteriana frente a *Porphyromonas gingivalis*, *in vitro*, las 24, 48 y 72 horas de estudio. Según Escala de sensibilidad de Duraffourd, *Porphyromonas gingivalis* fue sensible (+) al extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 75%.

- **Cuarto:**

El extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 100% si demuestra acción antibacteriana frente a *Porphyromonas gingivalis*, *in vitro*, las 24, 48 y 72 horas de

estudio. Según Escala de sensibilidad de Duraffourd, *Porphyromonas gingivalis* fue sensible (+) al extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 100%.

- **Quinto:**

El gluconato de Clorhexidina al 0,12% con cloruro de cetilpiridinio 0,05% si presenta acción antibacteriana frente a *Porphyromonas gingivalis*, *in vitro*, las 24, 48 y 72 horas de estudio. Según Escala de sensibilidad de Duraffourd, *Porphyromonas gingivalis* mostró mucha sensible (++) a la Clorhexidina de 0,12% con cloruro de cetilpiridinio 0,05%.

- **Sexto:**

El extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) al 100% presenta acción antibacteriana similar a la Clorhexidina de 0,12% más CPC 0,05% frente a *Porphyromonas gingivalis*, *in vitro*, las 24, 48 y 72 horas de estudio. Sin embargo, los extractos del *Azadirachta indica* (Neem) del 75% y 25% manifestaron acción antibacteriana inferior que la Clorhexidina 0,12% más CPC 0,05% frente a *Porphyromonas gingivalis*, *in vitro*, en los tres tiempos evaluados.

5.2. Recomendaciones

- Se sugiere continuar con más estudios de la planta de *Azadirachta indica* (Neem) para seguir comprobando la acción antibacteriana, antifúngica, si se desea conseguir un producto o una alternativa potencialmente natural y eficaz contra microorganismos orales.
- Se sugiere desarrollar adicionalmente estudios destinadas a evaluar la eficacia de este extracto etanólico del Neem en diferentes presentaciones y varias concentraciones, porcentajes, con el fin de encontrar y establecer la cantidad óptima requerida para combatir cepas periodontales en especial la *P. gingivales*.
- Se recomienda realizar investigaciones *in vivo* con el fin de evaluar la citotoxicidad de manera precisa. Así mismo, se debe examinar las posibles reacciones adversas y efectos secundarios y como el uso prolongado, alteración en el gusto y la cavidad oral, tales como los efectos de la Clorhexidina.
- Se recomienda ampliar el alcance del trabajo, abordando la exploración de la posibilidad de una acción sinérgica entre las sustancias del extracto etanólico del *Azadirachta indica*, la clorhexidina más CPC, incorporando otras opciones terapéuticas o fármacos destinados a detener el avance de la enfermedad periodontal.

REFERENCIAS

1. Sedghi LM, Bacino M and Kapila YL. Periodontal Disease: The Good, The Bad, and The Unknown. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021; 11:766944. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.766944>
2. Cárdenas P, Guzmán D, Valera E, Cuevas J, Zambrano G, García A. Principales criterios de diagnóstico de la nueva clasificación de enfermedades y condiciones periodontales. *Int. J. Odontostomat.* 2021; 15(1):175-180. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-381X2021000100175>
3. Murugaiyan, V., Utreja, S., Hovey, Sun Y, LaMonte M, Wactawski-Wende J, et al. Defining Porphyromonas gingivalis strains associated with periodontal disease. *Sci Rep.* 2024; 14: 6222. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-56849-x>
4. World Health Organization. Oral health [Internet]. 2023. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>
5. Chen-zhou W, Yi-hang Y, Shen-sui L, Shen-sui L, Bo-wen Z, Wen C, et al. Epidemiologic relationship between periodontitis and type 2 diabetes mellitus. *BMC Oral Health* 20 [Internet]. 2020 [citado el 30 de mayo del 2023]; 20:204. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12903-020-01180-w>
6. Marín R, Duque A. Condiciones modificadoras del riesgo de enfermedad periodontal: una revisión narrativa sobre la evidencia en américa latina. *Rev. CES Odont.* 2021; 34(1): 82-99. Disponible en: <https://doi.org/10.21615/cesodon.34.1.8>
7. Yataco D, Gomez W, Carrasco M, Orejuela F. Asociación de la enfermedad periodontal con factores de riesgo en adolescentes de 15 años de una institución educativa. *Rev Estomatol Herediana* [Internet]. 2021[citado el 30 de mayo del 2023];31(3):178-185. Disponible en: <https://doi.org/10.20453/reh.v31i3.4047>

8. Gurrola E, Vargas N, Gómez M, Zambrano G, Valdez E, Arzola L. Efectividad de la aplicación intrasulcular de coenzima Q10 en pacientes con enfermedad periodontal. Revisión sistemática. ORAL. 2022; 23(71): 2034-2039. Disponible en: <https://www.imbiomed.com.mx/articulo.php?id=117205>
9. Ordinola C, Barrena M, Oc O, Pizarro O, Chicoma M, Barrena C, et al. Relación de enfermedad periodontal y chacchado de hoja de “coca” Erithroxylum coca (Erythroxyllaceae) con cal en trabajadores de construcción civil de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas - 2018. Arnaldoa [Internet]. 2020; 27 (1):129-140. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2413-32992020000100129&lng=es
10. Consuelo P. Prevalencia de la enfermedad periodontal y factores asociados en adultos jóvenes entre 18 - 24 años en Lima - 2016. [Tesis para optar el grado de maestro en Periodoncia]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2021. 55 p. Disponible en: https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/9015/Prevalencia_HornaV_alle_Patricia.pdf?sequence=1&isAllowed=y
11. Tay JRH, Ng E, Nair R, Tan ZS, Tan SHX. Economic evaluations in the treatment and evaluation of patients with periodontal disease: A critical review. J Clin Periodontol. 2021 ;48(5):679-694. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/jcpe.13456>
12. Northridge M, Kumar A, Kaur R. Disparities in Access to Oral Health Care. Ann Rev Public Heal. 2020; 41:513-535. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articl>
13. Alqahtani S. Antimicrobial efficacy of neem and liquorice with chlorhexidine on streptococcus sanguis, streptococcus mutans, lactobacillus and actinomyces naeslundii. An in-vitro study. Int J Dent. 2022; 25 (1): 95- 101. Disponible en:

[https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=ddh&AN=149424867&lang=es
&site=ehost-live](https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=ddh&AN=149424867&lang=es&site=ehost-live)

14. Singh M, Sharma D, Kumar D, Singh G, Swami G, Rathore MS. Formulation, Development, and Evaluation of Herbal Effervescent Mouthwash Tablet Containing Azadirachta Indica (Neem) and Curcumin for the Maintenance of Oral Hygiene. *Recent Pat Drug Deliv Formul.* 2020;14(2):145-161. Disponible en: <https://doi.org/10.2174/1872211314666200820142509>
15. Müller-Heupt L, Vierengel, N, Gross J, Opatz T, Deschner J, Von Loewenich F. Antimicrobial Activity of Eucalyptus globulus, Azadirachta indica, Glycyrrhiza glabra, Rheum palmatum Extracts and Rhein against Porphyromonas Gingivalis. *Antibiotics (Basel).* 2022; 11(2): 186. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020186>
16. Fatimah M. Al Qarni, Fathy M. Fasakhany E, Kenawi L, Moustafa A. Antimicrobial activity of Azadirachta indica (neem) and Salvadora persica (miswak) extracts as endodontic irrigants. *ENDO EPT.* 2019;13(3):237–245. Disponible en: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:246824655>
17. Nayak A, Sowmya B, Gandla H, Kottrashetti V, Ingalagi P, Srinivas V. Determination and comparison of antimicrobial activity of aqueous and ethanolic extracts of Amorphophallus paeoniifolius on periodontal pathogens: An in vitro study. *J Indian Soc Periodontol [Internet].* 2023;27(1):40-44. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36873972/>
18. Alarcón M. Eficacia del extracto hidroalcohólico de coca, de la sangre de grado y del gluconato de clorhexidina en el diámetro del halo inhibitorio de las cepas certificadas de porphyromonas gingivalis en el laboratorio de microbiología UCSM 2017. Universidad

Católica de Santa María; 2022. Disponible en:
<https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/12004>

19. Abullais S, Abdullah A, Ahmad I, Arora S, Mohammed A, Ahmed J, Nisar N. Synergistic antibacterial activity of herbal extracts with antibiotics on bacteria responsible for periodontitis. *J Infect Dev Ctries.* 2021; 15(11):1685-1693. Disponible en:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34898497/>
20. Stigler P. Estudio in vitro del efecto antibacteriano del extracto etanólico del Equisetum giganteum L. (cola de caballo) frente a cepas de Porphyromona gingivalis. [Tesis para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista]. Lima: Universidad Alas Peruanas; 2021. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12990/9411>
21. Neira V. Comparación de actividad antibacteriana del aceite esencial Schinus Molle L. (Molle) y Thymus Vulgaris (Tomillo) con el Gluconato de Clorhexidina al 0.12% frente a Porphyromona Gingivalis. Estudio in vitro. [Tesis para optar el título de Cirujano Dentista]. Lima: Universidad Norbert Wiener; 2019. 106 p. Disponible en:
<https://hdl.handle.net/20.500.13053/2777>

22. Pardo K, Pareja M, Jurado B, Guillen A, Meneses L, Romero A. Actividad antimicrobiana, in vitro, del extracto etanólico de Camu camu (*Myrciaria dubia*) contra microorganismos bucales. *Diagnostico* [Internet]. 2019;58(1):23-8. Disponible en: <https://doi.org/10.33734/diagnostico.v58i1.30>
23. BinShabaib M, ALHarthi S, Helaby B, Al Hefdhi M, Mohamed A, Abed K. Comparison of the Anti-bacterial Efficacy of *Saussurea costus* and *Melaleuca alternifolia* Against *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans*, and *Enterococcus faecalis*: An in-vitro Study. *Front. Oral. Health.* 2022; 3(950840): 1- 5. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/froh.2022.950840/full>
24. Chaitanya N, Chikte D, Ramya K, Yadav S, Pravallika C, Vardhini S, et al. Antifungal efficacy of different extracts of neem and turmeric on candida species – An in vitro analysis. *Indian J Dent Sci.* 2022;14: 53-7. Disponible en: https://journals.lww.com/ijds/fulltext/2022/14020/antifungal_efficacy_of_different_extra_c_t_s_of_neem.1.aspx
25. Abu H, Al-Otaibi T, Alojayri G, Al-Shaebi E, Dkhil M, Elkhadragey M, et al. In vitro studies for the antiparasitic activities of *Azadirachta indica* extract. *Food Sci Technol* [Internet]. 2023;43: e117122. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/fst.117122>
26. Tasanarong P, Patntirapong S, Aupaphong V. The inhibitory effect of a novel neem pastes against cariogenic bacteria. *J Clin Exp Dent* [Internet]. 2021;13(11): e1083-8. Disponible en: <https://doi.org/10.4317/jced.58781>
27. Zihadi M, Rahman M, Talukder S, Hasan M, Nahar S, Sikder M. Antibacterial efficacy of ethanolic extract of *Camellia sinensis* and *Azadirachta indica* leaves on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *J Adv Vet Anim Res* [Internet]. 2019; 6(2):247–52. Disponible en: <http://doi.org/10.5455/javar.2019.f340>

28. Kwon T, Lamster IB, Levin L. Current Concepts in the Management of Periodontitis. *Int Dent J*. 2021;462- 476. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34839889/>
29. Di Stefano M, Polizzi A, Santonocito S, Romano A, Lombardi T, Isola G. Impact of Oral Microbiome in Periodontal Health and Periodontitis: A Critical Review on Prevention and Treatment. *Int J Mol Sci*. 2022 May 5;23(9):5142. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ijms23095142>
30. Cárdenas P, Guzmán D, Valera E, Cuevas J, Zambrano G, García A. Principales Criterios de Diagnóstico de la Nueva Clasificación de Enfermedades y Condiciones Periodontales. *Int, J, Odontostomat*. 2021; 15(1): 175-180. Disponible en: <https://www.scielo.cl/pdf/ijodontos/v15n1/0718-381X-ijodontos-15-01-175.pdf>
31. Holmstrup P, Bunæs D, Gürsoy M, Lundberg P. Den nye klassifikation af parodontitis. Hvordan klassifikationen anvendes i daglig klinisk praksis. *Tandlaegebladet [Internet]*. 2022; 126 (2): 118–28. Disponible en: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=ddh&AN=155408614&lang=es&site=ehost-live>
32. Gasner NS, Schure RS. *Periodontal Disease*. 2023 Apr 10. StatPearls Publishing; 2024 Jan. disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554590/>
33. Holtfreter B, Kuhr B, Borof K, Tonetti M, Sanz M, Kornman K, et al. ACES: A new framework for the application of the 2018 periodontal status classification scheme to epidemiological survey data. *J. Clin. Periodontol*. 2024; 51: 512–521. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/jcpe.13965>
34. Ndjidda W, Thiam D, Mbow NL, Samb A, Guirassy ML, Moustapha D, et al. New classification of periodontal diseases (NCPD): an application in a sub-Saharan country. *BDJ Open*. 2021; 7:16. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41405-021-00071-8>

35. Sanz M, Herrera D, Kebschull M, Chapple I, Jepsen S, Berglundh T, et al. Treatment of stage I-III periodontitis-The EFP S3 level clinical practice guideline. *J. Clin. Periodontol.* 2020; 47(22):4–60. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/jcpe.13290>
36. West N, Chapple I, Claydon N, D'Aiuto F, Donos N, Ide M, et al. BSP implementation of European S3 - level evidence-based treatment guidelines for stage I-III periodontitis in UK clinical practice. *J Dent.* 2021; 106:103562. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2020.103562>
37. Herrera D, Sanz M, Kebschull M, Jepsen S, Sculean A, Berglundh T, et al. Treatment of stage IV periodontitis: The EFP S3 level clinical practice guideline. *J Clin Periodontol.* 2022;49 (24):4-71. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/jcpe.13639>
38. Suzuki Y, Kikuchi T, Goto H, Takayanagi Y, Kawamura S, Sawada N, et al. Porphyromonas gingivalis Fimbriae Induce Osteoclastogenesis via Toll-like Receptors in RAW264 Cells. *Int J Mol Sci.* 2022;23(23):15293. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36499621/>
39. Xu W, Zhou W, Wang H, Liang S. Roles of Porphyromonas gingivalis and its virulence factors in periodontitis. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2020; 120:45-84. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32085888/>
40. Girano Castaños J, Robello Malatto J. Relación entre obesidad y enfermedad periodontal: revisión de la literatura. *Horiz Med.* 2020;20(3):1081. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1727558X2020000300012&script=sci_abstract
41. Herrera C, Medina C, Pontigo A, Navarrete J, Gonzales B, Gonzáles G, Márquez M. Dysbiosis in the onset and progression of periodontitis: A literature review. *Gac Méd Caracas.* 2023;131(2):381-386. Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/371784368_La_disbiosis_en_la_aparicion_y_proliferacion_de_la_periodontitis_una_revision_de_la_literatura

42. Solís D, Pérez I, García A. Mecanismos inflamatorios en la destrucción periodontal. Rev Odont Mex. 2020;(3):23. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/odon/uo-2019/uo193e.pdf>
43. Teles F, Collman RG, Mominkhan D, Wang, Y. Viruses, periodontitis, and comorbidities. Periodontology 2000. 2022;89(1):190-206. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35244970/>
44. Nikniaz S, Vaziri F, Mansour R. Impact of resveratrol supplementation on clinical parameters and inflammatory markers in patients with chronic periodontitis: a randomized clinical trial. BMC Oral Health [Internet]. 2023; 23:177. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12903-023-02877-4>.
45. Britos R, Sin S, Ortega M. Porphyromonas gingivalis in gingival fluid from type 2 diabetic patients, and its relationship with glycemic control. Revista ADM [Internet]. 2022;79(2):85–91. Disponible en: <https://doi.org/10.35366/104743>
46. Gains A, Lambert D, Stafford G. Identification of a Czc-like operon of the periodontal pathobiont P. gingivalis involved in metal ion efflux. Anaerobe [Internet]. 2023;80(102696):1–8. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2023.102696>
47. Ahmadi P, Mahmoudi M, Kheder RK, Faraj T, Mollazadeh S, Abdulabbas H, et al. Impacts of Porphyromonas gingivalis periodontitis on rheumatoid arthritis autoimmunity. Int Immunopharmacol [Internet]. 2023;118(109936):1.9. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.109936>
48. Abdulkareem, AA, Al-Taweel, FB, Al-Sharqi, AJB, Gul, SS, Sha, A., y Chapple, ILC. Conceptos actuales sobre la patogenia de la periodontitis: de la simbiosis a la disbiosis. J.

Oral Microbiol. 2023; 15 (1): 2197779. Disponible en:
<https://doi.org/10.1080/20002297.2023.2197779>

49. Lenartova M, Tesinska B, Janatova T, Hrebicek O, Mysak J, Janata J, et al. The Oral Microbiome in Periodontal Health. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021; 11: 629723. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.629723>
50. Benahmed AG, Mujawdiya KP, Noor S, Gasmi A. The Oral Microbiome in Periodontal Healtment of Periodontitis: Impact on Dysbiosis and Inflammation. *Arch Razi Inst.* 2022;77(5):1539-1551. Disponible en: <https://doi.org/10.22092/ari.2021.356596.1875>
51. Xu W, Zhou W, Wang H, Liang S. Chapter Two - Roles of Porphyromonas gingivalis and its virulence factors in periodontitis. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2020; 120:45-84. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.12.001>
52. Hajishengallis G, Diaz PI. Porphyromonas gingivalis: Immune subversion activities and role in periodontal dysbiosis. *Curr Oral Health Rep.* 2020;7(1):12-21. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s40496-020-00249-3>
53. Perioexpertise [Internet].2023. Disponible en: <https://www.perioexpertise.es/>
54. Fernández A, Guevara S, Henckell C. Oral antisépticos: chlorhexidine, fluor and triclosán. *Rev. Salud & Vida Sipanense [Internet].* 2019; 6(2): 4-14. Disponible en: <https://revistas.uss.edu.pe/index.php/SVS/article/view/1209/1802>
55. Baena ES, Piloni J, Rangel E, Gómez CA, Sánchez M, Madrigal EO, et al. Comparison of the Antibacterial Activity and Effect on Membrane Permeability of Hibiscus Acid and a Commercial Chlorhexidine Mouthrinse Against Pathogenic Oral Bacteria and Determination of Hibiscus Acid Toxicity. *J Med Food.* 2022;25(3):324-328. Disponible en: <https://doi.org/10.1089/jmf.2020.0207>

56. Poppolo F, Ouanounou A. Chlorhexidine in Dentistry: Pharmacology, Uses, and Adverse Effects. *Int Dent J.* 2022;72(3):269-277. Disponible en:

<https://doi.org/10.1016/j.identj.2022.01.005>

57. Karnik S, Shah N. Comparative evaluation of the efficacy of curcumin mouthwash with chlorhexidine mouthwash, as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of stage II and stage III Grade B Periodontitis – A randomized controlled trial *JIDA.* 2023;

XVII; 19-25. Disponible en: <https://doi.org/10.33882/jida.15.32XXX>

58. Chandki R, Nikhil V, Kalyan SS. Comparative evaluation of substantivity of two biguanides - 0.2% polyhexanide and 2% chlorhexidine on human dentin. *J Conserv Dent* 2020; 23: 46-50. Disponible en: https://doi.org/10.4103/JCD.JCD_256_19.
59. Verma T, Grover N, Malhotra S. Various applications of chlorhexidine as an antimicrobial agent in dentistry: A review. *International Dental Journal of Students' Research* [Internet]. 2023 ;11(2): 50–3. Disponible en: <https://doi.org/10.18231/j.idjsr.2023.011>
60. Mahboub F, Nourizadeh A, Izadpanah A. The Comparison of Color Stability of Aloe Vera Gel and Chlorhexidine Solution on Acrylic Teeth. *International Journal of Dentistry* [Internet]. 2022:1–6. Disponible en: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=ddh&AN=159859248&lang=es&site=ehost-live>
61. Mao X, Auer D, Buchalla W, Hiller K-A, Maisch T, Hellwig E, et al. Cetylpyridinium chloride: mechanism of action, antimicrobial efficacy in biofilms, and potential risks of resistance. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2020; 64(8):1-14. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/AAC.00576-20>
62. Farias S, Toledo J, Faveri M, Figueiredo L, Silva G, Feres M, et al. In Vitro Antimicrobial Effect of Cetylpyridinium Chloride on Complex Multispecies Subgingival Biofilm. *Brazilian Dental Journal* [Internet].2020;31(2):103-108. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-6440202002630>
63. Oo MMT, Oo PH, Saddki N. Efficacy of 0.05% cetylpyridinium chloride mouthwash as an adjunct to toothbrushing compared with 0.12% chlorhexidine gluconate mouthwash in reducing dental plaque and gingival inflammation: A randomized control trial. *Int J Dent*

- Hygiene [Internet]. 2023;21(1):195–202. Disponible en:
<https://doi.org/10.1111/idh.12614>
64. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la Investigación [Internet]. 6th ed. McGraw-Hill; 2014. 634 p. Disponible en: <https://www.ptonline.com/articles/how-to-get-better-mfi-results>
65. Firdaus F, Zufadilla Z, Caniago F. Reaserch methodology: types in the new perspective. MANAZHIM [Internet]. 2021;3(1):1–16. Disponible en:
<https://doi.org/10.36088/manazhim.v3i1.903>
66. Romero U, Real J, Ordoñez J, Gavino G, Saldarriaga G. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN [Internet]. 1ª ed. Ecuador: Edicumbre; 2022. [citado 5 de julio 2023]. 257 p. Disponible en:
https://www.acvenisproh.com/libros/index.php/Libros_categoria_Academico/article/view/22
67. Corona L, Fonseca M. Acerca del carácter retrospectivo o prospectivo en la investigación científica. Medisur [Internet]. 2021; 19(2): 338 p. Disponible en:
<http://medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/view/4501>

ANEXO

Anexo N° 1: Matriz de consistencia

Título “ACCIÓN ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Azadirachta indica* (NEEM) EN COMPARACIÓN CON EL GLUCONATO DE CLORHEXIDINA AL 0.12% CON CLORURO DE CETILPIRIDINIO 0,05% FRENTE A LAS CEPAS DE *Porphyromonas gingivalis*. ESTUDIO *IN VITRO*. LIMA. 2023”

Formulación del problema	Objetivos	Hipótesis	Variables	Diseño metodológico
<p>Problema general ¿Existe diferencia en la acción antibacteriana <i>in vitro</i> entre el extracto etanólico del <i>Azadirachta indica</i> (Neem) comparado con el gluconato de clorhexidina al 0,12% con cloruro de cetilpiridinio al 0,05% sobre las cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i>, Lima- 2023?</p> <p>Problemas específicos</p> <p>¿Cuál es la acción antibacteriana <i>in vitro</i> del extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> (Neem) al 25% sobre las cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i>, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas?</p> <p>¿Cuál es la acción antibacteriana <i>in vitro</i> del extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> (Neem) al 75% sobre las cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i>, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas?</p> <p>¿Cuál es la acción antibacteriana <i>in vitro</i> del extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> (Neem) al 100% sobre las cepas de <i>Porphyromonas</i></p>	<p>Objetivo general Evaluar la diferencia en la acción antibacteriana <i>in vitro</i> entre el extracto etanólico del <i>Azadirachta indica</i> (Neem) comparado con el gluconato de clorhexidina al 0,12% con CPC al 0,05% sobre las cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i>. Lima- 2023.</p> <p>Objetivos específicos</p> <p>Determinar la acción antibacteriana <i>in vitro</i> del extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> (Neem) al 25% sobre las cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i>, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.</p> <p>Determinar la acción antibacteriana <i>in vitro</i> del extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> (Neem) al 75% sobre las cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i>, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.</p> <p>Determinar la acción antibacteriana <i>in vitro</i> del extracto etanólico de</p>	<p>Hipótesis general</p> <p>Hi: El extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> (Neem) tiene mayor acción antibacteriana <i>in vitro</i> comparado con el gluconato de Clorhexidina al 0,12% con cloruro de cetilpiridinio 0,05% sobre las cepas de <i>Porphyromonas Gingivalis</i>, Lima. 2023</p> <p>Ho: El extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> (Neem) no tiene mayor acción antibacteriana <i>in vitro</i> comparado con el gluconato de Clorhexidina al 0,12% con cloruro de cetilpiridinio 0,05% sobre las cepas de <i>Porphyromonas Gingivalis</i>, Lima. 2023</p> <p>Hipótesis específicas</p> <p>Hi¹: Existe acción antibacteriana <i>in vitro</i> del extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> (Neem) al 25% sobre las cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i>, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.</p>	<p>Variable independiente: Extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i>.</p> <p>Gluconato de clorhexidina con cloruro de cetilpiridinio.</p> <p>Variable dependiente: Acción antibacteriana</p> <p>Variable interviniente:</p>	<p>Tipo de investigación Aplicada.</p> <p>Método de investigación Hipotético – deductivo</p> <p>Enfoque de la investigación Cuantitativo</p> <p>Diseño de la investigación Experimental <i>in vitro</i>, transversal y longitudinal.</p> <p>Población Placas agar con cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i></p> <p>Muestra Constituida por 15 réplicas de cada una de las cinco sustancias de prueba para</p>

<p><i>gingivalis</i>, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas?</p> <p>¿Cuál es la acción antibacteriana <i>in vitro</i> del gluconato de clorhexidina al 0,12% con cloruro de Cetilpiridinio 0,05% sobre las cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i>, Lima- 2023 dentro las 24, 48 y 72 horas?</p> <p>¿Cuál es la acción antibacteriana <i>in vitro</i> del extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> (Neem) al 25%, 75% y 100% comparado con el gluconato de clorhexidina al 0,12% con cloruro de cetilpiridinio al 0,05% sobre las cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i>, Lima- 2023 dentro las 24, 48 y 72 horas?</p>	<p><i>Azadirachta indica</i> (Neem) al 100% sobre las cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i>, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.</p> <p>Determinar la acción antibacteriana <i>in vitro</i> del gluconato de clorhexidina al 0,12% con cloruro de Cetilpiridinio 0,05% sobre las cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i>, estudio <i>in vitro</i>, Lima- 2023 dentro las 24, 48 y 72 horas.</p> <p>Determinar la acción antibacteriana <i>in vitro</i> del extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> (Neem) al 25%, 75% y 100% comparado con el gluconato de clorhexidina al 0,12% con cloruro de cetilpiridinio al 0,05% frente las cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i>, - estudio <i>in vitro</i>, Lima- 2023 dentro las 24, 48 y 72 horas.</p>	<p>Ho: No existe acción antibacteriana <i>in vitro</i> del extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> (Neem) al 25% sobre las cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i>, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.</p> <p>Hi²: Existe acción antibacteriana <i>in vitro</i> del extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> (Neem) al 75% sobre las cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i>, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.</p> <p>Ho: No existe acción antibacteriana <i>in vitro</i> del extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> (Neem) al 75% sobre las cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i>, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.</p> <p>Hi³: Existe acción antibacteriana <i>in vitro</i> del extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> (Neem) al 100% sobre las cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i>, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.</p> <p>Ho: No existe acción antibacteriana <i>in vitro</i> del extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> (Neem) al 100% sobre las cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i>, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.</p> <p>Hi⁴: Existe acción antibacteriana <i>in vitro</i> del gluconato de clorhexidina al 0,12% con cloruro de cetilpiridinio 0,05% sobre las cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i>, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.</p> <p>Ho: No existe acción antibacteriana <i>in vitro</i> del gluconato de clorhexidina al</p>	<p>Tiempo</p>	<p>la efectividad antimicrobiana frente a <i>Porphyromonas gingivalis</i> (ATCC 33277) con un total de 75 réplicas.</p>
---	--	--	---------------	---

		<p>0,12% con cloruro de cetilpiridinio 0,05% sobre las cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i>, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.</p> <p>Hi⁵: Existe acción antibacteriana <i>in vitro</i> del extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> (Neem) al 25%, 75% y 100% comparado con el gluconato de clorhexidina al 0,12% con cloruro de cetilpiridinio 0,05% sobre las cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i>, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.</p> <p>Ho: No existe acción antibacteriana <i>in vitro</i> del extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> (Neem) al 25%, 75% y 100% comparado con el gluconato de clorhexidina al 0,12% con cloruro de cetilpiridinio 0,05% sobre las cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i>, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.</p>		
--	--	---	--	--

Anexo N° 2: Instrumento

Medición de halos de inhibición de las sustancias de prueba frente a <i>Porphyromonas gingivalis</i> a las 24 horas					
N° Replica	Gluconato de clorhexidina al 0.12% con Cloruro de cetilpiridinio 0,05% (control +)	Azadirachta indica al 25%.	Azadirachta indica al 75%.	Azadirachta indica al 100%.	Suero fisiológico al 0,9% (control -)
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					

**Medición de halos de inhibición de las sustancias de prueba frente a
Porphyromonas gingivalis a las 48 horas**

Nº Replica	Gluconato de clorhexidina al 0.12% con Cloruro de cetilpiridinio 0,05% (control +)	Azadirachta indica al 25%.	Azadirachta indica al 75%.	Azadirachta indica al 100%.	Suero fisiológico al 0,9% (Control -)
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					

**Medición de halos de inhibición de las sustancias de prueba frente a
Porphyromonas gingivalis a las 72 horas**

Nº Replica	Gluconato de clorhexidina al 0.12% con Cloruro de cetilpiridinio 0,05% (control +)	Azadirachta indica al 25%.	Azadirachta indica al 75%.	Azadirachta indica al 100%.	Suero fisiológico al 0,9% (Control -)
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					

Anexo N° 3: Certificados de validez del instrumento

VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO



VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO

I. DATOS GENERALES

- 1.1 Apellidos y Nombres del Experto: Mg. Esp. Marroquín García Lorenzo Enrique
 1.2 Cargo e Institución donde labora: Docente de la UPNW.
 1.3 Nombre del Instrumento motivo de evaluación: Ficha de recolección de datos.
 1.4 Autor(es) del Instrumento: Viviangelli Vanessa Rosas Benites.
 1.5 Título de la Investigación: "Acción antibacteriana del extracto etanólico de Azadirachta indica (Neem) en comparación con el gluconato de clorhexidina al 0.12% con cloruro de cetilpiridinio 0,05% frente a las cepas de *Porphyromona Gingivalis*. Estudio in vitro. Lima. 2023"

II. ASPECTO DE LA VALIDACIÓN

	CRITERIOS	Deficiente 1	Baja 2	Regular 3	Buena 4	Muy buena 5
1. CLARIDAD	Está formulado con lenguaje apropiado.				X	
2. OBJETIVIDAD	Está expresado en conductas observables.				X	
3. ACTUALIDAD	Adecuado al avance de la ciencia y tecnología				X	
4. ORGANIZACIÓN	Existe una organización lógica.				X	
5. SUFICIENCIA	Comprende los aspectos de cantidad y calidad en sus ítems.				X	
6. INTENCIONALIDAD	Adecuado para valorar aspectos del desarrollo de capacidades cognitivas.				X	
7. CONSISTENCIA	Alineado a los objetivos de la investigación y metodología.				X	
8. COHERENCIA	Entre los índices, indicadores y las dimensiones.				X	
9. METODOLOGÍA	La estrategia responde al propósito del estudio				X	
10. PERTINENCIA	El instrumento es adecuado al tipo de Investigación.				X	
CONTEO TOTAL DE MARCAS (realice el conteo en cada una de las categorías de la escala)					10	
		A	B	C	D	E

$$\text{Coeficiente de Validez} = \frac{(1 \times A) + (2 \times B) + (3 \times C) + (4 \times D) + (5 \times E)}{50} = \frac{4(10)}{50} = 0.8$$

III. CALIFICACIÓN GLOBAL (Ubique el coeficiente de validez obtenido en el intervalo respectivo y marque con un aspa en el círculo asociado)

Categoría	Intervalo
Desaprobado <input type="radio"/>	[0,00 – 0,60]
Observado <input type="radio"/>	<0,60 – 0,70]
Aprobado <input checked="" type="radio"/>	<0,70 – 1,00]

IV. OPINIÓN DE APLICABILIDAD: Aplicable

24 de julio del 2023

Firma y sello

VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO

I. DATOS GENERALES




- 1.1 Apellidos y Nombres del Experto: Dr. CD. Raúl Rojas Ortega
 1.2 Cargo e Institución donde labora: Docente de la Universidad Norbert Wiener
 1.3 Nombre del Instrumento motivo de evaluación: Ficha de recolección de datos
 1.4 Autor del Instrumento: Viviangelli Vanessa Rosas Benites
 1.5 Título de la Investigación: Acción antibacteriana del extracto etanólico de Azadirachta indica (NEEM) en comparación con el Gluconato de Clorhexidina al 0.12% con cloruro de Cetilpiridino 0.05% frente a las Ceps de Porphyromonas gingivalis. Estudio in vitro.Lima.2023

II. ASPECTO DE LA VALIDACIÓN

	CRITERIOS	Deficiente 1	Baja 2	Regular 3	Buena 4	Muy buena 5
1. CLARIDAD	Está formulado con lenguaje apropiado.					x
2. OBJETIVIDAD	Está expresado en conductas observables.					x
3. ACTUALIDAD	Adecuado al avance de la ciencia y tecnología					x
4. ORGANIZACIÓN	Existe una organización lógica.				x	
5. SUFICIENCIA	Comprende los aspectos de cantidad y calidad en sus ítems.				x	
6. INTENCIONALIDAD	Adecuado para valorar aspectos del desarrollo de capacidades cognitivas.					x
7. CONSISTENCIA	Alineado a los objetivos de la investigación y metodología.					x
8. COHERENCIA	Entre los índices, indicadores y las dimensiones.					x
9. METODOLOGÍA	La estrategia responde al propósito del estudio					x
10. PERTINENCIA	El instrumento es adecuado al tipo de investigación.					x
CONTEO TOTAL DE MARCAS (realice el conteo en cada una de las categorías de la escala)						
		A	B	C	D	E

$$\text{Coeficiente de Validez} = \frac{(1 \times A) + (2 \times B) + (3 \times C) + (4 \times D) + (5 \times E)}{50} = \frac{48}{50} = 0,96$$

- III. CALIFICACIÓN GLOBAL (Ubique el coeficiente de validez obtenido en el intervalo respectivo y marque con un aspa en el círculo asociado)

Categoría	Intervalo
Desaprobado 	[0,00 – 0,60]
Observado 	<0,60 – 0,70]
Aprobado 	<0,70 – 1,00]

IV. OPINIÓN DE APLICABILIDAD:

Instrumento aplicable

25 de Julio del 2023



Firma y sello
 COP: 14946
 DNI: 07761772

VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO

I. DATOS GENERALES

- 1.1 Apellidos y Nombres del Experto: Mg. CD. Edwin R. Chumpitaz Jauregui
 1.2 Cargo e Institución donde labora: Docente de la UPNW.
 1.3 Nombre del Instrumento motivo de evaluación: Ficha de recolección de datos.
 1.4 Autor(es) del Instrumento: Viviangelli Vanessa Rosas Benites.
 1.5 Título de la Investigación: "Acción antibacteriana del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) en comparación con el gluconato de clorhexidina al 0.12% con cloruro de cetilpiridinio 0,05% frente a las cepas de *Porphyromona Gingivalis*. Estudio in vitro. Lima. 2023"

II. ASPECTO DE LA VALIDACIÓN

	CRITERIOS	Deficiente 1	Baja 2	Regular 3	Buena 4	Muy buena 5
1. CLARIDAD	Está formulado con lenguaje apropiado.					X
2. OBJETIVIDAD	Está expresado en conductas observables.					X
3. ACTUALIDAD	Adecuado al avance de la ciencia y tecnología				X	
4. ORGANIZACIÓN	Existe una organización lógica.				X	
5. SUFICIENCIA	Comprende los aspectos de cantidad y calidad en sus ítems.					X
6. INTENCIONALIDAD	Adecuado para valorar aspectos del desarrollo de capacidades cognitivas.				X	
7. CONSISTENCIA	Alineado a los objetivos de la investigación y metodología.					X
8. COHERENCIA	Entre los índices, indicadores y las dimensiones.					X
9. METODOLOGÍA	La estrategia responde al propósito del estudio					X
10. PERTINENCIA	El instrumento es adecuado al tipo de Investigación.				X	
CONTEO TOTAL DE MARCAS (realice el conteo en cada una de las categorías de la escala)						
		A	B	C	D	E

$$\text{Coeficiente de Validez} = \frac{(1 \times A) + (2 \times B) + (3 \times C) + (4 \times D) + (5 \times E)}{50} = \frac{4(4) + 5(6)}{50} = 9.2$$

III. CALIFICACIÓN GLOBAL (Ubique el coeficiente de validez obtenido en el intervalo respectivo y marque con un aspa en el círculo asociado)

Categoría	Intervalo
Desaprobado <input type="radio"/>	[0,00 – 0,60]
Observado <input type="radio"/>	<0,60 – 0,70]
Aprobado <input checked="" type="radio"/>	<0,70 – 1,00]

IV. OPINIÓN DE APLICABILIDAD:

24 de julio del 2023



Mg. Edwin R. Chumpitaz Jauregui
 Catedrático de Física en
 UNPW

Firma y sello

Anexo N° 4: Constancia de exoneración de revisión



COMITÉ INSTITUCIONAL DE ÉTICA PARA LA INVESTIGACIÓN

CONSTANCIA DE EXONERACIÓN DE REVISIÓN

Lima, 17 de setiembre de 2023

Investigador(a)
Viviangelli Vanessa Rosas Benites
Exp. N°: 0961-2023

De mi consideración:

Es grato expresarle mi cordial saludo y a la vez informarle que el Comité Institucional de Ética para la investigación de la Universidad Privada Norbert Wiener (CIEI-UPNW) acuerda la **Exoneración de revisión** del siguiente protocolo de estudio:

- Protocolo titulado: **“ACCIÓN ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE AZADIRACHITA INDICA (NEEM) EN COMPARACIÓN CON EL GLUCONATO DE CLORHEXIDINA AL 0.12% CON CLORURO DE CETILPIRIDINIO 0,05% FRENTE A LAS CEPAS DE PORPHYROMONAS GINGIVALIS. ESTUDIO IN VITRO. LIMA. 2023”**
Versión 01 con fecha 23/08/2023.

El cual tiene como investigador principal al Sr(a) Viviangelli Vanessa Rosas Benites

Es cuanto informo a usted para su conocimiento y fines pertinentes.

Atentamente,



Yenny Marisol Bellido Fuentes
Presidenta del CIEI- UPNW

Avenida Arequipa 440
Universidad Privada Norbert Wiener
Teléfono: 706-5555 anexo 3286-3287 Cel. 981000698
Correo: comite.etica@unwienner.edu.pe

Anexo N° 5: Informe de resultados



INFORME DE ENSAYO N° SQ231020.01

SOLICITUD DE ENSAYO	: SQE 231006.01
SOLICITANTE	: VIVIANGELLI VANESSA ROSAS BENITES
DIRECCIÓN DEL SOLICITANTE	: No indica
PROCEDENCIA DE LA MUESTRA	: Proporcionado por el laboratorio Scientific Quality S.A.C.
PROCEDIMIENTO DE MUESTREO	: No aplica
IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA	: M1: Gluconato de clorhexidina al 0,12% y CPC 0,05% ⁽¹⁾
	: M2: Extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> al 25% ⁽²⁾
	: M3: Extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> al 75% ⁽²⁾
	: M4: Extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> al 100% ⁽²⁾
	: M5: Suero fisiológico al 0,9% ⁽³⁾
CANTIDAD Y DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	: M1: Un (01) frasco de 150mL
	: M2: Un (01) frasco de 20mL
	: M3: Un (01) frasco de 20mL
	: M4: Un (01) frasco de 20mL
	: M5: Un (01) frasco de 100mL
LUGAR, FECHA Y HORA DE MUESTREO	: No aplica
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN	: 06 de octubre del 2023/ 10:30h
CONDICIONES A LA RECEPCIÓN	: Temperatura ambiente
FECHAS DE INICIO DEL ANÁLISIS	: 06 de octubre del 2023
FECHAS DE TÉRMINO DEL ANÁLISIS	: 19 de octubre del 2023
FECHAS DE EMISIÓN	: 20 de octubre del 2023

RESULTADOS DE ENSAYO MICROBIOLÓGICO: ANTIBIOGRAMA



N° Réplica en placa Petri	Halo de inhibición de las sustancias de prueba frente a <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 en milímetros (mm) a las 24 horas en agar Schaedler enriquecido				
	M1: Gluconato de clorhexidina al 0,12% y CPC 0,05%	M2: Extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> al 25%	M3: Extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> al 75%	M4: Extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> al 100%	M5: Suero fisiológico al 0,9%
1	18,94	0,00	7,01	14,40	0,00
2	19,34	0,00	8,50	12,12	0,00
3	17,66	0,00	7,86	10,44	0,00
4	16,14	0,00	8,10	11,38	0,00
5	11,67	0,00	9,68	10,30	0,00
6	12,50	0,00	11,45	9,54	0,00
7	19,70	0,00	9,28	11,25	0,00
8	11,35	0,00	8,29	10,58	0,00
9	10,05	0,00	8,15	11,55	0,00
10	15,75	0,00	9,69	11,91	0,00
11	10,10	0,00	10,03	11,48	0,00
12	9,95	0,00	9,25	11,79	0,00
13	10,24	0,00	9,81	8,64	0,00
14	13,51	0,00	9,95	11,40	0,00
15	17,96	0,00	10,82	13,46	0,00

Los resultados de los ensayos corresponden solo a las muestras ensayadas. Los resultados no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Queda prohibida la reproducción parcial o total del presente informe, sin la autorización escrita por SCIENTIFIC QUALITY S.A.C. La alteración o uso indebido del presente informe constituye un delito contra la fe pública y se regirá por las disposiciones penales y civiles en la materia.

Anexo N° 5: Informe de resultados



INFORME DE ENSAYO N° SQ231020.01

N° Replicación en placa Petri	Halo de inhibición de las sustancias de prueba frente a <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 en milímetros (mm) a las 48 horas en agar Schaedler enriquecido				
	M1: Gluconato de clorhexidina al 0,12% y CPC 0,05%	M2: Extracto estándar de Azadirachta indica al 25%	M3: Extracto estándar de Azadirachta indica al 75%	M4: Extracto estándar de Azadirachta indica al 100%	M5: Suero fisiológico al 0,9%
1	18,78	0,00	6,90	14,31	0,00
2	19,43	0,00	8,39	12,01	0,00
3	17,51	0,00	7,75	10,35	0,00
4	16,04	0,00	7,99	11,29	0,00
5	11,55	0,00	9,56	10,21	0,00
6	12,35	0,00	11,34	9,84	0,00
7	19,59	0,00	9,16	11,18	0,00
8	11,24	0,00	8,18	10,47	0,00
9	9,96	0,00	8,05	11,46	0,00
10	15,61	0,00	9,58	11,79	0,00
11	9,97	0,00	9,91	11,37	0,00
12	9,88	0,00	9,16	11,67	0,00
13	10,13	0,00	9,72	8,51	0,00
14	13,40	0,00	9,86	11,26	0,00
15	17,81	0,00	10,69	13,32	0,00



N° Replicación en placa Petri	Halo de inhibición de las sustancias de prueba frente a <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 en milímetros (mm) a las 72 horas en agar Schaedler enriquecido				
	M1: Gluconato de clorhexidina al 0,12% y CPC 0,05%	M2: Extracto estándar de Azadirachta indica al 25%	M3: Extracto estándar de Azadirachta indica al 75%	M4: Extracto estándar de Azadirachta indica al 100%	M5: Suero fisiológico al 0,9%
1	18,66	0,00	6,79	14,16	0,00
2	19,32	0,00	8,28	11,96	0,00
3	17,41	0,00	7,62	10,27	0,00
4	15,95	0,00	7,86	11,18	0,00
5	11,46	0,00	9,44	10,10	0,00
6	12,22	0,00	11,25	9,70	0,00
7	19,47	0,00	9,05	11,03	0,00
8	11,13	0,00	8,06	10,36	0,00
9	9,85	0,00	7,94	11,32	0,00
10	15,52	0,00	9,47	11,68	0,00
11	9,86	0,00	9,83	11,26	0,00
12	9,79	0,00	9,05	11,55	0,00
13	10,01	0,00	9,61	8,40	0,00
14	13,28	0,00	9,75	11,14	0,00
15	17,69	0,00	10,55	13,20	0,00

Los resultados de los ensayos corresponden sólo a las muestras ensayadas. Los resultados no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Queda prohibida la reproducción parcial o total del presente informe, en la autorización escrita por SCIENTIFIC QUALITY S.A.C. La actualización o uso indebido del presente informe constituye un delito contra la fe pública y se regirá por las disposiciones penales y civiles en la materia.

Anexo N° 5: Informe de resultados



INFORME DE ENSAYO N° SQ231020.01

MÉTODOS DE ENSAYO	
ENSAYOS	REFERENCIA
ANTIBIOGRAMA	SQ-100. TÉCNICA DE DIFUSIÓN EN AGAR EN PLACAS. ⁽¹⁾

OBSERVACIONES:

- (1) Marca: "Perlo Aid - Intensiva cara". F.V.09/2025
- (2) Se preparó según el Procedimiento de elaboración del extracto etanólico de *Azadirachta indica* N° SQ 001.09-2023. Fecha de preparación: 01-09-2023.
- (3) Se preparó en el laboratorio Scientific Quality S.A.C. según sus procedimientos.
- (4) Basado en artículo de Escalante M. (2016) Sensibilidad de *Listeria monocytogenes* y *Listeria ivanovi* frente al aceite esencial de *Cocos nucifera*. REBIOL. 36(1): 38-44. Enero - Junio.



Mibgo, Oniel Elias Juarez Vilcapuma
Gerente de Laboratorio
C.B.P.14090



Scientific Quality

We generate trust

Los resultados de los ensayos corresponden solo a los muestra(s) ensayada(s). Los resultados no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Queda prohibida la reproducción parcial o total del presente informe, sin la autorización escrita por SCIENTIFIC QUALITY S.A.C. La utilización o uso indebido del presente informe constituye un delito contra la fe pública y se regirá por las disposiciones penales y civiles en la materia.

Anexo N° 6: Certificado de bacteria en estudio *Porphyromonas gingivalis*



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<p>SPECIFICATIONS: Product Name: Porphyromonas gingivalis Catalog Number: 0912 Lot Number: 912-78** Reference Number: ATCC® 33277™* Passage from Reference: 3 Expiration Date: 2024/10/31</p>	<p>RELEASE INFORMATION: Quality Control Technologist: Keshia L. Negen Release Date: 2022/12/12</p>
--	---

Performance	
<p>Macroscopic Features: Small, circular, transparent colonies that become brown with age.</p> <p>Microscopic Features: Gram negative rod, pleomorphic bacillary to coccoid forms.</p>	<p>Medium: A/R SBAP</p> <p>Method: Gram Stain (1)</p>
<p>ID System: MALDI-TOF (1)</p>	
<p>See attached ID System results document.</p>	
<div style="text-align: right;">  Amanda Kuperus Director of Quality Control AUTHORIZED SIGNATURE </div>	

**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.



TESTING CERT #2655.01



(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.



REFERENCE MATERIAL PRODUCER
 CERT #2955.02

Anexo N° 6: Certificado de bacteria en estudio *Porphyromonas gingivalis*

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 – 3.00	High-confidence identification	(+++)	Green
1.70 – 1.99	Low-confidence identification	(+)	Yellow
0.00 – 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	Red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	High consistency: The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	Low consistency: The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	No consistency: The requirements for high or low consistency are not met.

Run Creation Date/Time: 2022-12-07T10:55:25.430 MCV

Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
D5 (+++) (A)	912-76	Porphyromonas gingivalis	2.15

Comments:

N/A

Anexo N° 7: Constancia de recolección de datos



CONSTANCIA

Dra. Brenda Vergara Pinto
Directora
E.A.P. Odontología – Universidad Norbert Wiener
Presente.

Estimada Doctora:

Es grato dirigirme a usted para comunicarle que la señorita VIVIANGELLI VANESSA ROSAS BENITES con DNI 73690641, bachiller en Odontología de la E.A.P. que Ud. dirige, realizó las pruebas microbiológicas del estudio experimental *in vitro* titulado: "ACCIÓN ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE AZADIRACHTA INDICA (NEEM) EN COMPARACIÓN CON EL GLUCONATO DE CLORHEXIDINA AL 0.12% CON CLORURO DE CETILPIRIDINIO 0,05% FRENTE A LAS CEPAS DE PORPHYROMONAS GINGIVALIS. ESTUDIO *IN VITRO*. LIMA. 2023". Dicho estudio corresponde a su tesis para obtener el título de Cirujano dentista.

Toda la experimentación y recolección de datos fue realizada entre los días 06 de octubre al 19 de octubre del presente año y fue supervisado en su totalidad por mi persona, cumpliendo con todos los protocolos de bioética, bioseguridad y control de infecciones requeridos.




Sin otro particular.

Atentamente

Lima, 20 de octubre del 2023




Mgto. Oniel Elias Juarez Vilcapuma
Gerente de Laboratorio
C.B.P. 14090

Anexo N° 8: Constancia de eliminación de material de ensayo biocontaminado



CONSTANCIA

La empresa SCIENTIFIC QUALITY S.A.C. hace constar que se ha eliminado adecuadamente los residuos biológicos del trabajo de Tesis "ACCIÓN ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *AZADIRACHTA INDICA* (NEEM) EN COMPARACIÓN CON EL GLUCONATO DE CLORHEXIDINA AL 0.12% CON CLORURO DE CETILPIRIDINIO 0,05% FRENTE A LAS CEPAS DE *PORPHYROMONAS GINGIVALIS*. ESTUDIO *IN VITRO*. LIMA. 2023" como indica nuestro Instructivo de Tratamiento de material contaminado del Laboratorio de microbiología I03-P02-JL, el cual indica que los materiales de ensayo biocontaminados se dividirán en materiales de vidrio y descartables. Ambos serán colocados, por separado, en bolsas de riesgo biológico y se colocarán en la autoclave para su proceso a 121°C por 30 minutos.


Luego del proceso de autoclavado, los materiales de vidrio se lavarán y pasarán controles de calidad para ser reutilizados. Con respecto al material descartable, al haber sido **minimizado, tratado, eliminando el riesgo significativo**; se realiza su **disposición final** como residuo sólido municipal según Ley N° 27314., Ley General de Residuos Sólidos. Título IV. Artículo 27, inciso 2, el cual dice:



"27.2 La prestación de servicios de residuos sólidos por pequeñas y microempresas estará restringida a los residuos del ámbito de la gestión municipal, conforme a las disposiciones reglamentarias que al efecto se dicten para promover su participación".

Lima, 20 de octubre del 2023




Mbg. Oniel Elias Juarez Vilcapuma
Gerente de Laboratorio
C.B.P. 14090

Anexo N° 9: Procedimiento de elaboración del extracto etanólico de *Azadirachta indica*



PROCEDIMIENTO DE ELABORACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Azadirachta indica* N° SQ 001.09-2023

1. Equipos

- Estufa microbiológica
- Refrigeradora
- Balanza digital
- Licuadora

2. Materiales

- 75g de hojas de *Azadirachta indica* (Neem)
- Frasco de vidrio ámbar de 500mL
- Viales de vidrio ámbar de 20mL
- Pinza de acero inoxidable
- Alcohol de 70% y 96%
- Embudo de vidrio de 8mm de diámetro
- Papel de filtración Whatman N° 1, N°2 y N° 41

3. Procedimiento

La metodología de extracción para las hojas de *Azadirachta indica* consistió en lo siguiente.

1. **Selección:** El material vegetal que se utilizó, consistió en hojas de *Azadirachta indica*, que estaban libres de manchas y perforaciones por insectos (1).
2. **Secado.** Las hojas seleccionadas de *Azadirachta indica* fue de forma independiente fueron secadas en estufa a 50 °C (2) durante 8 horas.
3. **Molienda:** Posteriormente se procedió a realizar la molienda del material vegetal seco en una licuadora convencional hasta que se pulverizó todo el material (1).
4. **Pesado.** A partir del polvo obtenido, se pesaron 75 g y se colocó en un frasco de vidrio ámbar de capacidad de 500 mL con tapa para proteger el preparado de luz (2).
5. **Maceración:** Luego se le agregó el solvente extractor que consistió en etanol absoluto (96%) y se procedió a la obtención del extracto etanólico mediante el método de maceración en agitación constante durante dos semanas.
6. **Filtración:** Después de las dos semanas de maceración el producto fue filtrado 3 veces, primero con papel filtro Whatman N° 41, y posteriormente con papel filtro Whatman N° 2 y N° 1 con lo que se obtuvo el extracto filtrado (2).
7. **Secado del filtrado:** Dicho extracto se llevó a sequedad en 40°C por 8 horas, obteniéndose el extracto seco de *Azadirachta indica* el cual fue pesado y colocado en viales de vidrio ámbar de quedando listo para su uso (1)
8. **Preparación de las concentraciones del extracto etanólico de hojas de *Azadirachta indica* (NEEM)**
A partir del extracto seco de *Azadirachta indica* (Neem), se realizaron diluciones en una mezcla hidroalcohólica de etanol al 70% obteniéndose concentraciones 100% (1000mg/ml), 75%



Anexo N° 9: Procedimiento de elaboración del extracto etanólico de *Azadirachta indica*



PROCEDIMIENTO DE ELABORACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Azadirachta indica* N° SQ 001.09-2023

(750mg/ml) Y 25% (250/mL) (2). Cada concentración fue colocada en un vial estéril de color ámbar y tapado herméticamente y se mantuvo en refrigeración (5°C) hasta el momento de su utilización (1).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



1. Briceño G, García J, Maselli A, Rosales L. Efecto de extractos etanólicos de Ruda y Neem sobre el control de bacterias fitopatógenas del género *Erwinia* [Internet]. *Agronomía Trop.* 61(2): 141-148. 2011. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5247199>.
2. Cano W. Efecto del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) sobre la viabilidad in vitro de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 [Tesis para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista]. Lima: Universidad César Vallejo; 2017.



Miguel Oniel Elias Juarez Vilcapuma
Gerente de Laboratorio
C.B.P. 14090

Anexo N° 10: Ficha técnica del estándar de sulfato de bario Mc Farland 0.5



McFARLAND BARIUM SULPHATE STANDARD

Standard di torbidità per la preparazione di sospensioni di microrganismi.
Turbidity standard for preparing suspensions of microorganisms.

DESCRIZIONE

Gli standard McFarland vengono utilizzati come standard di torbidità nella preparazione delle sospensioni di microrganismi ed in particolare modo nella preparazione degli inoculi batterici per l'esecuzione dell'antibiogramma.

PRINCIPIO

Gli standard di torbidità sono composti da sostanze chimiche che miscelate precipitano formando una soluzione di riproducibile torbidità.

Gli standard McFarland vengono preparati aggiungendo acido solforico ad una soluzione acquosa di cloruro di bario.

La miscela porta alla formazione di precipitato di solfato di bario. Per ciascun standard McFarland in tabella 1 è riportata la densità corrispondente espressa in cellule/ml. La concentrazione batterica dipende dalla dimensione dei microrganismi. I valori riportati nella tabella 1 rappresentano valori medi di concentrazioni validi per i batteri. Per i lieviti, che hanno dimensioni maggiori, bisogna dividere gli stessi numeri per 30.

PROCEDURA

Prima dell'uso, agitare vigorosamente lo standard di torbidità, utilizzando un vortice meccanico.

Confrontare la torbidità di una sospensione batterica preparata alla torbidità dello standard, in presenza di una luce adeguata.

Alternativamente, utilizzare lo standard di torbidità per calibrare un turbidimetro elettronometrico.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

L'utilizzo degli standard McFarland consente la preparazione di inoculi standardizzati da utilizzare nelle procedure per l'esecuzione dell'antibiogramma.

DESCRIPTION

McFarland standards are used as turbidity standards in the preparation of suspensions of microorganisms and has particular application in the preparation of bacterial inocula for performing antimicrobial susceptibility testing.

PRINCIPLE

Turbidity standards are prepared by mixing chemicals that precipitate to form a solution of reproducible turbidity.

McFarland standards are prepared by adding sulphuric acid to an aqueous solution of barium chloride, which results in the formation of a suspended barium sulphate precipitate.

For each McFarland standard in table 1 is reported the correspondent density expressed in cells/ml. Bacterial concentration depends on microorganisms size. The mentioned values in table 1 represent average values of concentration valid for bacteria. For yeast, which are larger in size, these numbers should be divided by about 30.

PROCEDURE

Vigorously agitate the turbidity standard on a mechanical vortex mixer just before use.

Using adequate light, compare the turbidity of a bacterial suspension to the turbidity standard.

Alternatively, use the turbidity standard to calibrate a electronic turbidimeter.

RESULTS INTERPRETATION

McFarland standards will enable the preparation of standardized inocula for use in the performance of standardized antimicrobial susceptibility testing procedures.

Tabella / Table 1.

McFarland Standard	Densità (cellule/ml) / Density (cells/ml)
0.5	1.5×10^8
1.0	3.0×10^8
2.0	6.0×10^8
3.0	9.0×10^8
4.0	12.0×10^8

BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAPHY

- McFarland, 1907, J. Am. Med. Assoc. 49:11176.
- Patrick M. Telle, 2004, Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, 11^a Edizione by Mosby, Inc., an affiliate of Elsevier Inc.
- CLM M7-A9, 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically.
- CLM M11-A7, 2007. Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria.

PRESENTAZIONE / PRESENTATION

Prodotto / Product	REF	
McFARLAND 0.5 BARIUM SULPHATE STANDARD	80400	1
McFARLAND 1.0 BARIUM SULPHATE STANDARD	80401	1
McFARLAND 2.0 BARIUM SULPHATE STANDARD	80402	1
McFARLAND 3.0 BARIUM SULPHATE STANDARD	80403	1
McFARLAND 4.0 BARIUM SULPHATE STANDARD	80404	1
McFARLAND STANDARD SET (McFARLAND 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0)	80405	5

TABELLA DEI SIMBOLI / TABLE OF SYMBOLS

LOT Codice del lotto Batch Code		Contenuto sufficiente per <no> saggi Content sufficient for <no> tests		Fabbricatore Manufacturer		Non riutilizzare Do not reuse
REF Numero di catalogo Catalogue Number		Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso Attention, see instructions for use		Fragile, maneggiare con cura Fragile, handle with care		



LIOFILCHEM® S.r.l.

Via Scorta, Zona Ind.le - I-02036, Roseto degli Abruzzi (TR) - ITALY
Tel +39 0852893743 Fax +39 0852931130 Website: www.liofilchem.net E-mail: liofilchem@liofilchem.net

Rev.3/11.01.2014

Anexo N° 11: Informe de Turnitin

Reporte de similitud

NOMBRE DEL TRABAJO

Tesis

AUTOR

Viviangelli Rosas

RECuento de palabras

14727 Words

RECuento de caracteres

79683 Characters

RECuento de páginas

66 Pages

Tamaño del archivo

376.8KB

Fecha de entrega

Jan 2, 2024 11:26 PM GMT-5

Fecha del informe

Jan 2, 2024 11:27 PM GMT-5

● 10% de similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base

- 9% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 3% Base de datos de trabajos entregados
- 1% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● Excluir del Reporte de Similitud

- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 10 palabras)

Resumen

● 10% de similitud general

Principales fuentes encontradas en las siguientes bases de datos:

- 9% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 3% Base de datos de trabajos entregados
- 1% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

FUENTES PRINCIPALES

Las fuentes con el mayor número de coincidencias dentro de la entrega. Las fuentes superpuestas no se mostrarán.

1	repositorio.uwiener.edu.pe Internet	4%
2	repositorio.unphu.edu.do Internet	1%
3	repositorio.ucv.edu.pe Internet	<1%
4	Maricielo Loyola Gil, Ana María Chian García, Jaime Abelardo Polo Ga... Crossref	<1%
5	hdl.handle.net Internet	<1%
6	repositorio.uap.edu.pe Internet	<1%
7	Universidad Wiener on 2022-11-12 Submitted works	<1%
8	researchgate.net Internet	<1%

Descripción general de fuentes

9	Munerah S. BinShabaib, Shatha S. ALHarthi, Bashayer S. Helaby, Mana...	<1%
	Crossref	
10	Universidad Wiener on 2022-11-12	<1%
	Submitted works	
11	repositorio.uigv.edu.pe	<1%
	Internet	
12	Universidad Wiener on 2022-08-23	<1%
	Submitted works	
13	Universidad Wiener on 2022-11-28	<1%
	Submitted works	
14	Universidad Wiener on 2023-10-22	<1%
	Submitted works	
15	HanWei Mei. "Experimental validation of inter-subspecific genetic diver...	<1%
	Crossref	
16	repositorio.unfv.edu.pe	<1%
	Internet	
17	uwiener on 2023-01-20	<1%
	Submitted works	
18	scielo.org.pe	<1%
	Internet	

Anexo N° 12: Informe del asesor

 Universidad Norbert Wiener	INFORME DEL ASESOR		
	CÓDIGO: UPNW-GRU-FOR-014	VERSIÓN: 02 REVISIÓN: 02	FECHA: 13/05/2020

Lima, 15 de diciembre del 2023

Dra. Esp. Brenda Vergara Pinto

(Grado académico) (Nombres y apellidos del Director(a) de la EAP o EPG)

Directora de la EAP de Odontología (o EPG) de la Universidad Privada Norbert Wiener
Presente.-

Presente.-

De mi especial consideración:

Es grato expresarle un cordial saludo y como Asesor de la Tesis titulada: "ACCIÓN ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANOLICO DE AZADIRACHTA INDICA (NEEM) EN COMPARACIÓN CON EL GLUCONATO DE CLORHEXIDINA AL 0.12% CON CLORURO DE CETILPIRIDINIO 0,05% FRENTE A LAS CEPAS DE PORPHYROMONA GINGIVALIS. ESTUDIO IN VITRO. LIMA. 2023", desarrollada por el egresado Viviangelli Vanessa Rosas Benites; para la obtención del Título Profesional de Cirujano dentista; ha sido concluida satisfactoriamente.

Al respecto informo que se lograron los siguientes objetivos:

- Determinar la acción antibacteriana in vitro del extracto etanólico de Azadirachta indica (Neem) al 25%, 75% y 100% comparado con el gluconato de clorhexidina al 0,12% con cloruro de cetilpiridinio al 0,05% frente las cepas de Porphyromonas gingivalis, - estudio in vitro, Lima- 2023 dentro las 24, 48 y 72 horas.
- Determinar la acción antibacteriana in vitro del extracto etanólico de Azadirachta indica (Neem) al 25% sobre las cepas de Porphyromonas gingivalis, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.
- Determinar la acción antibacteriana in vitro del extracto etanólico de Azadirachta indica (Neem) al 75% sobre las cepas de Porphyromonas gingivalis, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.
- Determinar la acción antibacteriana in vitro del extracto etanólico de Azadirachta indica (Neem) al 100% sobre las cepas de Porphyromonas gingivalis, Lima- 2023, dentro las 24, 48 y 72 horas.
- Determinar la acción antibacteriana in vitro del gluconato de clorhexidina al 0,12% con cloruro de Cetilpiridinio 0,05% sobre las cepas de Porphyromonas gingivalis, estudio in vitro, Lima- 2023 dentro las 24, 48 y 72 horas.

Así mismo, informo y doy conformidad de que se ha cumplido con los requisitos académicos solicitados por la Universidad Privada Norbert Wiener, en torno a las políticas de originalidad y conductas antiplagio, entre ellos el Procedimiento para el uso de software antiplagio, cumpliendo con los porcentajes de originalidad establecido.

Atentamente,

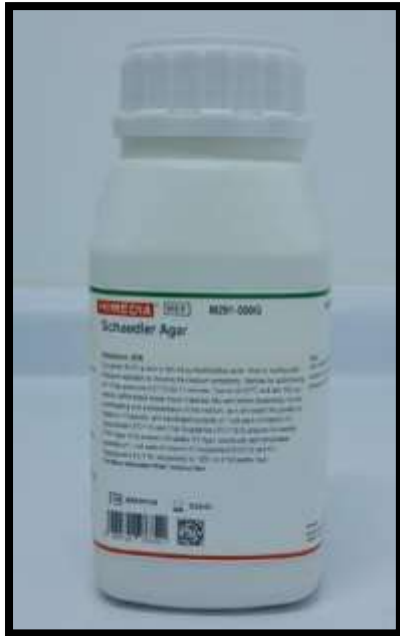


Firma del Asesor

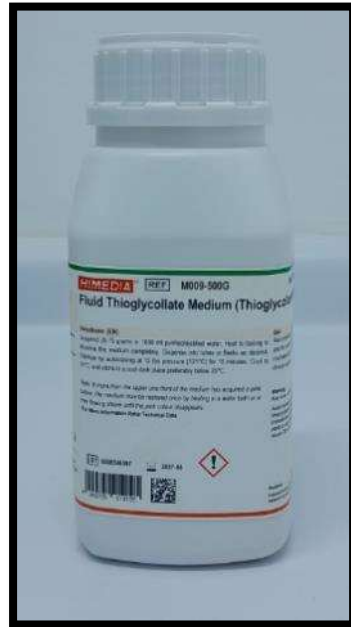
Mg CD. Sara Angelica Morante Maturana

Anexo N° 13: Fotografías del ensayo

1. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS



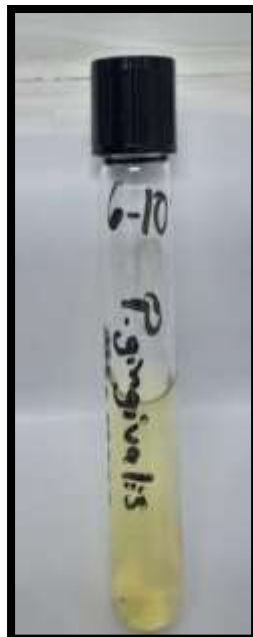
Agar Schaedler



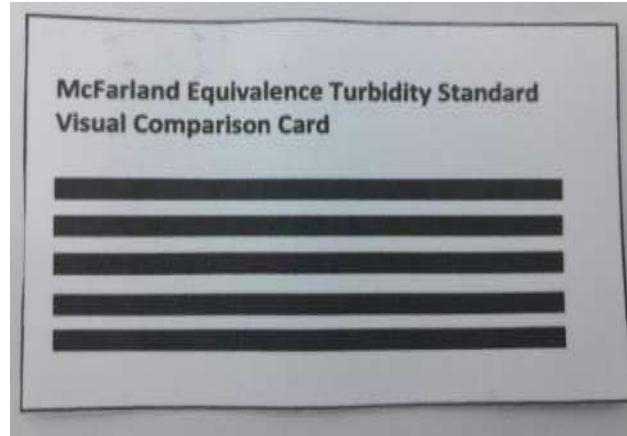
Medio Tioglicolato Fluido

2. CEPAS MICROBIANAS E INSUMOS PARA ANTIBIOGRAMA

CEPA DE *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 EN MEDIO TIOGLICOLATO FLUIDO



Tarjeta de comparación visual para el estándar de turbidez McFarland



**Gluconato de clorhexidina al 0,12%
y cloruro de cetilpiridinio al 0,05%.
Marca: "Perio.Aid-Intensive Care"**



Suero Fisiológico al 0,9%

**Extracto etanólico de
Azadirachta indica al 100%**



**Extracto etanólico de
Azadirachta indica al 75%**



Extracto etanólico de *Azadirachta indica* al 25%



3. Preparación del agar

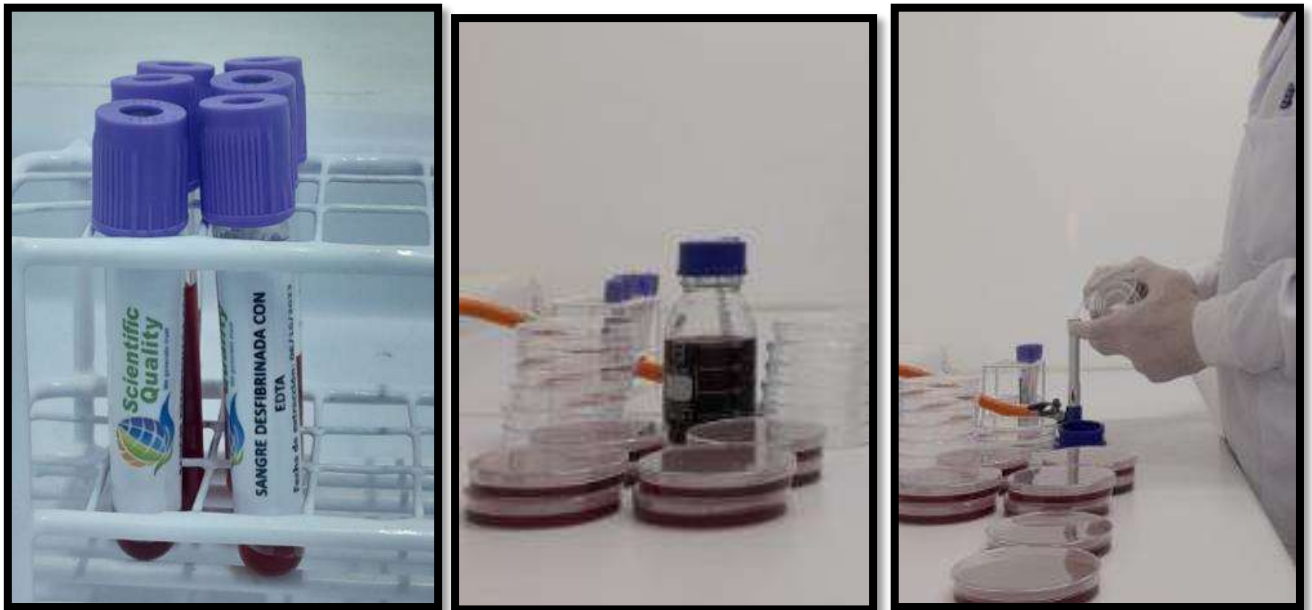
Pesaje del Agar Schaedler



Luego el frasco de agar Schaedler se esteriliza por autoclave y se estabiliza la temperatura a 45°C en baño termostático antes de su traslado en placas Petri.



4. Combinación de agar Schaedler con Sangre desfibrinada y Vitamina K, en esterilidad, luego, se vierte el agar Schaedler enriquecido en las placas Petri esterilizadas con mechero de bunsen encendido



5. Realización de los pocillos antibiograma (5,5 mm de diámetro) con sacabocado estéril en blanco en las placas de agar Schaedler enriquecido.



6. Preparación del Extracto etanólico de *Azadirachta indica* (NEEM)



**Plantas de *Azadirachta indica*
(Neem)**



**Desecado de hojas de *Azadirachta indica*
a 50°C por 8 horas en estufa**



**Hojas de *Azadirachta indica*
Deshidratadas**



Molienda de hojas de *Azadirachta indica* en licuadora convencional



Hojas deshidratadas y molidas de *Azadirachta indica*



Alcohol de 70% para diluciones de *Azadirachta indica*



Alcohol de 96% para maceración de *Azadirachta indica*

Maceración de hojas deshidratadas y molidas de *Azadirachta indica*



Filtración de macerado de hojas de *Azadirachta indica* en papel Whatman



Hojas molidas y maceradas de *Azadirachta indica* después de filtración



Secado de Hojas molidas, maceradas y filtradas de *Azadirachta indica* a 40°C



Preparación de concentraciones de extractos etanólicos de *Azadirachta indica*

7. Reactivación de la cepa *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277

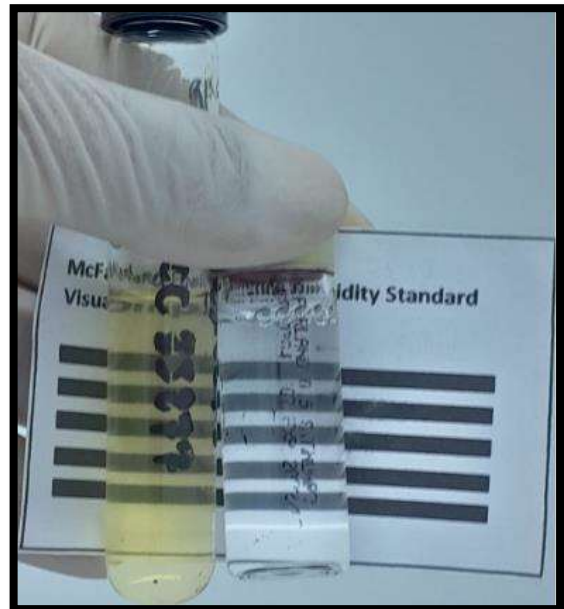


**Cepa *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277
liofilizada**

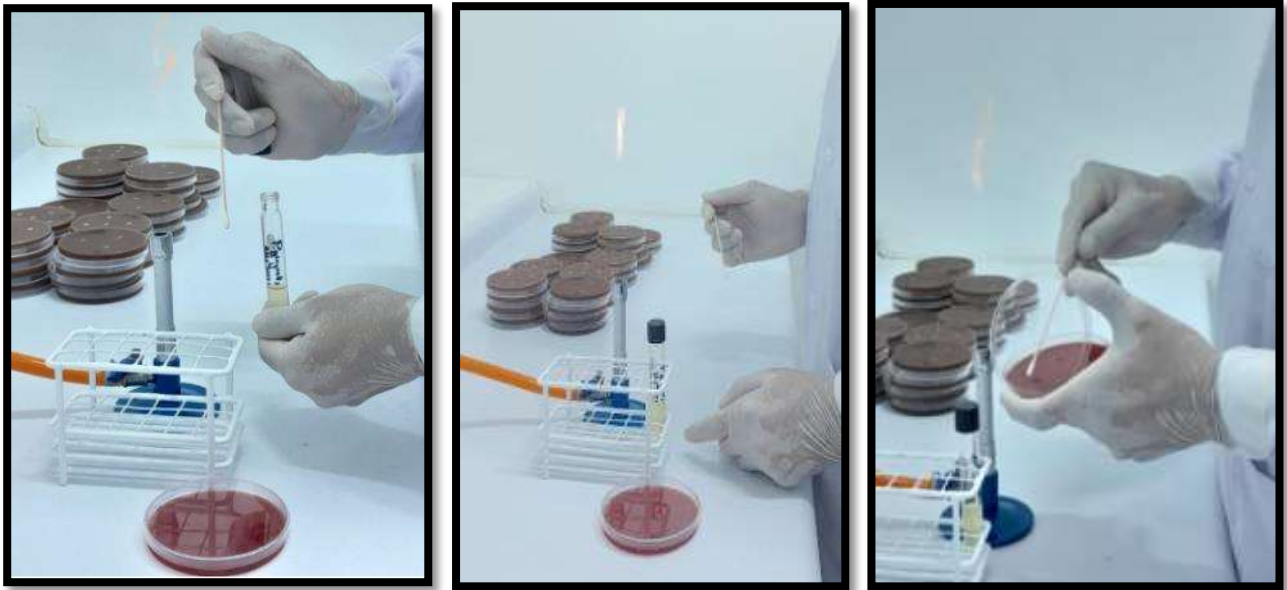


Reconstitución de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 liofilizada en Medio tioglicolato fluido en esterilidad del mechero de Bunsen

8. Preparación suspensión al 0,5 McFarland, a partir de cultivo en agar de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. Comparación con el estándar comercial Sulfato de Bario 0,5 de Mc Farland.



9. Inoculación con hisopo estéril de la cepa *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 a las placas de agar Schaedler enriquecido



10. Procedimiento de inoculación de 15uL de las sustancias de prueba, en esterilidad, frente al mechero de Bunsen.

10.1 Inoculación a los pocillos antibiograma con *Azadirachta indica* al 100%



10.2 Inoculación a los pocillos antibiograma con *Azadirachta indica* al 75%



10.3 Inoculación a los pocillos antibiograma con *Azadirachta indica* al 25%



10.4 Inoculación a los pocillos antibiograma con Digluconato de clorhexidina al 0.12% y cloruro de cetilpiridinio al 0,05%



10.5 Inoculación a los pocillos antibiograma con suero fisiológico al 0,9%



11. Colocación de Placas Petri de agar Schaedler enriquecido inoculados con *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 y extractos etanólicos de *Azadirachta indica* y controles de ensayo en jarra de anaerobiosis para su estudio a las 24, 48 y 72 horas de incubación



12. Colocación en la incubadora microbiológica de las placas Petri con agar Schaedler enriquecido inoculadas con *Porphyromonas gingivalis* (En jarra de anaerobiosis) conteniendo los extractos etanólicos de *Azadirachta indica* y controles de ensayo en la incubadora a 37°C por los periodos de tiempo de 24, 48 y 72 horas





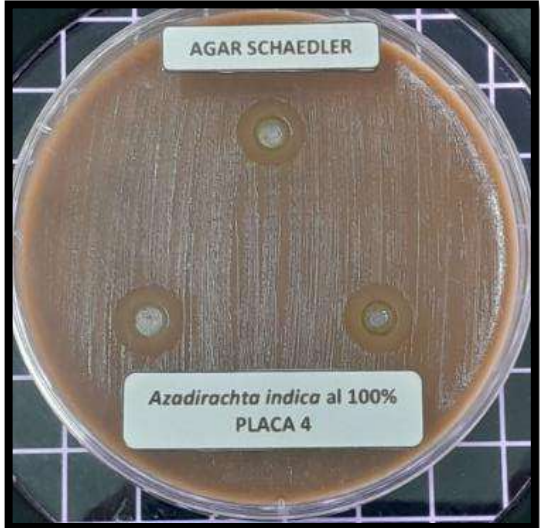
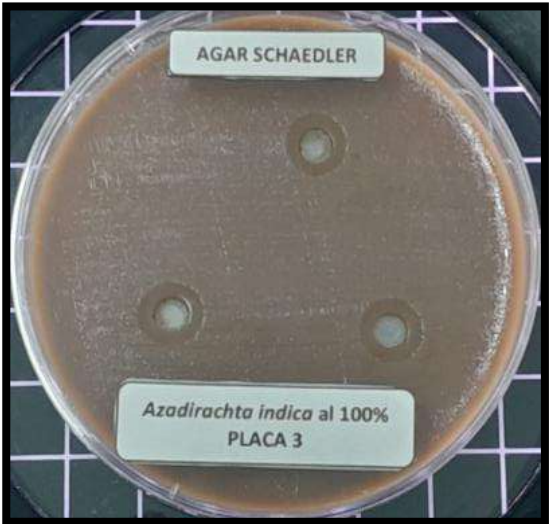
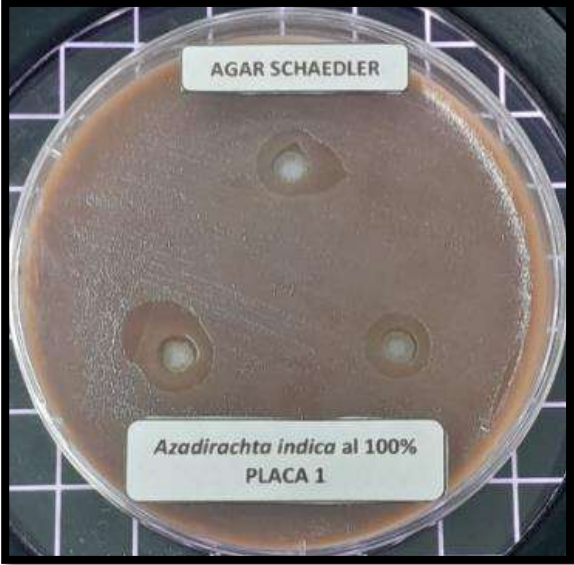
13. RESULTADOS

Después del tiempo de incubación, las placas Petri se sacaron del equipo y se midieron con una regla Vernier digital y una lupa de 4 aumentos de un contador de colonias microbiológico de fondo oscuro que dio contraste para observar detalladamente los halos de inhibición de los extractos etanólicos frente a *Porphyromonas gingivalis*

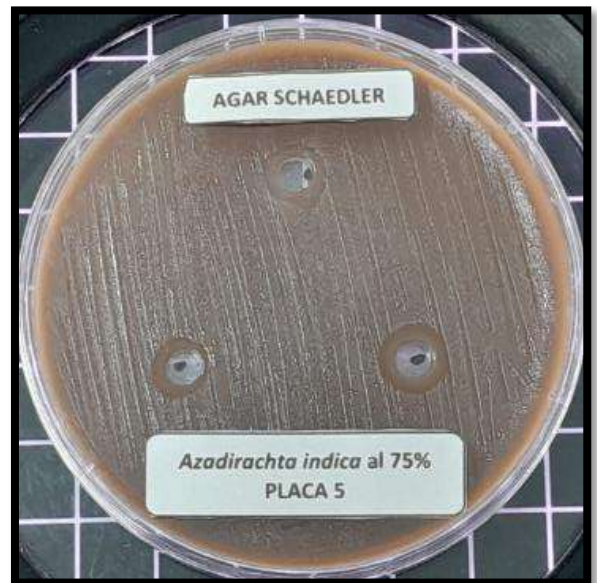
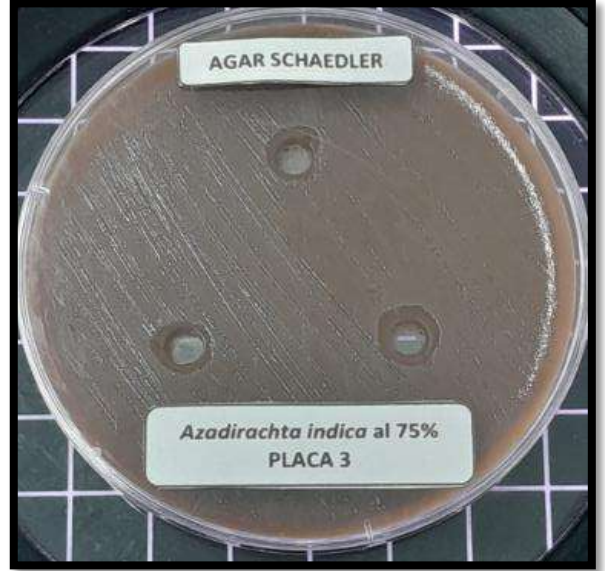
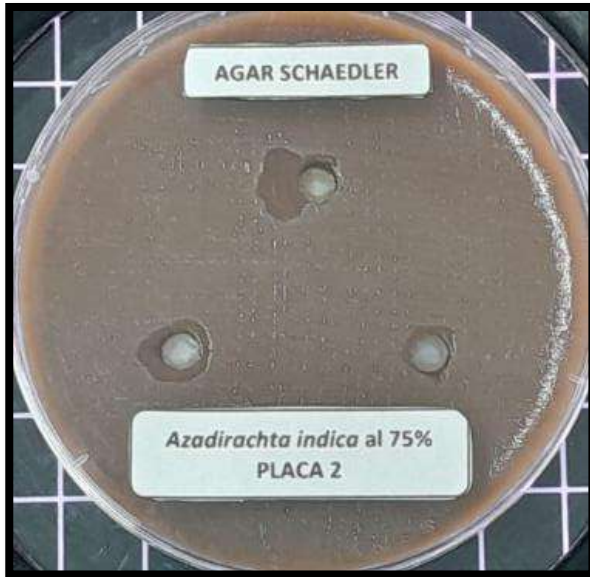
REGLA VERNIER DIGITAL



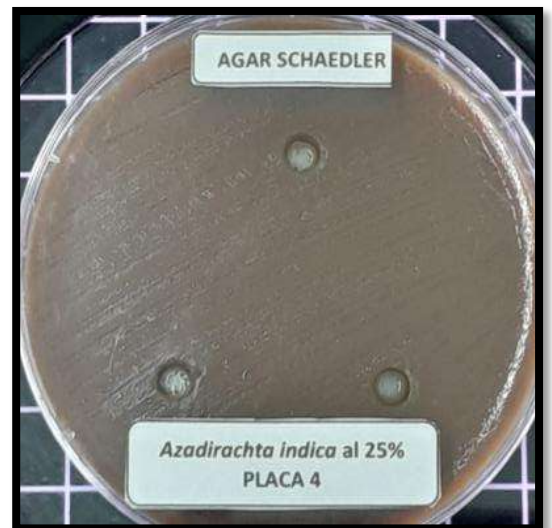
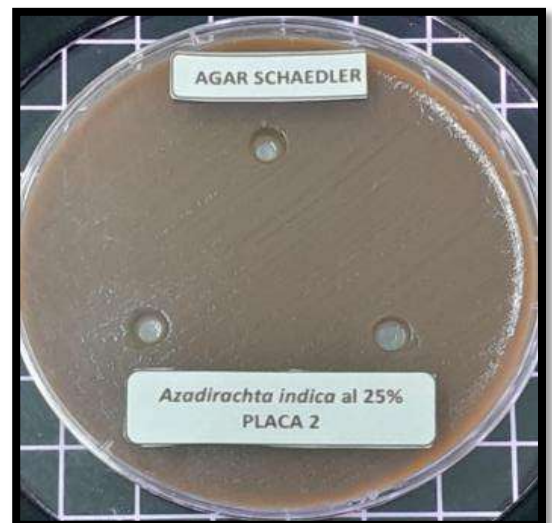
13.1. Fotografías de placa Petri con Agar Schaedler enriquecido con el extracto etanólico de *Azadirachta indica* 100% de frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 a las 72 horas



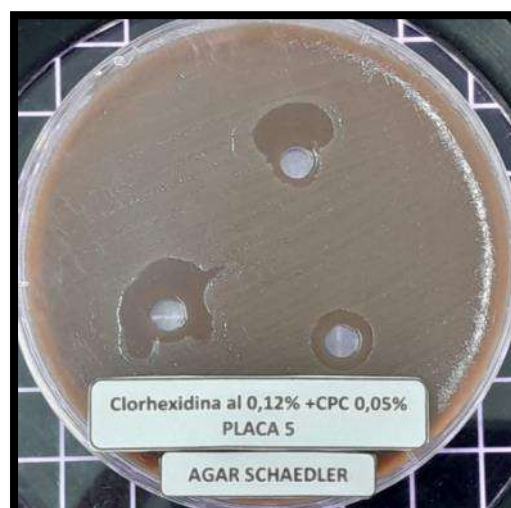
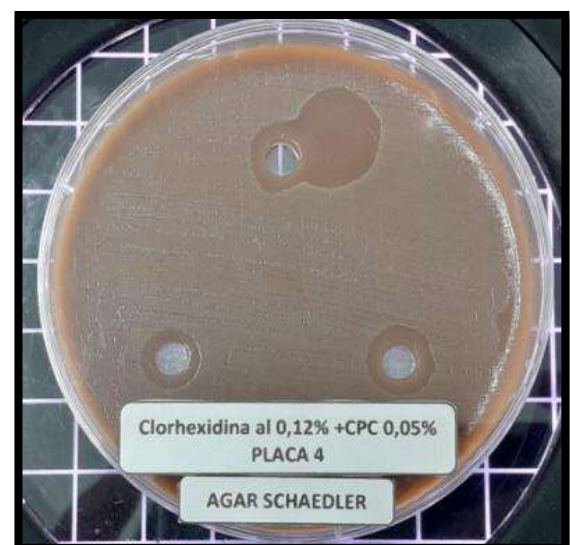
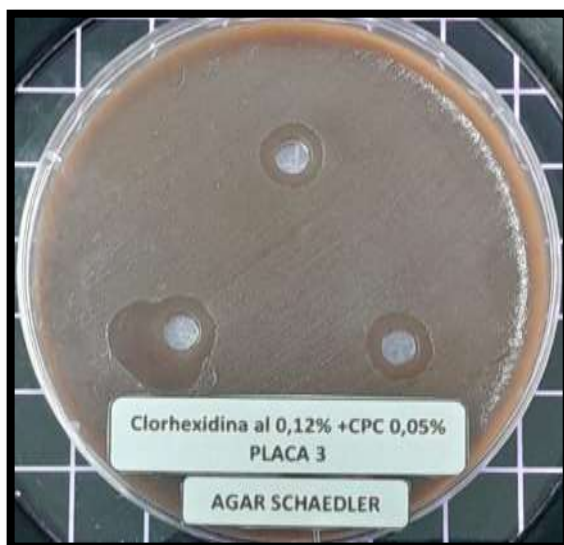
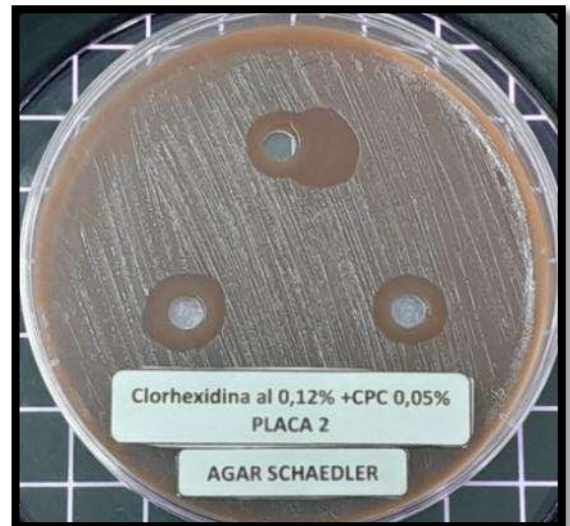
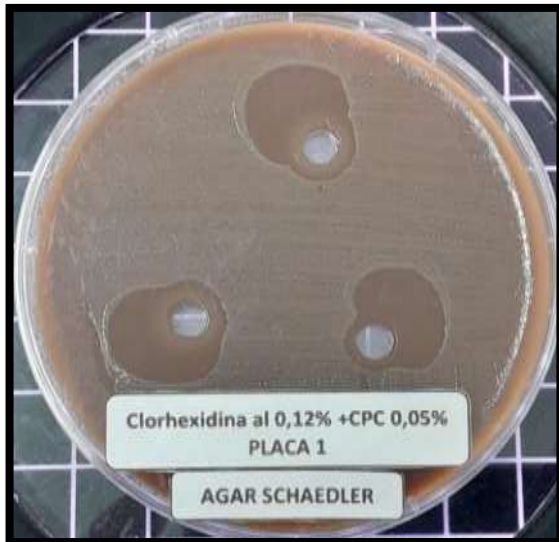
13.2. Fotografías de placa Petri con Agar Schaedler enriquecido con el extracto etanólico de *Azadirachta indica* 75% de frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 a las 72 horas



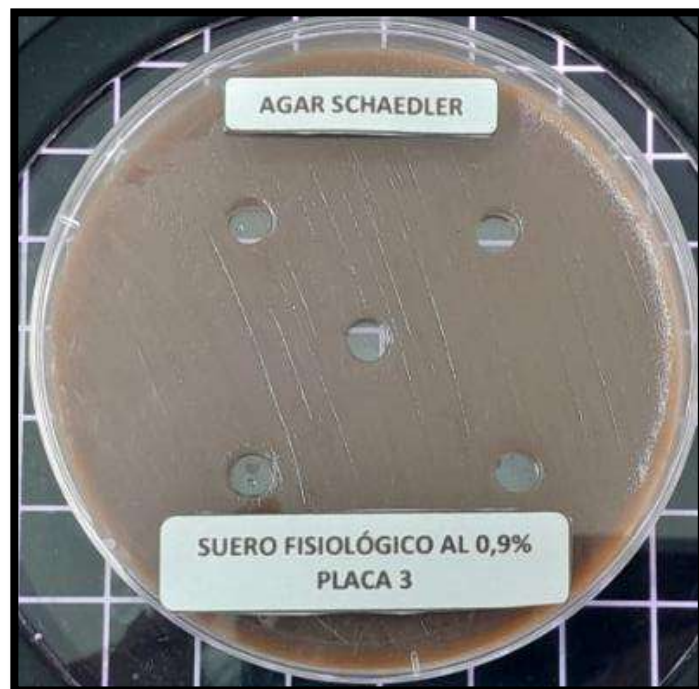
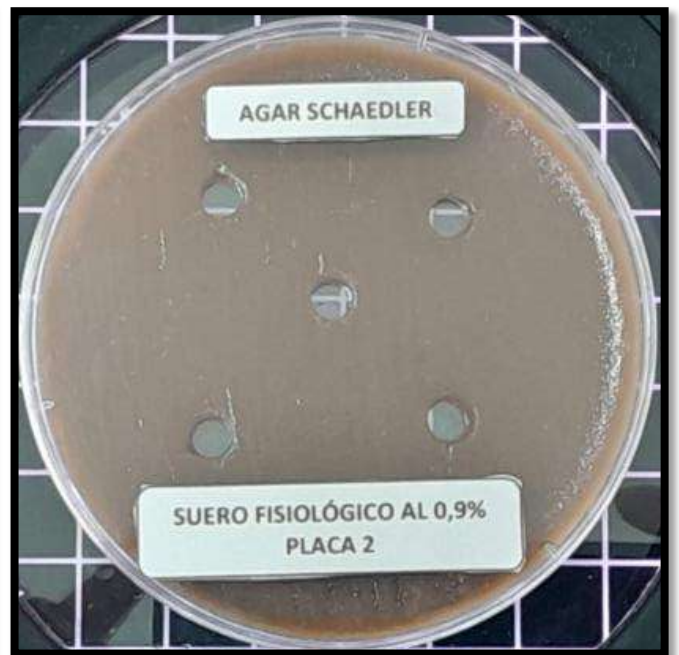
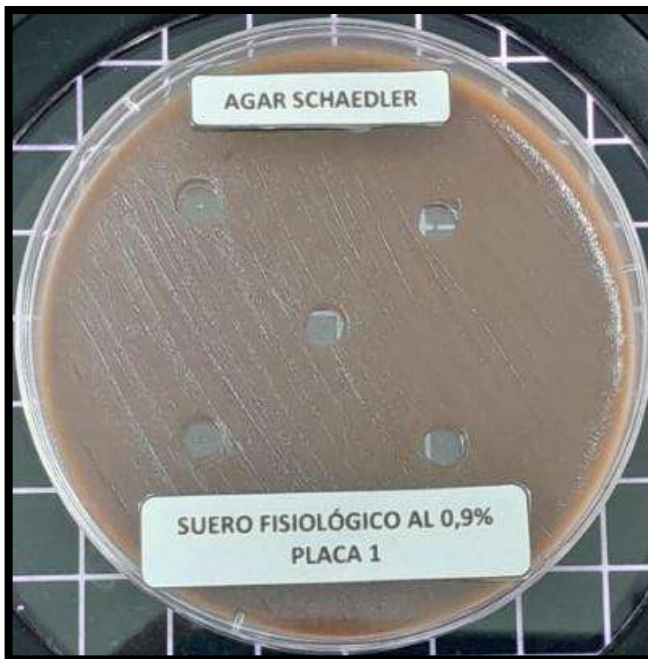
13.3. Fotografías de placa Petri con Agar Schaedler enriquecido con el extracto etanólico de *Azadirachta indica* 25% de frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 a las 72 horas



13.4. Fotografías de placa Petri con Agar Schaedler enriquecido con Diguconato de clorhexidina al 0,12% y Cloruro de cetilpiridinio al 0,05% frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 a las 72 horas



13.5. Fotografías de placa Petri con Agar Schaedler enriquecido con Suero fisiológico al 0,9% frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 a las 72 horas



14. ELIMINACIÓN DE RESIDUOS BIOCONTAMINADOS

- Se colocó los materiales biocontaminados incluyendo placas Petri, tubos de ensayos con cultivo de *Porphyromonas gingivalis* en bolsas rojas especiales para esterilización por autoclave.



● 18% de similitud general

Principales fuentes encontradas en las siguientes bases de datos:

- 16% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 12% Base de datos de trabajos entregados
- 3% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

FUENTES PRINCIPALES

Las fuentes con el mayor número de coincidencias dentro de la entrega. Las fuentes superpuestas no se mostrarán.

1	repositorio.uwiener.edu.pe Internet	4%
2	dgsa.uaeh.edu.mx:8080 Internet	1%
3	docplayer.es Internet	1%
4	portal.guiasalud.es Internet	<1%
5	Universidad Cesar Vallejo on 2017-07-15 Submitted works	<1%
6	hdl.handle.net Internet	<1%
7	rpm.pe Internet	<1%
8	researchgate.net Internet	<1%