



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
CARRERA DE ODONTOLOGÍA

Título

“Estudio comparativo de las propiedades antimicrobianas del extracto de arándano frente a la clorhexidina al 0,12%, en el efecto inhibitorio de un periodontopatógeno (*Porphyromonas Gingivalis*) estudio in vitro”

**Tesis previa a la obtención del
título de Odontóloga**

AUTORA: MARIA DEL PILAR MUÑOZ OVIEDO

DIRECTOR: ODONT. ESP. JUAN MARCELO PEÑAFIEL VINTIMILLA

Loja-Ecuador

2020

Loja, 28 de Julio de 2020

CERTIFICACIÓN

Odont. Esp. Juan Marcelo Peñafiel Vintimilla
DIRECTOR DE TESIS

Certifica:

Que la presente tesis titulada “ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS DEL EXTRACTO DE ARÁNDANO FRENTE A LA CLORHEXIDINA AL 0,12%, EN EL EFECTO INHIBITORIO DE UN PERIODONTOPATÓGENO (PORPHYROMONAS GINGIVALIS) ESTUDIO IN VITRO.”, de la autoría de la Srta. **María Del Pilar Muñoz Oviedo**, ha sido planificada y ejecutada bajo mi dirección y supervisión, con pertinencia y rigurosidad científica misma que cumple con las disposiciones institucionales, metodológicas y técnicas, que regula esta actividad académica, por lo que autorizo a la mencionada estudiante la presentación y sustentación de la misma.

Es todo cuanto puedo informar.



Odont. Esp. Juan Marcelo Peñafiel Vintimilla
DIRECTOR DE TESIS

Facultad De La Salud Humana
Carrera de Odontología
Email: juan.penafiel@unl.edu.ec
+593962919492

AUTORÍA

Yo María del Pilar Muñoz Oviedo declaro ser autora del presente trabajo titulado **“ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS DEL EXTRACTO DE ARÁNDANO FRENTE A LA CLORHEXIDINA AL 0,12%, EN EL EFECTO INHIBITORIO DE UN PERIODONTOPATOGENO (PORPHYROMONAS GINGIVALIS) ESTUDIO IN VITRO”**. Este ha sido desarrollado con métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que la información, investigación, datos, criterios, análisis y conclusiones vertidos en el presente son de exclusiva responsabilidad del Autor y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja, a sus representantes jurídicos de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi Tesis en el Repositorio institucional-biblioteca Virtual.

Autora: María Del Pilar Muñoz Oviedo

Firma:

Pasaporte: AW329920

Fecha: Loja, 28 de Julio del 2020

CARTA DE AUTORIZACIÓN

Yo, María Del Pilar Muñoz Oviedo, declaro ser la autora de la tesis titulada “**ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS DEL EXTRACTO DE ARÁNDANO FRENTE A LA CLORHEXIDINA AL 0,12%, EN EL EFECTO INHIBITORIO DE UN PERIODONTOPATÓGENO (PORPHYROMONAS GINGIVALIS) ESTUDIO IN VITRO.**”, como requisito para optar al título de Odontóloga; autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que, con fines académicos, muestre al mundo la reproducción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional.

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en la red de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja no se responsabiliza por la copia o plagio de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja a los veintiocho días del mes de julio de dos mil veinte.

Firma la autora,

María Del Pilar Muñoz Oviedo
Pasaporte: AW329920
Correo electrónico: smiles.clinident@gmail.com
Móvil: +39 3703095279

Datos Complementarios:

Director de tesis: Odont. Esp. Juan Marcelo Peñafiel Vintimilla

Tribunal de grado: Presidente: Odont. Esp. Jhoanna A. Riofrío H.

Vocal 1: Odont. Esp. Darlen Díaz Pérez

Vocal 2: Odont. Esp. Zulema Castillo Guarnizo

DEDICATORIA:

*A mi madre **Gloria Oviedo Builes**, quien con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo y valentía, me enseñó a no temer en las adversidades porque Dios está conmigo siempre.*

*A mi hermana **Ana María**, por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento gracias. A toda mi **Familia**, porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.*

*A mi **Esposo**, quien dedico noches enteras apoyándome a estudiar y dándome ánimos de seguir adelante y a pesar de nuestra distancia física, siento que estás conmigo siempre, aunque nos faltaron muchas cosas por vivir juntos, sé que este momento hubiera sido tan especial para ti como lo es para mí.*

*A mi amado **Rocky R**, que partiste sin esperarlo, pero siempre estará presente en mi corazón y en mi vida, gracias por tu compañía durante toda mi carrera.*

Finalmente, quiero dedicar esta tesis a todos mis amigos, por apoyarme cuando más lo necesitaba, por extender su mano en momentos difíciles y por el amor brindado cada día, de verdad mil gracias, siempre los llevo en mi corazón.

Gracias padre celestial por tus bendiciones, continúa iluminando mi camino.

M. P. Muñoz Oviedo

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo de tesis primeramente me gustaría agradecerle a Dios, por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, porque hizo realidad este sueño anhelado.

*A la **UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**, por darme la oportunidad de estudiar y ser una profesional.*

A mi Madre, hermana y Esposo, quienes siempre me apoyaron y aconsejaron.

*A mi directora de Investigación, **Dra. María Cumandá Charfuelán**, por su visión crítica de muchos aspectos cotidianos de la vida, por su rectitud en su profesión como Patóloga clínica, por sus consejos, que ayudaron a formarme como persona e investigadora.*

También me gustaría agradecer a mis profesores, durante toda mi carrera profesional porque todos han aportado con un granito de arena a mi formación, por sus consejos y enseñanza.

*De igual manera agradecer y por último a mi director de tesis el **Dr. Juan Marcelo Peñafiel Vintimilla**, quien me han motivado y aconsejado durante el desarrollo de mi investigación.*

Son muchas las personas, que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

Para ellos: Muchas gracias y que Dios los bendiga.

M. P. Muñoz Oviédo

ÍNDICE

Caratula	i
Certificación.....	ii
Autoría	iii
Carta de autorización	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimiento	vi
Lista de figuras	xii
Tablas y gráficos.....	xiv
Lista de anexos.....	xv
Título	1
Resumen	2
Summary	3
Introducción.....	4
Revisión de la literatura.....	8
 CAPITULO I.....	 8
 1.1 TEJIDOS PERIODONTALES	 8
<i>1.1.1 La encía.....</i>	<i>8</i>
1.1.1.1 Encía marginal o libre.....	8
1.1.1.2 Encía insertada o adherida	8
1.1.1.3 Encía interdental o interproximal.....	8
<i>1.1.2 Ligamento periodontal.....</i>	<i>8</i>

1.1.3 Hueso alveolar	9
1.1.4 Cemento.....	9
1.2 ENFERMEDAD PERIODONTAL	9
1.3 EPIDEMIOLOGIA A NIVEL MUNDIAL	10
1.4 ETIOLOGÍA	11
1.5 BIOFILM	13
CAPITULO II	14
2.1 PORPHYROMONAS GINGIVALIS.....	14
2.1.1 Taxonomía.....	14
2.1.2 Morfología y estructura	14
2.1.2.1 Estructura de la Porphyromonas Gingivalis	15
2.1.3 Factores de virulencia.....	15
2.1.4 Fisiopatología	16
CAPITULO III.....	17
3.1 FITOQUÍMICA.....	17
3.2 ARÁNDANO	17
3.2.1 Taxonomía.....	18
3.2.2 Morfología.....	18
3.2.3 Composición.....	19
3.2.4 Propiedades del Arándano.....	20
3.2.4.1 Flavonoles	21
3.2.4.2 Antocianinas	21
3.2.4.3 Proantocianidinas (PACs)	22
3.2.5 Mecanismo de acción.....	22

CAPITULO IV	24
4.1 CLORHEXIDINA 0,12%	24
4.1.1 <i>Mecanismo de acción</i>	24
4.1.2 <i>Propiedades físico-químicas</i>	25
4.1.3 <i>Concentraciones</i>	25
4.1.4 <i>Propiedades antimicrobianas</i>	26
4.1.5 <i>Aplicaciones</i>	26
4.1.6 <i>Toxicidad y otros efectos secundarios</i>	27
CAPÍTULO V.....	28
5.1 MEDIOS DE CULTIVO	28
5.1.1 <i>Clasificación medios de cultivo</i>	28
5.1.1.1 Medios solidos	28
5.1.1.2 Medios usuales.....	29
5.1.1.3 Medios enriquecidos	29
5.1.1.4 Medios selectivos.....	29
5.1.1.5 Medios selectivos diferenciales	29
5.1.2 <i>Siembra y recuento de microorganismos</i>	29
5.1.3 <i>Sistemas de incubación en anaerobiosis</i>	30
5.1.4 <i>Preparación del inóculo</i>	30
5.2 MEDIOS DE CULTIVO PARA ANAEROBIOS ESTRICTOS.....	30
5.2.1 <i>Agar Mueller-Hinton</i>	30
5.2.2 <i>Agar sangre con suplementos para anaerobios</i>	31
5.3 TINCIÓN DE GRAM PARA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN CULTIVOS.....	31
METODOLOGÍA	32

<i>Tipo de diseño</i>	32
<i>Población de estudio</i>	32
Selección de la muestra	33
Tamaño de la muestra	33
CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN	34
<i>Criterios de inclusión</i>	34
<i>Criterio de exclusión</i>	35
MATERIALES Y MÉTODOS	35
Materiales de laboratorio para elaborar el extracto de arándano	35
Equipo	36
Material y equipos para la preparación de los medios de cultivo	36
Materiales para la prueba de efecto antibacteriano:	37
Material digital	38
INFRAESTRUCTURA	38
PROCEDIMIENTOS	38
<i>Preparación de la tintura extracto de arándano</i>	38
<i>Concentración de la vitamina K</i>	39
<i>Concentración y preparación de solución Hemina</i>	39
<i>Preparación del caldo de tripticasa de soya</i>	40
<i>Reconstitución de las cepas estándar ATCC:</i>	41
<i>Preparación del medio de cultivo Agar Sangre enriquecido con Vitamina k y Hemina</i>	41
<i>Preparación de medio de cultivo Muller Hinton</i>	42
<i>Siembra en estría</i>	43
<i>Mínima Concentración Inhibitoria</i>	45

Preparación de las diluciones	45
<i>Difusión en agar y prueba de sensibilidad antimicrobiana</i>	45
<i>Control de Halos de inhibición bacteriana</i>	46
<i>Tinción de Gram e identificación del patógeno</i>	47
Resultados	48
<i>Comparación de la efectividad antimicrobiana del extracto Arándano azul Biloxi (vaccinium corymbosum) frente a la Clorhexidina 0,12%</i>	48
Análisis e interpretación:	49
Análisis e interpretación:	50
<i>Sustantividad antimicrobiana del extracto Arándano azul (Vaccinium Corymbosum) cv. Bioxil sobre cepas de Porphyromonas Gingivalis ATCC 33277 en diferentes concentraciones</i>	51
Análisis e interpretación:	52
Análisis e interpretación:	53
<i>Análisis de los halos de inhibición de las muestras, concentraciones del extracto Arándano azul (Vaccinium Corymbosum) cv. Biloxi sobre cepas de Porphyromonas Gingivalis ATCC 33277 en un grupo de control positivo y negativo</i>	54
Análisis e interpretación:	54
Análisis e interpretación:	55
Discusión	57
Conclusiones	61
Recomendaciones	62
Bibliografía	63

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1</i> Fruto de arándano (Fuente: autora)	39
<i>Figura 2</i> Corte de arándano (Fuente: autora)	39
<i>Figura 3</i> Pesaje de cristales de Hemina	40
<i>Figura 4</i> Baño María 37° para disolución cristales de Hemina.....	40
<i>Figura 5</i> Agitación de los cristales de Hemina	40
<i>Figura 6</i> Agar Tripticasa de soya.....	40
<i>Figura 7</i> Disolución del Agar y calentamiento para homogenizar, luego es llevado a esterilización a 127° por 15 minutos.....	40
<i>Figura 8</i> Cepa de Porphyromona Gingivalis (liofilizado)	41
<i>Figura 9</i> activación en caldo de tripticasa de Soya enriquecido	41
<i>Figura 10</i> Pesaje del Agar y homogenización.....	42
<i>Figura 11</i> Enriquecimiento del Agar con Hemina y Vitamina , colocación en cajas Petri utilizando cámara de flujo laminar.....	42
<i>Figura 12</i> Preparación del Agar Miuller Hinton (pesaje, mezcla, calentamiento para homogenizar y esterilización.	43
<i>Figura 13</i> Llenado de las cajas Petri (se dejan solidificar para ser utilizadas).....	43
<i>Figura 14</i> Siembra en estría de la P. Gingivalis, en un agar sangre(Humana y de Cordero) enriquecido con (Hemina y Vitamina K).....	44
<i>Figura 15</i> Crecimiento bacteriano de colonias de P. Gingivalis.	44
<i>Figura 16</i> Disoluciones del 10% al 100% a base de tintura madre de Arándano.....	45
<i>Figura 17</i> Agar Miuller Hinton con disco.....	46
<i>Figura 18</i> Colocación en jarra de anaerobiosis y mantenimiento a 37°	46
<i>Figura 19</i> Halos de Inhibición Bacteriana control 1	46
<i>Figura 20</i> Halos de Inhibición Bacteriana control 2	46

<i>Figura 21 observación microscópica identificación bacteriana P. Gingivalis</i>	47
<i>Figura 22 Colonias de P. Gingivalis en Agar sangre de cordero y Agar sangre enriquecida con Vitamina K y Hemina.</i>	47

TABLAS Y GRÁFICOS

<i>Cuadro 1 Análisis descriptivo de los tratamientos.....</i>	49
<i>Cuadro 2 Prueba de t para muestras independientes.....</i>	49
<i>Cuadro 3 Características de la muestra en el proceso sustentividad antimicrobiana del extracto arándano azul sobre cepas de Porphyromonas Gingivalis en diferentes concentraciones.</i>	52
<i>Cuadro 4 Análisis descriptivo de la sustentividad antimicrobiana del extracto arándano azul sobre cepas de Porphyromonas Gingivalis en diferentes concentraciones.....</i>	53
<i>Cuadro 5 Características de la muestra en el análisis de los halos de inhibición de las muestras</i>	54
<i>Cuadro 6 Análisis descriptivo en el análisis de los halos de inhibición de las muestras.....</i>	55
 <i>Grafico 1 Comparación de la efectividad antimicrobiana</i>	 51
<i>Grafico 2 Halos de inhibición de las muestras.....</i>	56
<i>Grafico 3 tratamiento por resultados</i>	56

LISTA DE ANEXOS

<i>ANEXO 1</i>	72
<i>ANEXO 2</i>	75
<i>ANEXO 3</i>	79
<i>ANEXO 4</i>	80
<i>ANEXO 5</i>	83
<i>ANEXO 6</i>	86
<i>ANEXO 7</i>	89
<i>ANEXO 8</i>	91
<i>ANEXO 9</i>	93
<i>ANEXO 10</i>	97
<i>ANEXO 11</i>	100
<i>ANEXO 12</i>	102

TÍTULO

“Estudio comparativo de las propiedades antimicrobianas del extracto de arándano frente a la clorhexidina al 0,12%, en el efecto inhibitorio de un periodontopatógeno (*Porphyromonas Gingivalis*) estudio in vitro”

RESUMEN

En la Actualidad el uso de plantas medicinales como método alternativo es favorable ya que los diferentes fármacos están hechos a base de compuestos encontrados en las plantas y sus frutos. Cada día crece más la necesidad de investigar acerca de estos principios activos probando los extractos de hierbas eficazmente en el tratamiento y la prevención de enfermedades orales. El objetivo de este estudio in vitro es comparar la eficacia antimicrobiana del extracto de arándano en diferentes concentraciones frente a la clorhexidina aplicado en la *Porphyromonas Gingivalis* como principal agente etiológico de la enfermedad periodontal. El diseño fue de tipo experimental in vitro de corte transversal. Se elaboró extractos de Arándano Biloxi con el método de maceración logrando una concentración pura, luego se realizó medios de cultivo con agar sangre enriquecido donde se activaron cepas de *Porphyromonas Gingivalis*, procediendo a utilizar discos impregnados de las sustancias mediante el método de Kirby Bauer para tratar las biopelículas de *P. Gingivalis* y dejando actuar en tiempos de 24 y 96 horas en concentraciones 1:1 de extracto puro y disoluciones a partir de este , obteniendo valores referenciales de la concentración mínima inhibitoria frente a la efectividad de la clorhexidina. Este estudio se concluyó que el arándano juega un papel importante para el uso alternativo de extractos puros con alto contenido de compuestos fenólicos y puede actuar como agente capaz de modificar la acción virulenta de una bacteria como la *P. Gingivalis*, con buenos resultados frente a la Clorhexidina al 0,12%.

Palabras claves: Fenoles; Halos Inhibitorios; Biopelículas; Enfermedad Periodontal.

SUMMARY

Nowadays, the usage of medicinal plants as an alternative method is favorable since the different drugs are manufactured based on compounds found in plants and their fruits. Every day the need to investigate these active principles is growing, testing the herbal extracts effectively in the treatment and prevention of oral diseases. The objective of this in vitro study is to compare the antimicrobial efficacy of the blueberry extract in different concentrations against chlorhexidine implemented in Porphyromones Gingivalis as the leading etiological pathogen of periodontal disease. The design was of an experimental in vitro cross-sectional type. Through the maceration method, were processed Biloxi Blueberry extracts obtaining pure concentration. Afterward, was developed the culture medium with enriched blood agar by activating Porphyromones Gingivalis strains, proceeding to utilize discs permeated with the substances, by employing the Kirby Bauer's method of treating the P biofilms. Gingivalis biofilms and leaving them to act in 24 and 96 hours in 1:1 concentration of pure extract and solutions from this, obtaining reference values of the minimum inhibitory concentration against the effectiveness of chlorhexidine. This research concluded that blueberry plays an essential function in the alternative use of pure extracts with a high content of phenolic compounds and can act as an agent capable of modifying the virulent action of a bacterium such as P. Gingivalis, with positive outcomes in contrast to the chlorhexidine at 0.12%.

Keywords: Phenols; Inhibitory Halos; Biofilms; Periodontal Disease.

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo se realiza con el fin de demostrar cuál es el grado de acción antibacteriana del arándano en la *Porphyromonas Gingivalis*, teniendo por objetivo determinar la efectividad y sustentividad. Evaluando así los halos de inhibición alcanzados de acuerdo al tiempo de contacto con el agente bacteriano. Para ello iniciaremos desde una perspectiva general.

Las enfermedades periodontales se describen como afecciones inflamatorias de origen bacteriano, se localizan en la encía y en las estructuras de soporte del diente (ligamento periodontal y hueso alveolar), se caracteriza por la destrucción progresiva de los tejidos de soporte y protección causada por diferentes microorganismos patógenos de origen bacteriano (Hurtado & Bojórquez, 2016).

El tratamiento de las enfermedades periodontales se basa fundamentalmente en el control de la placa bacteriana oral, este va acompañado de métodos mecánicos que ayudaran a eliminar la placa presente en sitios localizados y se implementa con el uso de colutorios, considerándose un sistema coadyuvante en su control y en la prevención de otras enfermedades orales.

Los estudios paleontológicos describen que la enfermedad periodontal ha estado presente en las diferentes culturas, data desde el año 3000 a.C. Donde ya existía la conciencia de tratar la enfermedad periodontal y la necesidad de atenderla. De esta manera el uso de agentes químicos para tratar y prevenir enfermedades orales y mantener la salud dental se conoce desde la antigüedad. Es a partir del siglo XIX cuando se despierta el interés por controlar la enfermedad periodontal. Carranza en su libro menciona “El papiro Ebers cita varias veces a la enfermedad gingival y ofrece algunas recetas para fortalecer los dientes y la encía. Dichos remedios se elaboraban a partir de varias plantas y minerales y se aplicaban a la encía en la forma de una pasta con miel, goma vegetal o residuos de cerveza como vehículo” (2014).

La odontología a lo largo de los tiempos fue ganando más importancia, surgieron nuevas técnicas e instrumentos que mejoraban cada vez más. En Europa a mediados del siglo XVIII, fue significativo la inclusión de los tratamientos odontológicos, primordialmente en Francia e Inglaterra. Pierre Fauchard, se lo considera con justicia el padre de la profesión odontológica, con sus aportes logro un enfoque sistemático sobre el ejercicio dental con base en el conocimiento de su época, mejorando de manera notable los instrumentos y las habilidades técnicas requeridos para efectuar un tratamiento odontológico (H, 2012).

En la actualidad existe un alto índice de problemas periodontales a nivel mundial y son una de las causas más frecuentes en la atención odontológica, los tratamientos inician desde conocer la historia de la enfermedad, el agente que la genera y los diferentes tratamientos que pueden ayudar en la restauración de la salud en la población (Ruiz, Naranjo, & Ramírez, 2004).

En varias investigaciones realizadas los países latinoamericanos indican que las caries, la placa bacteriana, la gingivitis, las periodontopatías y la fluorosis dental son las principales patologías que afecta a su población. En décadas anteriores en el Ecuador las acciones estaban encaminadas a tratar la enfermedad, pero en la actualidad se han desarrollado diferentes estudios para determinar las necesidades de la población y así disminuir los factores de riesgo de las principales patologías que afectan a los individuos en cuanto a la salud bucal se refiere (Gerson, Fernanda, & Claudio, 2016).

Diferentes estudios realizados han encontrado diversas especies de bacterias asociadas a la enfermedad periodontal, entre estas especies bacterianas las de mayor prevalencia en el desarrollo de la enfermedad periodontal son bacterias anaerobias Gram negativo como *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas Gingivalis*, *Prevotella Intermedia*, *Tannerella Forsythia*, *Fusobacterium Nucleatum*, entre otras (Martínez & Ruiz, 2005).

Los patógenos periodontales juegan papeles muy importantes en la etapa inicial de la periodontitis, destruyendo directamente los tejidos periodontales del huésped mediante la liberación de factores tóxicos y metabolitos ayudando a la progresión de la enfermedad periodontal. El tratamiento de esta enfermedad consiste en el control de la placa bacteriana, y el uso de agentes antimicrobianos (colutorios medicados, terapia antibiótica, entre otros) (Azna, Cabanilles, & Loscos, 2007).

Rubioa & Mirónb argumentan que “el uso de las plantas medicinales se ha utilizado como tratamientos tradicionales para numerosas enfermedades durante miles de años en todo el mundo debido a su contenido en flavonoides, terpenos, alcaloides, alditoles, aceites esenciales y otros fitoquímicos”. En las zonas rurales de los países en desarrollo siguen siendo utilizados como el principal tratamiento de muchas afecciones y hay suficientes evidencias (2010).

Ha habido un creciente interés en los compuestos biológicamente activos derivados naturalmente que pueden tener usos terapéuticos potenciales en medicina y odontología. Muchos antibióticos usados actualmente se descubrieron al examinar productos naturales e identificando sus propiedades bacteriostáticas y / o bactericidas. Los diferentes tratamientos odontológicos se han vuelto especialmente adecuados para productos derivados de plantas, impulsados por la evidencia que muestra que la población incorpora regularmente alimentos o bebidas que contienen ciertos fitoquímicos en su dieta mejorando la salud oral (E & KM, 2009).

El arándano es un arbusto pequeño de 0.2-0.4 metros de altura, cuyo nombre científico es arándano *Vaccinium myrtillus* sp., perteneciente a la familia Ericaceae de la especie Southern Highbush Blueberry, este posee una fruta de mediano tamaño, de color azul claro, muy firme y de excelente sabor la variedad cultivada en Ecuador es Biloxi (Díaz & Schuldes, 2013) (Gutiérrez & Baracaldo, 2012). Los arándanos se venden principalmente en forma de productos frescos, frutas secas, jugos y polvos encapsulados, los extractos de arándano son particularmente ricos en polifenoles, incluidos los flavonoides, que tienen propiedades biológicas que pueden ser

beneficiosas para la salud humana. Las aplicaciones terapéuticas hasta la fecha mencionan que se utiliza como efecto preventivo sobre las infecciones urinarias, a través de la capacidad de sus polifenoles para inhibir la adhesión del patógeno *Escherichia coli* a la mucosa del tracto urinario. Estos mismos compuestos también pueden prevenir la adhesión de *Helicobacter pylori* a la mucosa gástrica. Algunos extractos de arándano también ejercen un efecto inhibitorio sobre la adhesión y la capacidad infecciosa del virus responsable de la influenza estacional (Neri, Celis, Jaen, Gutiérrez, & Eréndira, 2009).

Otros estudios mencionan la actividad de los compuestos del arándano frente a las bacterias periodontopatógenas presentes en la cavidad oral mostrando la capacidad inhibitoria que tiene frente a las bacterias (Bonifait & Grenier, 2010) (Yamanaka, Kimizuka, Kato, & Okuda, 2004).

Aunque la clorhexidina sigue siendo el estándar de oro por su acción antimicrobiana y alta sustentividad, se presentan efectos secundarios, como la pigmentación, la alteración del sabor y la formación de límite de cálculo supragingival (Maya, Ruiz, Pacheco, Valderrama, & Villegas, 2011).

Teniendo en cuenta los efectos secundarios de la clorhexidina y el agrado o la confianza de las personas por los productos herbales / naturales como el arándano, el presente estudio fue diseñado para evaluar si el arándano puede ser una buena alternativa natural y de bajo costo para el tratamiento de patologías como la periodontitis, por lo cual se realiza este estudio, con la finalidad de conocer el efecto antibacteriano del extracto de arándano frente a la clorhexidina 0.12% en un microorganismo de importancia en los procesos periodontales, como lo es *Porphyromonas Gingivalis*.

REVISIÓN DE LA LITERATURA

CAPITULO I

1.1 TEJIDOS PERIODONTALES

1.1.1 La encía

Es la parte de la mucosa masticatoria que recubre la apófisis alveolar y rodea la porción cervical de los dientes, adquiere su forma y textura definitivas con la erupción dentaria. La encía sana presenta un color rosado claro con un puntuado intenso (Newman, Takei, Klokkevold, & Carranza, 2014).

La encía se divide en tres según su ubicación:

1.1.1.1 Encía marginal o libre

Se encuentra en la parte terminal o borde de la encía que recubre el diente hacia coronal.

1.1.1.2 Encía insertada o adherida

Está separada de la encía marginal por un surco no tan profundo, Es firme, resilente y está fijada con firmeza al periostio subyacente del hueso alveolar.

1.1.1.3 Encía interdental o interproximal

Se localiza en el espacio interproximal debajo del área de contacto, puede tener forma de “col” muestra una depresión a modo de valle que conecta una papila vestibular y otra lingual y se ajusta a la morfología del contacto interproximal o en forma piramidal hallándose inmediatamente por debajo del punto de contacto (Newman, Takei, Klokkevold, & Carranza, 2014).

1.1.2 Ligamento periodontal

Es un tejido blando altamente vascularizado que rodea toda la raíz y se adhiere al hueso, extendiéndose al tejido conectivo de la encía, formando un espacio en forma de un reloj de

arena y es más angosto a nivel del centro de la raíz. El espesor del ligamento periodontal es de 0,25 mm aproximadamente (entre 0,2 y 0,4 mm). Permite que las fuerzas generadas durante la función masticatoria y otros contactos dentarios se distribuyan sobre la apófisis alveolar y sean absorbidas por ésta mediante el hueso alveolar propiamente dicho. El ligamento periodontal también es esencial para la movilidad de los dientes (Lindhe, Karring, & Araújo, 2009).

1.1.3 Hueso alveolar

El hueso alveolar corresponde a las porciones de los huesos maxilares que rodean y contienen los alveolos dentarios. La porción del hueso alveolar que limita directamente al alveolo pertenece al periodonto de inserción, junto con el cemento y el ligamento periodontal, formando la articulación alveolodentaria o aparato de fijación del diente (Eley, M. Soory, & Manson, 2012).

1.1.4 Cemento

El cemento es un tejido conectivo duro, recubre las superficies radiculares. Su matriz orgánica, consta principalmente de colágeno y sustancia fundamental, está mineralizada en un 65% (hidroxiapatita). A diferencia del hueso, el cemento no está vascularizado.

Las células asociadas con el cemento son los cementoblastos, que forman la matriz orgánica (fibras colágenas intrínsecas, extrínsecas y mixtas). Cuando se forma el cemento, los cementoblastos se retiran dejando atrás la matriz cementoide. El depósito del cemento se verifica en forma fásica a lo largo de la vida; alternando períodos de actividad y descanso (Lindhe, Karring, & Araújo, 2009).

1.2 ENFERMEDAD PERIODONTAL

Se refiere así, a las patologías bucales infecciosas crónicas que afectan y destruyen los tejidos periodontales (encía, ligamento periodontal y hueso alveolar). La gingivitis y

periodontitis son enfermedades que inician con una proliferación bacteriana que se encuentra en la placa dental y se da a nivel local sobre uno o varios dientes, las toxinas que generan estas bacterias irritan, inflaman las encías e incluso puede causar la pérdida de los mismos (Genco & Williams, 2011).

Arie Jan (2018) menciona que “cuando las bacterias periodontopatógenas colonizan y se diseminan en los tejidos sanos pueden causar inflamación y formación de abscesos, provocando infecciones agudas o crónicas, que pueden dar lugar a patologías altamente mortales, como la endocarditis y los abscesos cerebrales”

Las lesiones ocasionadas por la enfermedad periodontal se pueden encontrar todos los tipos conocidos de bacterias, incluyendo bacterias Gram positivas y Gram negativas aerobias, anaerobias facultativas y anaerobias estrictas. Las bacterias presentes permanentemente se conocen como microbiota residente, mientras que las especies presentes de forma temporal se denominan microorganismos transitorios (Herrera, Meyle, & Jin, 2018).

La cavidad oral presenta una microbiota normal a manera de una barrera natural frente a la invasión de bacterias externas que pueden causar daños al hospedador, creando una resistencia frente a la colonización y formando parte del sistema de defensa de la cavidad oral. En el momento que se altera el equilibrio natural entre huésped (microbiota natural) y el hospedador, puede aparecer una patología como sucede en la enfermedad periodontal (Winkelhoff, Van, Abbas, Siebers, & Théke, 2018).

1.3 EPIDEMIOLOGIA A NIVEL MUNDIAL

Las enfermedades periodontales como la gingivitis y periodontitis, son de gran prevalencia a nivel mundial, y constituyen un problema de salud pública, por su impacto en la calidad de vida.

Se estima que la periodontopatía grave es la undécima enfermedad más prevalente en el mundo. Según la OMS (2018) “ las estimaciones publicadas en el estudio sobre la carga mundial de morbilidad 2016, las enfermedades bucodentales afectan a la mitad de la población mundial (3580 millones de personas)”.

Existen una serie de criterios con fines de establecer si la enfermedad periodontal puede ser considerada un problema de salud pública, los cuales ha llevado a las organizaciones a determinar qué afecta en gran manera al individuo y causa un gran impacto social.

Romero & Hernández, (2018) argumentan que la "enfermedad oral representa en términos de la OMS, un gran desafío para la salud pública derivándose su importancia principalmente de la carga global de morbilidad, los costos relacionados con su tratamiento (siendo considerada la patología oral, la cuarta más costosa de tratar) y de la posibilidad de aplicar medidas eficaces de prevención”.

1.4 ETIOLOGÍA

El proceso patógeno de la enfermedad periodontal es de origen infeccioso, esto se les atribuye a las diferentes especies de bacterias que se encuentran asociadas con esta patología como son las Gram negativas anaerobias que crecen dentro del surco gingival, también se relaciona con otros factores biológicos, genéticos y ambientales que van a coadyuvar a la evolución de la enfermedad periodontal.

Se menciona que en la cavidad oral existe una gran variedad de microbiota cerca de 500 especies, estos microorganismos son identificados frecuentemente como agentes patógenos. Diego M. Bonilla y colaboradores (2016) mencionan que “los microorganismos más frecuentemente identificados como agentes patógenos periodontales incluyen siete especies anaeróbicas: *Porphyromonas Gingivalis*, *Bacteroides Forsythia*, *Treponema Denticola*, *Prevotella Intermedia*, *Fusobacterium Nucleatum*, *Eubacterium*, Y *Espiroquetas*, y tres

especies microaerófilas: Actinobacillus Ctinomycetemcomitans, Campylobacter Rectus, Y Eikenella Corrodens”.

Las bacterias causantes de la enfermedad periodontal pueden clasificarse en grupos, en función de las asociaciones que entre ellas se establecen a la hora de colonizar el surco periodontal (Caballero, 2010).

- Amarillo: bacterias del género *Streptococcus*.
- Verde: *Capnocytophaga Spp, Actinomyces Actinomicetemcomitans Serotipo A, E. Corrodens Y Campylobacter Concisus*.
- Púrpura: *Actinomyces Odontoliticus, Veillonella Parvula*.
- Azul: *Actinomyces Spp*.
- Naranja: *Campylobacter Gracilis, Campylobacter Rectus, Eubacterium Nodatum, Campylobacter Showae, Fusobacterium Nucleatum, Fusobacterium Periodonticum, Peptostreptococcus Micros, Prevotella Intermedia, Prevotella Nigrescens Y Streptococcus Constellatus*.
- Rojo: *Treponema Forsythensis, Treponema Denticola Y Porphyromonas Gingivalis*.

Bacterias que no pertenecen a ningún cluster, como es el caso de *Actinomyces Actinomycetemcomitans Serotipo B*.

Se han reconocido tres microorganismos: *T. Forsythia, Porphyromona Gingivalis* y *T. Denticola*, como los patógenos más fuertemente asociados con la enfermedad periodontal severa, estos causan sangrado y daño en tejidos. Además de la enfermedad periodontal, *P. Gingivalis* ha demostrado estar relacionada con otras patologías de alta prevalencia como la artritis reumatoide y la aterosclerosis (Diego M. Bonilla, Rojas, Jairo, Roberto, & Nerio, 2016).

1.5 BIOFILM

Estudios mencionan que la causa que inicia la periodontitis son las placas de biopelículas, Lu Jia y colaboradores argumentan que las bacterias altamente relevantes para la periodontitis son la *Porphyromonas Gingivalis* (*P. Gingivalis*), un anaerobio gramnegativo y componente del "complejo rojo" (categorizado junto con *Tannerella Forsythia* y *Treponema Denticola*), se ha demostrado irrefutablemente que es el patógeno clave subyacente a la patogénesis de la periodontitis crónica (PC) (2019).

Como se mencionó antes las alteraciones en el ambiente de la microbiota presente en el huésped generara respuestas inflamatorias e inmunitarias, ocasionando que los patógenos oportunistas se multipliquen y se vuelvan dominantes como en el caso de la *P. Gingivalis*, alterando así la homeostasis entre los microorganismos simbióticos y el huésped, promoviendo el desarrollo. de periodontitis e incluso enfermedades sistémicas desencadenantes (Lu, Nannan, Juan, & Luo, 2019).

CAPITULO II

2.1 PORPHYROMONAS GINGIVALIS

2.1.1 Taxonomía

La *Porphyromonas Gingivalis* (*P. Gingivalis*) es una bacteria de genero bacteroide agente etiológico clave de la periodontitis, contribuye a la colonización bacteriana en la cavidad bucal, liberando proteasas que degradan las proteínas tisulares y plasmáticas facilitando la invasión de los tejidos periodontales (Otal & Cuadras, 2017).

Estas especies se caracterizan por ser no fermentadas, utilizando sustrato el nitrógeno y obteniendo energía a partir de la triptocasa y peptona. En la actualidad se conocen diferentes especies de *Porphyromonas* (Perfecto, Nakata, & Cadillo., 2011).

2.1.2 Morfología y estructura

La *Porphyromonas Gingivalis* es un cocobacilo que mide de 0.5 – 0.8um x 1 – 3,5um anaerobio estricto, Gram negativo, asociado a la etiología de las periodontitis. Este microorganismo tiene una serie de factores patógenos como la fimbria que facilita su adhesión y factores que hidrolizan los tejidos periodontales causando daños tisulares y pérdida de soporte dentario, tales como la secreción de proteasas y hialuronidasas (Mary, Alejandra, Paola, & Erika Muñoz Guarín, 2014).

Esta bacteria periodontopática se encontró en el 85,75% de las muestras de placa subgingival de pacientes con periodontitis crónica., es una bacteria Gram-negativa que forma colonias negro pigmentados en placas de agar sangre, La *P. Gingivalis* es Asacharolítica, su nutrición depende de pequeños péptidos y aminoácidos y requiere de hemina como fuente de hierro. para su crecimiento, el nombre *Porphyromonas* proviene del adjetivo griego Porphyreos que significa púrpura y el sustantivo griego monas que significa unidad. Por lo tanto, la palabra

Porphyromonas significa célula de porfirina ya que las colonias en las placas de agar sangre se vuelven negras después de 6 a 10 días debido a la acumulación de hemo (How, 2016).

2.1.2.1 Estructura de la *Porphyromonas Gingivalis*

Capsula: compuesta por polisacáridos esencial para la síntesis, cumple un rol importante en la evasión del sistema inmunitario eludiendo la fagocitosis, opsonización y accionar del complemento.

Endotoxina: (LPS) presenta en la membrana externa de la bacteria, compuesta en parte por el lípido, interviene en la homeostasis inmunológica del huésped, ocasiona inflamación, destrucción de tejidos, reabsorción del hueso alveolar y causa de liberación de prostaglandinas.

Vesículas de membrana externa: son sacos cerrados que están en la parte más interna de la bacteria, presenta enzimas, fosfolipasas C, proteasas, fosfatasa alcalina, hemolisinas, lipopolisacarido, estas son liberadas produciendo daño a los neutrófilos y las células periodontales.

Hemaglutininas: son proteínas que ayudan a la colonización bacteriana.

Fimbrias: Presentes en forma peritrica de 0.3 a 3.0 um de largo y 5 nm de ancho, presentan capacidad de unirse a diferentes sustratos, moléculas, y células, como epitelial, fibrinogeno, fibronectina, lactoferrina.

Proteinasas cisteinproteasas: Son compuestos bacterianos que proporcionan nutrientes para el crecimiento bacteriano, produciendo un daño colateral al huésped, degradando colágeno de diferentes tipos (J, J, S, & C, 2012).

2.1.3 Factores de virulencia

Los factores de virulencia son moléculas que causan daño al huésped a través de su evolución y colonización en el ciclo de vida del organismo (bacterias, virus, hongos y

protozoos), lo que aumenta su efectividad. Implican principalmente las siguientes funciones: colonización en el huésped; escape inmune; inmunosupresión; entrada y salida celular; extracción de nutrientes del huésped; y liberación de factores de virulencia (How, 2016).

2.1.4 Fisiopatología

P. Gingivalis es considerado un colonizador secundario, comensal del surco gingival, que llega por contagio o transmisión por individuos infectados, por medio de la saliva principalmente. Tiene la capacidad de adherirse especialmente por sus fimbrias, también por medio de vesículas de la membrana, hemaglutininas, la cápsula, le permiten la colonización del surco, y se adapta e invade las células epiteliales en un periodo aproximado de 20 minutos, replicándose dentro de ellas y diseminándose en las células a su alrededor. Logrando evadir las defensas del huésped y degrada diversas proteínas, componentes del surco gingival, ligamento periodontal y hueso alveolar, además de alterar la respuesta innata y específica del anfitrión (Perfecto, Nakata, & Cadillo., 2011) .

CAPITULO III

Desde la antigüedad se ha utilizado las plantas en el uso medicinal, de la misma manera se utilizan también los frutos de estas plantas ya que poseen diversos compuestos bioactivos que ejercen efectos farmacológicos terapéuticos.

3.1 FITOQUÍMICA

Es una especialidad de la farmacognosia encargada de determinar los componentes activos de las plantas o vegetales que pueden ser beneficiosos para la salud del ser humano.

Los alimentos además de aportar nutrientes, contienen una serie de sustancias que pueden ser protectores contra enfermedades crónicas, dichos alimentos se han denominado fitoprotectores, compuestos bioactivos o fitoquímicos. Estos nutrientes se encuentran abundantemente en frutas, verduras y en productos lácteos obtenidos por fermentación. En la actualidad se ha despertado el interés por el uso de la medicina naturista para el tratamiento de diversas afecciones.

Los fitoquímicos bioactivos: se denominan también alimentos funcionales ya que, además del componente nutricional, también poseen efectos farmacológicos aplicables para el tratamiento de infecciones bacterianas, fúngicas y enfermedades crónico degenerativas como diabetes y cáncer. Estos componentes bioactivos han sido comercializados en diversas formas concentradas como los extractos, píldoras, pastillas, cápsulas o tónicos (Serrano, López, & Espuñes, 2006).

3.2 ARÁNDANO

El *Arándano azul o Blueberry Biloxi (Vaccinium corymbosum L.)* es uno de los frutales comerciales más recientemente domesticado en el Ecuador. Esta planta es proveniente de Carolina del Norte está en una zona de transición entre las especies de arándano alto

(*Vaccinium corymbosum*) y Arándano ojo de conejo (*V. virgatum Aiton*), por lo que ha desarrollado un germoplasma en el cual confluyen no sólo estas dos especies que son la base de la industria del arándano, sino que ha sido ampliado con la introgresión de otras especies del género *Vaccinium* (*V. Constablaei*, *V. Darrowii Camp*, *V. Elliottii Chapm.*, *V. Pallidum Aiton*, *V. Simulatum Small*, *Y V. Tenellum Aiton*) (Díaz & Schuldes, 2013).

Cerca del año 2015 empresarios importaron desde los Estados Unidos al Ecuador, plantas pequeñas de arándanos, con el fin de trabajar en una nueva alternativa de cultivo poco conocida en el país, por esta razón la producción de arándanos en Ecuador es de data reciente y es cultivada en climas de Sierra y Costa, en zonas de altas temperaturas por el día y bajas en las noches (González P. , 2018).

El arándano es un fruto con un toque cítrico que crece en arbustos, produce una variedad liberada en el mercado, denominada Biloxi, que se presta a las condiciones climáticas de la línea ecuatorial y que puede sembrarse a una altura de hasta 2 800 metros sobre el nivel del mar.

3.2.1 Taxonomía

El arándano es un arbusto pequeño de 0.2-0.4 metros de altura, cuyo nombre científico es arándano *Vaccinium Myrtillus sp.*, perteneciente a la familia *Ericaceae* de la especie *Southern Highbush Blueberry* entre sus variedades encontramos el Biloxi, este posee una fruta de mediano tamaño, de color azul claro, muy firme y de excelente sabor. La planta es de hábito erecto, muy vigorosa y productiva (Díaz & Schuldes, 2013) (Gutiérrez & Baracaldo, 2012).

3.2.2 Morfología

Raíz: bajo tierra se desarrolla una red de raíces superficiales y retoños rastreros, dando origen a cepas rectas, cuadrangulares, muy ramificadas, cuya parte más vieja está recubierta por una fina corteza gris. Dichas raíces son, generalmente fibrosas, finas y carentes de pelos

absorbentes. En condiciones naturales, las raíces están asociadas con micorrizas formando simbiosis.

Tallo: Presenta un pequeño tallo subterráneo (corona), recto, cuadrangular y muy ramificado. Generalmente son de color marrón-anaranjado, según la especie.

Hoja: Presenta hojas simples, alternas, con forma elíptico lanceoladas, márgenes dentados y peciolo corto. Son de color verde cuya intensidad varía dependiendo de la especie. En otoño, adquieren un tono rojizo típico en la especie.

Flores: Presentan inflorescencias en racimos de 6-10 flores por yema. Las flores individuales son pequeñas, axilares, con el cáliz compuesto de 4-5 sépalos obtusos y la corola blanca formada por 4-5 pétalos fusionados dando lugar a una forma acampanada. El pistilo es simple, de ovario ínfero y estambres en grupos de 8-10.

Fruto: El fruto se trata de una falsa baya de forma esférica, color azul, rojo o negro en su madurez según la especie. La epidermis del fruto está cubierta de secreciones cerosas. El tamaño de éste está relacionado con el grosor de la rama y la posición en la misma, siendo de menor diámetro aquellos que se encuentran más distales de ésta (González, y otros, 2017) (Agrinova, 2017).

3.2.3 Composición

La Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos, según sus estándares, considera a estas bayas como frutos con bajo contenido de grasa y sodio, rico en fibras, vitaminas y libre de colesterol, refrescante, tónico, astringente, diurético y con vitamina C.; además de ácido hipúrico, lo que determina que sea una fruta con muchas características deseables desde el punto de vista nutricional (Coronel & Carla Verdugo. Maria Fernanda Paredes, 2012) .

Tabla 1 Valor nutricional

Composición nutricional del arándano cada 142 gr.			
Calorías	100 kcal	Zinc	0.16 mg
Proteínas	0.97 gr	Cobre	0.09 mg
Grasas	1.0 gr	Manganeso	0.41 mg
Carbohidratos	20.5 gr	Vitamina C	18.9 mg
Fibra	3 gr	Tiamina	0.07 mg
Calcio	9.0 mg	Rivoflavina	0.07 mg
Hierro	0.24 mg	Niacina	0.25 mg
Magnesio	7.0 mg	A. Pantoténico	0.13 mg
Fósforo	15 mg	Vitamina B6	0.05 mg
Potasio	129 mg	Folacina	9.3 mg
Sodio	9 mg	Vitamina A	145.0 U

(Expofresh, 2019)

3.2.4 Propiedades del Arándano

Han demostrado la efectividad del arándano en el uso medicinal debido a su concentración fitoquímica, los estudios sobre el efecto del arándano en la salud se han concentrado principalmente en el tracto urinario, sistema cardiovascular, la salud oral y los epitelios gastrointestinales. Las bayas, incluidos los arándanos, representan una rica fuente de bioactivos fenólicos que pueden contribuir a la salud humana.

El arándano es una fuente particularmente rica de (poli) fenoles, que se han asociado in vitro con propiedades antibacterianas, antivirales, antimutagénicas, anticancerígenas, antitumogénicas, antiangiogénicas, antiinflamatorias y antioxidantes. Estudio In vivo, demuestran que los extractos de arándano pueden reducir la proteína C reactiva (PCR) 11e interleucinas proinflamatorias, de igual manera aumentan la síntesis de NO; disminuir la enzima convertidora de angiotensina, la angiotensina II y el receptor de angiotensina II tipo 1; ayudando a suprimir la infección por *Helicobacter Pylori*; y mejorar la capacidad de respuesta a la glucosa de las células β pancreáticas y la masa funcional de las células β (Blumberg, y otros, 2013).

3.2.4.1 *Flavonoles*

Los *flavonoles* en los arándanos consisten principalmente en glucósidos de quercetina, miricetina y, en menor cantidad, kaempferol. La quercetina -galactósido es la forma más abundante⁴. El contenido total de flavonoles de los arándanos rojos es consistentemente elevado, incluso al compararlo con el contenido de frutos como el arándano azul (*Vaccinium corymbosum*) y la zarzamora (Bonifait & Grenier, 2010).

Una exploración reciente considera a los arándanos como la fuente más abundante de flavonoles de entre treinta alimentos vegetales conocidos por contener estos componentes bioactivos. Los flavonoides se les puede observar como pigmentos de color blanco y amarillo en las plantas, que presentan intensas propiedades antioxidantes, por lo cual son muy eficaces en disminuir el riesgo de padecer cáncer. Además, se les atribuye efectos broncodilatadores, y protectores sobre la salud cardiovascular (Flórez, Gallego, Culebras, & Tuñón, 2002) (Russo & Sánchez, 2006).

3.2.4.2 *Antocianinas*

Son un grupo de pigmentos de color rojo, abundantemente repartidos en el reino vegetal. El arándano es uno de los alimentos inusuales que comprende glucósidos de las 6 agliconas de la familia de las antocianinas: *cianidina*, *peonidina*, *malvidina*, *pelargonidina*, *delfinidina* y *petunidina*. Las antocianinas predominantes son los 3-O-galactósidos y los 3-O-arabinósidos de *cianidina* y *peonidina*. El contenido de antocianinas de arándano se incrementa con la maduración y también depende del cultivar y tamaño del fruto (Luz, Ana, Carlos, & Antonio, 2014).

Estudios presentan evidencia científica de que, durante el trayecto del tracto digestivo al torrente circulatorio de los mamíferos, las antocianinas se mantienen intactas y cultivan efectos beneficiosos tales como: decrecimiento de la enfermedad coronaria, efectos anticancerígenos, antiinflamatorios, antidiabéticos, mejora de la agudeza visual y de la conducta cognitiva (Torres & Matías, 2005).

3.2.4.3 *Proantocianidinas (PACs)*

Son oligómeros o polímeros de flavan-3-oles³. Las PACs del arándano contienen *epicatequina*, *epicatequina galato* y *catequina*, y por lo menos tres tipos de enlaces: dos enlaces de tipo B comunes y el poco frecuente enlace de éter de tipo A. La diferenciación entre los enlaces de tipo A y B es trascendental, pues las PACs tipo A presentan una acción antiadherente contra la *Escherichia Coli Fimbriada* tipo P en la mucosa urotelial. Se estima que entre el 51 y el 65% de las PACs de arándanos presentan al menos un enlace de tipo A. Los enlaces tipo A son muy infrecuentes en los alimentos, los cacahuets y las ciruelas son los únicos otros alimentos que contienen este tipo de enlaces, aunque cabe resaltar que en niveles muy bajos algunos de los beneficios de las *proantocianidinas* sobre la salud son: efectos antioxidantes, anticancerígenos, antialérgicos, antibacteriales, protección cardiovascular. (Blumberg, y otros, 2013)

3.2.5 Mecanismo de acción

Diversos mecanismos pueden intervenir en el efecto favorable del consumo de arándano ya que sus componentes bioactivos como los flavonoides, especialmente las antocianinas coloreadas, los abundantes *flavonoles* y las *proantocianidinas*, han sido de mayor interés en la investigación de este fruto. Otros componentes activos notables incluyen ácidos fenólicos, benzoatos, ácidos hidroxicinámicos, terpenos y ácidos orgánicos los cuales interfieren en la adhesión de las bacterias. Las evidencias demuestran mediante estudios *in situ* e *in vitro* la acción protectora de los componentes fotoquímicos del arándano contra varios patógenos bacterianos, cáncer, enfermedades cardiovasculares e inflamación, en la actualidad se revisa la acción neuroprotectora y la actividad antiviral (E & KM, 2009)

La actividad de las *proantocianidinas* tipo A del arándano interrumpen la colonización de las bacterias antes de que éstas invadan como en el caso de las afecciones de tipo urinario. El principal efecto antibacteriano es inhibir la adherencia de bacterias a las células epiteliales. También se ha demostrado *in vitro* que estas *proantocianidinas* modifican la superficie celular

de las bacterias al capturar los lipopolisacáridos de la pared celular y modificar los patrones de unión a las células epiteliales (Neri, Celis, Jaen, Gutiérrez, & Eréndira, 2009).

CAPITULO IV

4.1 CLORHEXIDINA 0,12%

Actualmente existen colutorios empleados en el control de la placa bacteriana, inhibiendo químicamente la formación o proliferación de esta. La *Clorhexidina* al 0,12% (CHX) es un agente antimicrobiano utilizado con bastante frecuencia por su eficacia en la eliminación de microorganismos periodonto patógenos y cariogénicos. Su eficacia puede atribuirse a sus efectos bactericidas y bacteriostáticos y su sustantividad dentro de la cavidad oral (M, y otros, 2018).

Clorhexidina fue desarrollada en la década de los 40 por Imperial Chemical Industries en Inglaterra por científicos que realizaban un estudio sobre la malaria. En ese momento los investigadores fueron capaces de desarrollar un grupo de compuestos denominados polibisguanidas, que demostraron tener un amplio espectro antibacteriano y salió al mercado en 1954 como antiséptico para heridas de la piel (López, Álvarez, & Morales, 2009).

Torres y colaboradores (2017), mencionan que “el estudio definitivo que introdujo la clorhexidina en el mundo de la periodoncia fue el realizado por Løe y Schiott en 1970, donde se demostró que un enjuague de 60 segundos dos veces al día con una solución de gluconato de clorhexidina al 0,2% en ausencia de cepillado normal, inhibía la formación de placa y consecuentemente el desarrollo de gingivitis”.

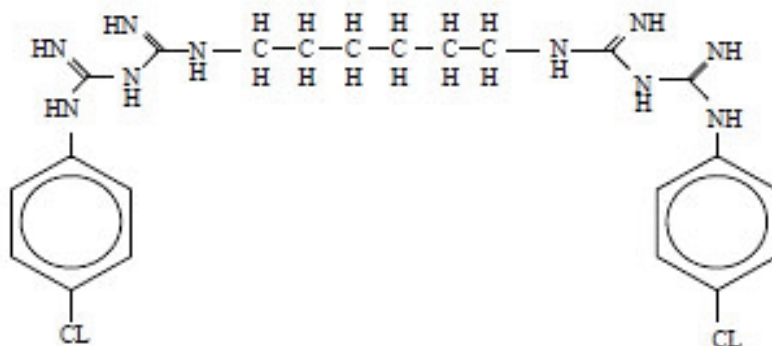
4.1.1 Mecanismo de acción

La actividad antimicrobiana es atribuida a su unión y disrupción de la membrana citoplásmica, que alteran el equilibrio osmótico y causan precipitación de los contenidos celulares. La clorhexidina es ampliamente activa contra bacterias Gram positivas, Gram negativas, anaerobias facultativas y aerobias, y, en menor medida, contra hongos y levaduras. Se une fuertemente a la membrana celular bacteriana, lo que a bajas concentraciones produce

un aumento de la permeabilidad con filtración de los componentes intracelulares incluido el potasio (efecto bacteriostático), en concentraciones más altas produce la precipitación del citoplasma bacteriano y muerte celular (efecto bactericida). En boca se adsorbe rápidamente a las superficies, incluidos los dientes con película adquirida, proteínas salivales y a la hidroxiapatita (Maya, Ruiz, Pacheco, Valderrama, & Villegas, 2011) .

4.1.2 Propiedades físico-químicas

La *Clorhexidina* es una molécula bicatiónica simétrica, es un dímero proguanil por lo que se dice que es una biguanida, la cual está conectada por una cadena central hexametileno. En cada extremo se enlaza un radical paraclorofenil (2 anillos 4 clorofenil), resultando su nombre completo: paraclorofenilbiguanida, es poco soluble en el agua, por lo que se utiliza bajo forma de sales (diacetato, diclorhidrato, digluconato). De estas tres, el digluconato es la más soluble en agua y alcoholes (Arévalo, y otros, 2011).



4.1.3 Concentraciones

La *Clorhexidina* suele presentarse en dos concentraciones, al 0,12% y al 0,2%, se recomienda realizar un buche con 10ml de producto a una concentración del 0,2% y de 15ml

al 0,12%. Esto es debido a la dosis total de clorhexidina, ya que 10ml al 0,2 % libera 20mg, y 15ml al 0,12% libera 18mg (Bascones & Morante, 2006).

4.1.4 Propiedades antimicrobianas

Las soluciones de clorhexidina son bactericidas y fungicidas a partir de su concentración, es ampliamente activa contra bacterias Gram positivas, Gram negativas, anaerobias facultativas, aerobias y en menor medida, contra hongos y levaduras. Tiene escasa actividad contra *Mycobacterium tuberculosis* y no es esporicida. Una de sus características más sobresalientes es su actividad in vitro contra virus encapsulados, tales como el herpes simple, el VIH, el *citomegalovirus*, el de la influenza y el virus sincitial respiratorio, aunque presenta menor actividad contra virus no. No es esporicida, aunque inhibe el crecimiento de las esporas, y su acción sobre Micobacterias es bacteriostática, ya que estos microorganismos son altamente resistentes (Maya, Ruiz, Pacheco, Valderrama, & Villegas, 2011).

4.1.5 Aplicaciones

Antisepsia de la piel en solución acuosa al 4% con base detergente para el lavado corporal pre quirúrgico del paciente y lavado de manos quirúrgico. También, y en solución acuosa al 5%, para antisepsia del campo quirúrgico. Por su afinidad con la piel tiene una acción remanente de varias horas de duración. Sobre heridas se utiliza a la concentración 0.1 o 0,5% en solución acuosa, puede emplearse en quemaduras (ya que puede mezclarse con antibióticos de acción sinérgica) y en higiene del personal hospitalario (Arévalo, y otros, 2011)

Se ha valorado su uso especialmente por sus beneficios en la higiene bucal y como irrigante en tratamientos periodontales, endodoncia, ortodoncia, cirugía oral y implantología ayudando al mantenimiento de la asepsia evitando la acumulación de placa bacteriana, formación de cálculos y al riesgo de desarrollar mucositis o periimplantitis, disminuyendo los contaminantes bacterianos en cirugía (López, Álvarez, & Morales, 2009).

4.1.6 Toxicidad y otros efectos secundarios

No se ha evidenciado hasta el momento toxicidad sistémica por aplicación o ingestión, no se ha descrito resistencia bacteriana. El uso prolongado en boca produce un leve desplazamiento de la flora hacia microorganismos menos sensibles, que desaparece poco después de suspender el uso.

Su efecto adverso más común es la pigmentación marrón de los dientes, de algunos materiales de restauración y de las mucosas, sobre todo del dorso de la lengua.

Otro efecto secundario descrito frecuentemente es la alteración del gusto, que podría reducirse evitando enjuagarse con agua después de la aplicación de *Clorhexidina*. De igual manera la FDA reportó en el 2017 “reacciones alérgicas poco comunes pero graves con los ampliamente utilizados productos antisépticos tópicos que contienen gluconato de clorhexidina” y creó una alerta donde solicita a los fabricantes de productos antisépticos tópicos con componente CHX registrar en su etiqueta que es solo de venta médica ((FDA), 2017).

Sin embargo, los efectos adversos de CHX limitan el uso a largo plazo de este agente antiséptico e incluyen alteración del gusto, formación excesiva de cálculo supragingival, lesiones de tejidos blandos en pacientes jóvenes, respuestas alérgicas y manchas de dientes y tejidos blandos. Este tipo de decoloración, especialmente en las áreas interproximales, y la lengua a menudo son causadas por una reacción de precipitación entre la clorhexidina unida al diente y los cromógenos de los alimentos o bebidas (Najafi, y otros, 2012).

CAPÍTULO V

5.1 MEDIOS DE CULTIVO

La utilización de los medios de cultivo se inició con las investigaciones de Koch utilizando en un primer momento rodajas de patata como soporte nutritivo sólido, pero no tardó en recurrir al caldo de carne líquido, diseñado por Loeffler, al que, en 1881, añadió gelatina, logrando un medio sólido transparente ideal para la observación de la morfología macroscópica de las colonias microbianas. De esta manera las bacterias para garantizar su multiplicación deben sembrarse en medios de cultivo que contengan sustancias ideales para obtener su energía y sustratos que permitan realizar la biosíntesis que permitirá su reproducción y multiplicación (Borrego, 2018).

Los medios de cultivo son una mezcla de compuestos orgánicos e inorgánicos disueltos en agua que sirven para el crecimiento bacteriano, estos pueden ser medios sólidos o líquidos.

5.1.1 Clasificación medios de cultivo

Medios líquidos: son caldos obtenidos mediante fusiones de carnes o peptona, que son utilizados para la activación y multiplicación bacteriana.

5.1.1.1 Medios sólidos

Se preparan en un medio líquido (agua destilada) se agrega polvo de agar, que es una sustancia polisacárido obtenida de las algas marinas, al enfriarse se forma una sustancia gelatinosa pasando a su estado sólido, estos permiten el aislamiento de las bacterias cuando se siembran por técnica de agotamiento.

5.1.1.2 Medios usuales

Son medios líquidos simples que contienen los nutrientes básicos para permitir el crecimiento de un determinado tipo de microorganismo sin llegar a inhibir totalmente el crecimiento de los demás.

5.1.1.3 Medios enriquecidos

Son medios sólidos a los cuales se adiciona componentes como sangre, hemina, L-cisteína suero, vitaminas, amino ácidos u otros componentes ricos en compuestos orgánicos provenientes de animales o plantas, al caldo o agar nutritivo, les proporciona sustancias nutritivas complementarias que permiten el cultivo de organismos heterótrofos exigentes.

5.1.1.4 Medios selectivos

Añadiendo al agar nutritivo ciertos productos especiales, puede impedirse el desarrollo de algunos grupos bacterianos sin inhibir otros. Las sustancias inhibidoras pueden ser sales biliares, cloruro sódico, telurito, potasio entre otros.

5.1.1.5 Medios selectivos diferenciales

Estos además de tener sustancias inhibidoras también se complementan con sustancias que darán una coloración a las colonias para diferenciar la especie bacteriana (Prats, 2012).

5.1.2 Siembra y recuento de microorganismos

Sembrar o inocular es implantar artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano. Para sembrar es necesario estar en un laboratorio sin corrientes de aire y mantener en el área de trabajo cerca a unos 10 a 15cm máximo un mechero. También se puede trabajar bajo campana, o en flujo laminar, previa esterilización con luz UV. La siembra puede realizarse en medio líquido, sólido o semisólido, utilizando ansa, hilo, o bien hisopo o pipeta estéril. Se debe esterilizar en la llama (hasta que todo el filamento se haya puesto al rojo vivo) el ansa o el hilo y enfriar, antes y después de

realizada la siembra, actualmente se encuentra en el mercado las ansas plásticas estériles listas para inocular (Cuevas, 2016) .

5.1.3 Sistemas de incubación en anaerobiosis

Estos sistemas consisten en extraer todo el oxígeno presente en un recipiente destinado a crear un espacio anaerobio. Su elección viene determinada por el coste, número de cultivos y limitaciones de espacio. Los más comunes son las cámaras, jarras o cajas y bolsas de anaerobiosis. Las jarras son recipientes cilíndricos, de metal o de plástico rígido, que deben cerrarse herméticamente y en los que la atmosfera anaerobia se obtiene entre 1 y 2 horas después de introducir unos sobres en los que, al añadir H₂O se libera H₂ y CO₂. El H₂ se combina con el oxígeno existente formando agua gracias a la presencia de un catalizador. Actualmente existen sistemas en los que no hace falta añadir H₂O o introducir el catalizador (*Anaerogen, Oxoid*). También se logra un medio anaerobio si se utiliza una jarra hermética a la que se introduce una vela que consumirá todo el oxígeno presente en menor tiempo (Alcalá, Betriu, Sánchez, & Reig, 2004).

5.1.4 Preparación del inóculo

A partir de un cultivo en placas de agar sangre enriquecido para anaerobios, de 24 horas o del tiempo necesario para conseguir colonias de por lo menos 1 milímetro de diámetro, se suspenden de 3 a 5 colonias en un medio líquido (suero fisiológico o tioglicolato) y se ajusta la turbidez a una densidad equivalente al 0,5 de la escala turbidométrica de McFarland.

5.2 MEDIOS DE CULTIVO PARA ANAEROBIOS ESTRICTOS

5.2.1 Agar Mueller-Hinton

Es un medio de cultivo rico, diseñado especialmente para hacer ensayos de sensibilidad y recomendado por el Comité de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre

estandarización de pruebas de susceptibilidad. Este Comité lo propuso ya en 1970 para determinar la susceptibilidad de los microorganismos frente a los antimicrobianos, por no llevar incorporados inhibidores de los antimicrobianos, como, por ejemplo, el PABA (ácido p-amino benzoico), que anula la actividad de sulfamidas y antibióticos y debido a su reproducibilidad y aceptación por las personas que trabajan en este campo. Desde entonces su empleo se ha generalizado.

5.2.2 Agar sangre con suplementos para anaerobios

Es un medio muy rico que permite el crecimiento de todos los microorganismos con importancia clínica excepto el de los más exigentes. Se prepara añadiendo un 5% de sangre desfibrinada (humana, oveja, caballo, conejo, etc.) Es un medio, sin inhibidores, que permite el desarrollo de gran cantidad de especies anaerobias. Contiene un agar base, como el agar Columbia, adicionado de sangre hemina y vitamina K₁ (Alcalá, Betriu, Sánchez, & Reig, 2004).

5.3 TINCIÓN DE GRAM PARA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN CULTIVOS

Es un procedimiento empleado en los laboratorios donde se manejan pruebas microbiológicas. Utiliza dos coloraciones para clasificar las bacterias en dos grupos las Gram negativas y las Gram positivas. La tinción de Gram se basa en colocar como colorante primario cristal violeta, que tiene afinidad con el peptidoglicano de la pared bacteriana, luego se coloca que sirve como mordiente e impide la salida del cristal violeta por la formación de un complejo cristal violetayodo que satura los espacios del peptidoglicano de la pared bacteriana. En seguida, se coloca una mezcla de alcohol-acetona, la cual deshidrata la pared bacteriana y cierra los poros de la misma, también destruye la membrana externa de las bacterias Gram negativas debido a que ésta es soluble a la acción de solventes orgánicos, como la mezcla de alcohol acetona. Las bacterias Gram positivas, al contener una gran cantidad de peptidoglicano, retienen con mayor fuerza este complejo, mientras que las Gram negativas no lo pueden retener

por tener menos cantidad de peptidoglicano. Por último, se coloca safranina, la cual funciona como un colorante secundario o de contratinción y sirve para teñir las bacterias que no pudieron retener el complejo cristal violeta-yodo (Jácome, Durán, & Castro, 2014).

METODOLOGÍA

El presente estudio se llevó a cabo en la ciudad de Loja, Provincia de Loja que se encuentra al sur del Ecuador, en las instalaciones del Centro De Análisis Químico de La Universidad Nacional de Loja y el laboratorio de análisis microbiológico de la Clínica Medilac

Tipo de diseño

Para esta investigación se realizó un estudio in-vitro que se ejecutó en una cepa de *Porphyromona Gingivalis*.

Experimental: esto se debe a que la variable de estudio (*Porphyromona Gingivalis*) dada por el investigador, en este caso se maneja artificialmente a través de activación y reproducción de cepas bacterianas en un laboratorio bajo controles, constatando el aumento o disminución de la variable y su efecto en las conductas observada.

In vitro: se le designa así ya que el proceso que se lleva acabo se realizó en personas o animales y fue ejecutado en el Laboratorio Clínico y Bacteriológico de la CLÍNICA MEDILAC en Loja.

Comparativo: Ya que en la investigación se comparó los grupos de estudio (*Arándano azul Biloxi- Clorhexidina 0,12%*) y se estableció relaciones y diferencias, en un mismo periodo de tiempo.

Población de estudio

La población de estudio fue *Porphyromona Gingivalis* ATCC 33277 que se obtuvo por importación directa de EEUU mediante Laboratorios Medibac y posteriormente se viabilizo

inoculándose en Agar Sangre enriquecido con Vitamina k y hemina y Agar Müller, cultivada en 48 cajas Petri.

Selección de la muestra

No probabilístico intencional, pues antes de incluir a las cepas en el estudio, se determinó si cumplían con los criterios de inclusión.

Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra será de 48 cajas Petri con Agar Sangre enriquecido con Vitamina k y hemina y Agar Müller, inoculadas con *Porphyromonas Gingivalis* ajustados a los estándares de turbidez según la escala de McFarland al 0.5, en cada caja se colocó tres discos: el primer disco fue embebido con 30µl de extracto de *Arándano azul Biloxi* en determinado porcentaje (tintura madre de arándano , extracto arándano al 100%, 75%, 50%,25%,10%), el segundo disco embebido con 30µl de *Clorhexidina* al 0.12 % y el tercer disco en blanco como control negativo, distribuidos de la siguiente manera.

Grupo A:

4 cajas Petri, cada caja con: un disco con *Arándano azul Biloxi* al 10% diluido en etanol al 30%, un disco con *Clorhexidina* al 0.12 % y un disco en blanco como control negativo.

Grupo B:

4 cajas Petri, cada caja con: un disco con *Arándano azul Biloxi* al 25% diluido en etanol al 30% un disco con *Clorhexidina* al 0.12 % y un disco en blanco como control negativo.

Grupo C:

4 cajas Petri, cada caja con: un disco con *Arándano azul Biloxi* al 50% diluido en etanol al 30%, un disco con *Clorhexidina* al 0.12 % y un disco en blanco como control negativo.

Grupo D:

4 cajas Petri, cada caja con: un disco con *Arándano azul Biloxi* al 75% diluido en etanol al 30%, un disco con *Clorhexidina* al 0.12 % y un disco en blanco como control negativo.

Grupo E:

4 cajas Petri, cada caja con: un disco con *Arándano azul Biloxi* al 100% diluido en etanol al 30%, un disco con *Clorhexidina* al 0.12 % y un disco en blanco como control negativo.

Grupo F:

4 cajas Petri, cada caja con: un disco con tintura madre de *Arándano azul Biloxi* al 100% sin disoluciones, un disco con *Clorhexidina* al 0.12 % y un disco en blanco como control negativo.

Grupo G:

24 cajas Petri, cada caja con: un disco de tintura madre de *Arándano azul Biloxi* al 100% sin disoluciones, un disco con *Clorhexidina* al 0.12 % y un disco en blanco como control negativo, de las cuales 12 cajas se observó cambios hasta las 48H y 12 cajas se observó cambios hasta las 96H.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Criterios de inclusión

- Extracto de *Arándano azul Biloxi* (tintura madre diluida en etanol al 30% en concentraciones del 10%, 25%, 50%, 75% y 100% de arándano sin contaminación.
- Extracto de arándano puro liofilizado al 100% sin disoluciones sin contaminación.
- Cajas Petri con agar Sangre enriquecido con Vitamina k y hemina sin contaminación
- Cajas Petri con agar Müller Hilton sin contaminación

- Cepas de *Porphyromonas Gingivalis* ATCC 33277
- Solución antiséptica con Gluconato de *Clorhexidina* al 0.12%
- Discos en blanco estériles

Criterio de exclusión

Cajas Petri con agar Sangre enriquecido con Vitamina k y hemina que hayan sido inoculadas y que sufrieran, fractura o contaminación al momento de la inoculación.

Cajas Petri con agar Mueller Hinton que hayan sido inoculadas y que sufrieran, fractura o contaminación al momento de la inoculación.

Arándano azul Biloxi en estado de descomposición en el proceso de secado y deshidratación.

Tintura madre en diferentes porcentajes que se encuentre contaminada o haya sufrido algún cambio en el procesamiento de la preparación del extracto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales de laboratorio para elaborar el extracto de arándano

- Estufa
- Balón de fondo plano.
- Vaso de precipitado.
- Agua destilada.
- Matraz Erlenmeyer de 250, 500 y 1000 ml
- Matraz Kitasato
- Tubos de ensayo
- Vasos de precipitación 100, 250 y 500 ml
- Probetas de 10, 50 y 500 ml

- Pipetas de 10 y 15 ml
- Capsulas de porcelana
- Envases de vidrio ambar

Equipo

- Equipo de destilación
- Bomba de vacío
- Bandejas de secado
- Balanza analítica 300 gr.
- Termobalanza analítica
- Cronómetro digital
- Trituradora
- Rotaevaporador

Material y equipos para la preparación de los medios de cultivo

- Balanza.
- Agua destilada.
- Probetas.
- Pipetas.
- Refrigeradora.
- Placas Petri.
- Tubos de ensayo.
- Hornilla a gas
- Agar Mueller Hinton
- Agar Base
- Caldo de Tipticasa de Soya

- Agar sangre de Cordero
- Trioglicolato
- Agua destilada
- Asas de siembra metal
- Alcohol.
- Mechero
- Encendedor.
- Jarra de anaerobiosis (anaerojar 2.5lts-Oxoid)

Materiales para la prueba de efecto antibacteriano:

- Extracto etanólico de *Arándano azul Biloxi* al 25%, 50% y 100%.
- Extracto *Arándano azul Biloxi* tintura madre
- *Clorhexidina* al 0,12 % Encident
- Solución salina
- Agua destilada
- Disco blanco OXID
- Estufa
- Incubadora
- Micropipeta digital de 100ul
- Mechero
- Pinzas
- Guantes
- Mascarillas
- Hisopos estériles
- Cajas Petri: Monopetri y bipetri

- Placas Petri con Agar Muller Hinton
- Cajas Petri de Agar sangre
- Discos de sensibilidad en blanco
- Cepa de *Porphyromonas Gingivalis* (ATCC 33277)
- Mechero Bunsen.

Material digital

- Laptop
- Cámara digital Impresora

INFRAESTRUCTURA

Laboratorio análisis fotoquímico del centro de análisis químico de la Universidad Nacional de Loja.

Laboratorio de análisis microbiológico del Hospital Clínica MEDILAC

PROCEDIMIENTOS

Preparación de la tintura extracto de arándano

Se realizó la recolección de los frutos de *Arándano azul Biloxi* proporcionados por la casa Bioarandano y se inició con el proceso de secado, macerado y liofilización al vacío, para luego obtener una tintura madre al 100% y una tintura madre con etanol al 30% en proporción 2:1 conservándose en refrigeración a temperaturas de - 4° centígrados



Figura 1 Fruto de arándano (Fuente: autora)
Figura 2 Corte de arándano (Fuente: autora)

Concentración de la vitamina K

Se toma una solución de 5 ml de Vitamina K como parte del enriquecimiento para el medio de caldo de tripticasa de soya necesario para la activación de la cepa bacteriana *Porphyromonas Gingivalis* ATCC 33277

Concentración y preparación de solución Hemina

Como parte de las soluciones enriquecedoras para el crecimiento de la cepa bacteriana *Porphyromonas Gingivalis* ATCC 33227 se prepara una solución de 5 ml de hemina que es perteneciente al grupo farmacológico hemo resultando una variante de la hemoglobina incapaz de captar oxígeno.

Utilizando 2,5 µg/ ml según las recomendaciones la ficha técnica de la ATCC



Figura 3 Pesaje de cristales de Hemina

Figura 4 Baño María 37° para disolución cristales de Hemina

Figura 5 Agitación de los cristales de Hemina

Preparación del caldo de tripticasa de soya

Para preparar el caldo soya tripticasa medio deshidratado se utilizó según indicaciones del fabricante con regla de tres, pesando 1,5 miligramos y colocándolos en 50ml de agua destilada, se lleva al autoclave por 15 minutos a 121°.



Figura 6 Agar Tripticasa de soya

Figura 7 Disolución del Agar y calentamiento para homogenizar, luego es llevado a esterilización a 127° por 15 minutos

Reconstitución de las cepas estándar ATCC:

Porphyromonas Gingivalis ATCC (33277): para viabilizar esta cepa bacteriana se utilizó un tubo con caldo tripticasa soya (5ml) enriquecido con vitamina K y Hemina, este caldo se introdujo en el liofilizado contenido en el vial de la *Porphyromonas Gingivalis* (33277), en condiciones estériles. Se llevó a incubadora a 37° por el lapso de 72 horas. Procedimiento que se realizó según las recomendaciones del fabricante y la hoja de seguridad estandarizada por *American Type Culture Collection*. Al cabo de las 72 horas se realizó un replica con este inóculo en placas con agar sangre enriquecida, llevándose nuevamente a incubar por 48 horas.



Figura 8 Cepa de *Porphyromona Gingivalis* (liofilizado)

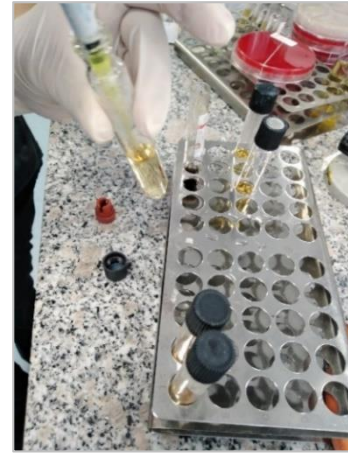


Figura 9 activación en caldo de tripticasa de Soya enriquecido

Preparación del medio de cultivo Agar Sangre enriquecido con Vitamina k y Hemina

Se preparan 100 ml de agua destilada en la cual se disuelve 4gr de Agar base y se lleva a esterilización, adicionando 5% de sangre humana RH O+ y enriqueciendo con Hemina y vitamina K.



Figura 10 Pesaje del Agar y homogenización



Figura 11 Enriquecimiento del Agar con Hemina y Vitamina , colocación en cajas Petri utilizando cámara de flujo laminar.

Preparación de medio de cultivo Muller Hinton

Utilizamos Agar Muller Hinton (CMO 337 OXID) seguimos las indicaciones del fabricante y realizamos una regla de tres, en un frasco estéril colocamos 9,5 gr de agar y añadimos 250 ml de agua destilada agitando levemente para homogenizar, luego llevamos a una alta temperatura en la estufa hasta que hierva y termine la solución de mezclarse.

Luego procedemos a llevar a esterilizar a 121 °C por un tiempo de 15 minutos, terminado el proceso dejamos que enfríe un poco a una temperatura de 45 °C y procedemos a vaciar en cada caja Petri dejando que se solidifique en la cámara de flujo laminar.

Conservamos el medio en refrigeración a -4 °C para su posterior uso.

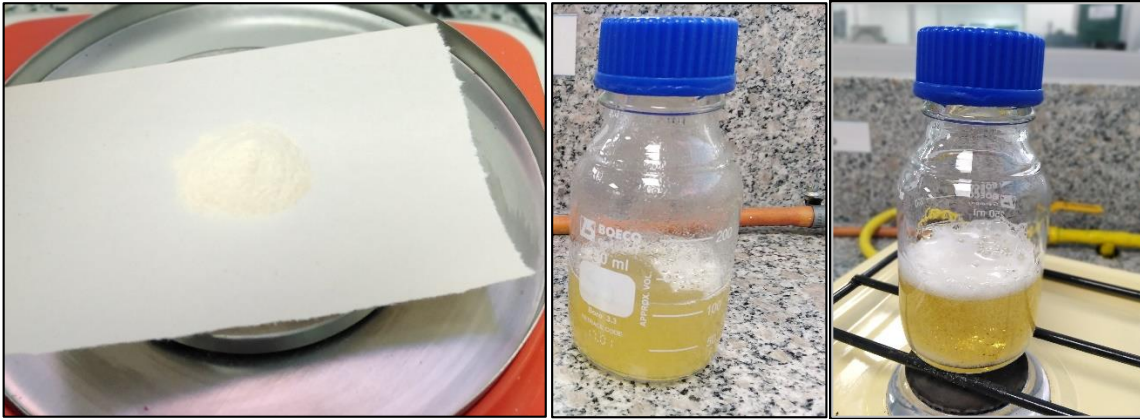


Figura 12 Preparación del Agar Mueller Hinton (pesaje, mezcla, calentamiento para homogenizar y esterilización.



Figura 13 Llenado de las cajas Petri (se dejan solidificar para ser utilizadas)

Siembra en estría

Esta se realiza con el fin de reproducir a partir del inculo activo, colonias de bacterias patógenas como la *Porphyromonas Gingivalis* ATCC 33277. Tomamos con un hisopo estéril un poco del inculo previamente enriquecido en un medio de caldo de tripticasa de soya con vitamina K y Hemina, llevamos este a la caja Petri para frotar y sembrar en estría por agotamiento de la carga de inculo.



Figura 14 Siembra en estría de la *P. Gingivalis*, en un agar sangre (Humana y de Cordero) enriquecido con (Hemina y Vitamina K)

Una vez realizada la siembra llevamos a la incubadora en un medio anaerobio a una temperatura de 37°C de 48 a 72 horas observando el crecimiento de las colonias.



Figura 15 Crecimiento bacteriano de colonias de *P. Gingivalis*.

Mínima Concentración Inhibitoria

Para evaluar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto de arándano se utilizó el método de dilución. De esta manera se determina la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto de *Arándano azul Biloxi* que presento mayor actividad antibacteriana, con concentraciones a partir del 100% con etanol al 30%, obteniendo concentraciones de 10%, 25%, 50%, 75%.

Preparación de las diluciones

Se utilizaron 6 tubos estériles para obtener las diferentes concentraciones del extracto de *Arándano azul Biloxi*. En el primer tubo se colocó 5ml del extracto puro luego se obtuvo una concentración inicial de 2:1 en alcohol al 30%, que fue disolviéndose con la fórmula de concentración de las soluciones en porcentaje volumen-volumen (% v/v) en tubos de 5ml total del volumen.

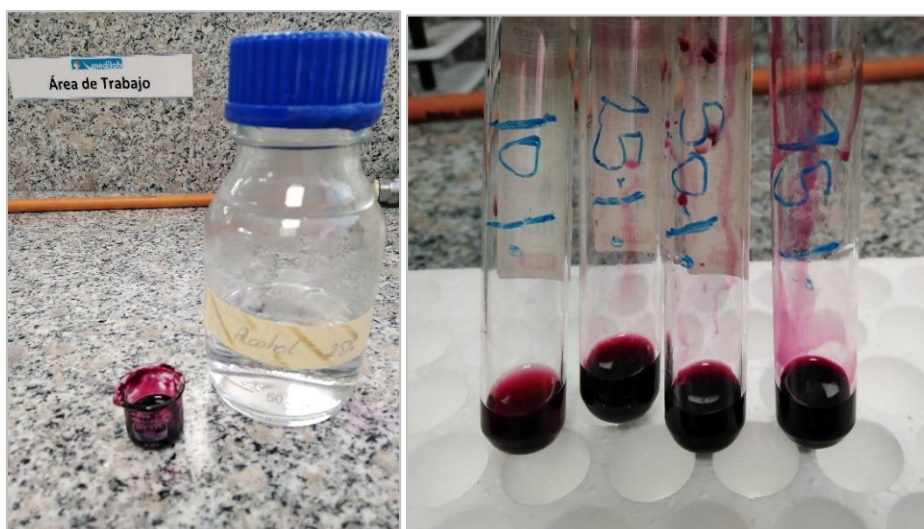


Figura 16 Disoluciones del 10% al 100% a base de tintura madre de Arándano

Difusión en agar y prueba de sensibilidad antimicrobiana

Una vez reactivas las cepas se cosecharon y se diluyeron en un tubo de ensayo con 5 ml de suero fisiológico hasta obtener una dilución 0.5 en la escala de McFarland. La actividad

antibacteriana se analizó por el método Kirby-Bauerde (difusión en disco). Se utilizó 18 placas de agar Müller, inoculadas de manera independiente con 0.5 ml de la bacteria a evaluar.

Se colocan 30µl del extracto de *Arándano azul Biloxi* tintura madre sin alcohol, tintura al 100% 75% 50% 25% y 10% en alcohol al 30%, como control positivo se utilizó 30µl de *Clorhexidina* de 0.12% y como control negativo un disco en blanco, el procedimiento fue realizado dentro de una cabina de flujo laminar para mantener las condiciones de esterilidad y bioseguridad. Las placas fueron incubadas en condiciones de anaerobiosis controlada, a 37°C durante 24 y 48 horas. Posteriormente, se procedió a medir los diámetros de los halos de inhibición con ayuda de un Vernier, las medidas fueron consideradas en milímetros (mm).

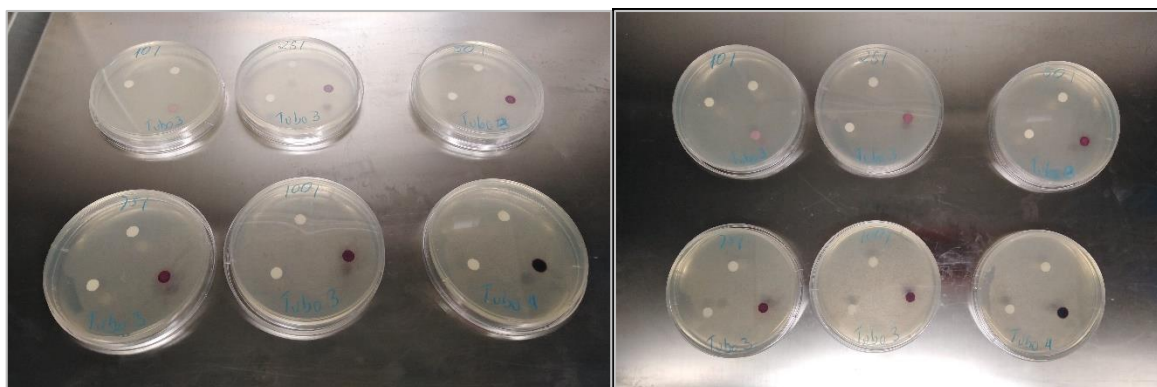


Figura 17 Agar Müller Hinton con disco
Disco 1. Clorhexidina al 0,12%

Disco 2. Arándano en diferentes concentraciones
Disco 3. En blanco control



Figura 18 Colocación en jarra de anaerobiosis y mantenimiento a 37°

Control de Halos de inhibición bacteriana

Se realizó el control de los halos de inhibición bacteriana midiendo con una regla milimetrada cada 24 horas, para comprobar el efecto antibacteriano del *Arándano azul Biloxi* frente a la *Clorhexidina* y de esta manera determinar también la sustentividad de ambos.

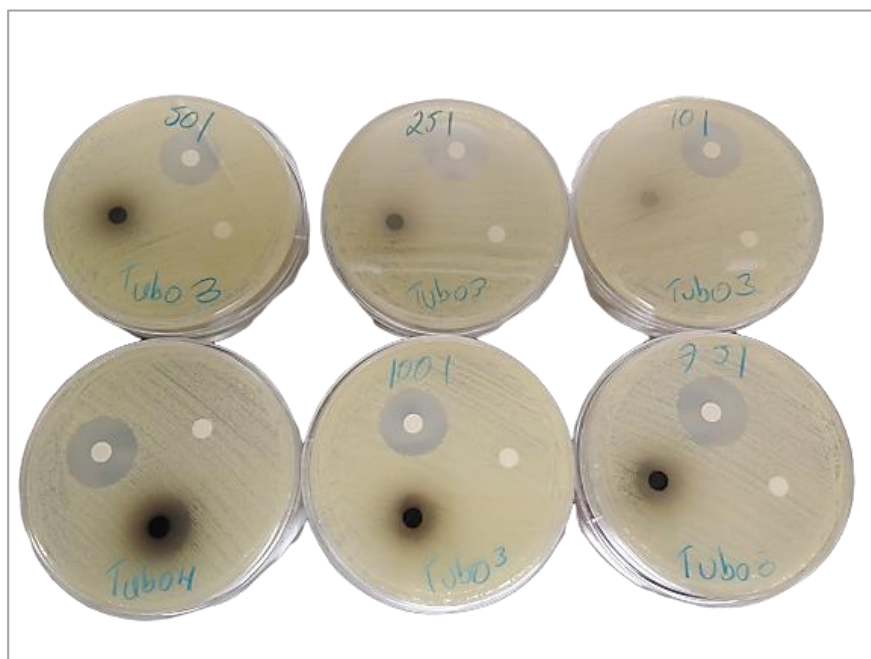


Figura 19 Halos de Inhibición Bacteriana control 1

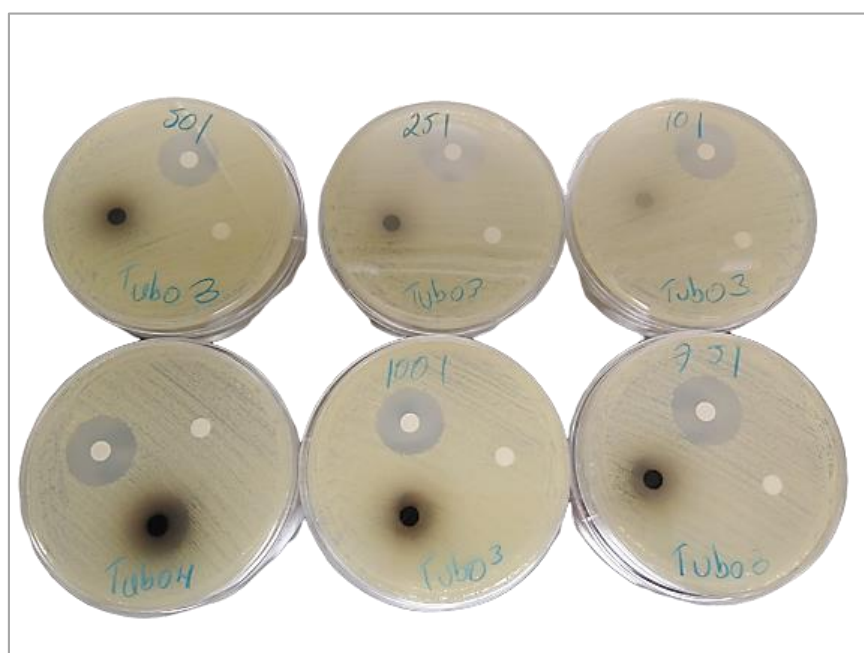


Figura 20 Halos de Inhibición Bacteriana control 2

Tinción de Gram e identificación del patógeno

Se tomó una muestra del cultivo de la ATCC 37277, se colocó en una placa de cristal y se realizó la tinción de Gram confirmando la identificación taxonomía de la bacteria anaerobia Gram negativa.

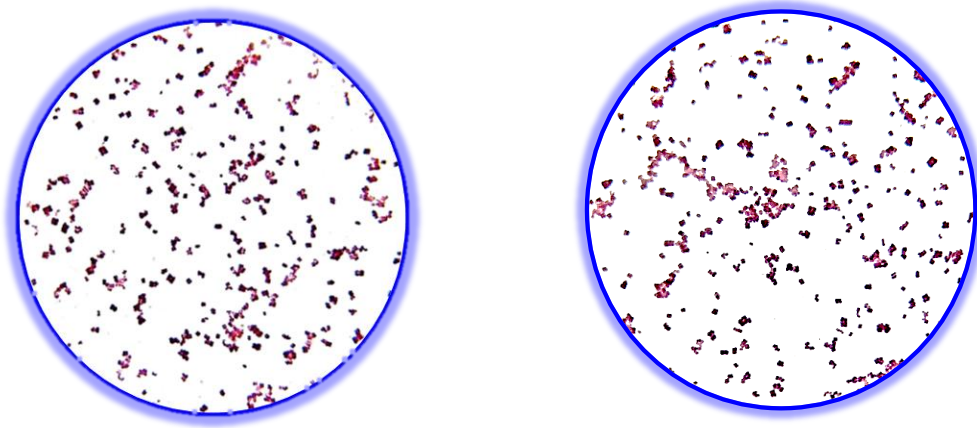


Figura 21 observación microscópica identificación bacteriana *P. Gingivalis*

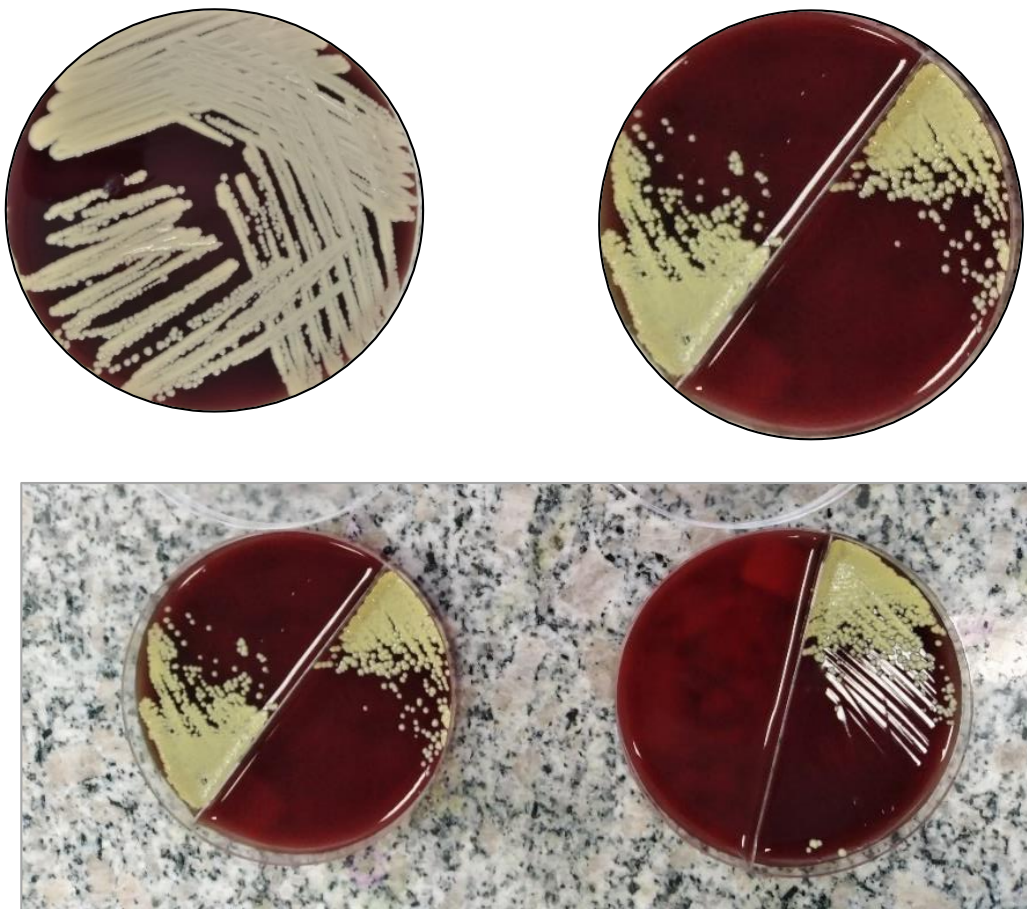


Figura 22 Colonias de *P. Gingivalis* en Agar sangre de cordero y Agar sangre enriquecida con Vitamina K y Hemina.

RESULTADOS

Los patógenos periodontales juegan papeles muy importantes en la etapa inicial de la periodontitis, destruyendo directamente los tejidos periodontales del huésped mediante la liberación de factores tóxicos y metabolitos, la progresión de la periodontitis.

El tratamiento de esta enfermedad consiste en el control de placa bacteriana y el uso de agentes antimicrobianos. Varios actores argumentan que el uso de las plantas medicinales se ha utilizado como tratamientos tradicionales. En las zonas rurales de los países en desarrollo siguen siendo utilizados como el principal tratamiento de muchas afecciones y hay suficientes evidencias.

Teniendo en cuenta que las enfermedades periodontales necesitan alternativas naturales y de bajo costo para el tratamiento de patologías como la periodontitis, se implementó este estudio y con ello conocer el efecto antibacteriano del extracto de arándano frente a la clorhexidina 0.12%, en un microorganismo de importancia en los procesos periodontales, como lo es *Porphyromonas Gingivalis*. En este sentido, los resultados de la investigación se detallan a continuación:

Comparación de la efectividad antimicrobiana del extracto Arándano azul Biloxi (*vaccinium corymbosum*) frente a la Clorhexidina 0,12%

Para la comparación de la efectividad antimicrobiana del extracto arándano azul con la *Clorhexidina* (0,12%), se aplicó el procedimiento prueba de t para muestras independientes y/o comparar las medias de dos grupos de casos. Es decir, los individuos de una de las poblaciones son distintos a los individuos de la otra. Lo ideal es que para esta prueba los sujetos se asignen aleatoriamente a dos grupos, de forma que cualquier diferencia en la respuesta sea debida al

tratamiento o carencia de tratamiento y no a otros factores, los resultados de este proceso se presentan a continuación:

Cuadro 1 Análisis descriptivo de los tratamientos.

TRATAMIENTO	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio
Arándano Tintura Madre	117	19,5085	0,40991	0,03790
Clorhexidina 0,12% Control (+)	127	21,1890	0,68698	0,06096

Fuente: Investigación directa (2020) Elaboración: María del Pilar Muñoz Oviedo

Análisis e interpretación:

De acuerdo al análisis descriptivo de la comparación de la acción microbiana entre tratamientos en el laboratorio, a primera vista se puede observar una diferencia de medias entre los datos obtenidos en laboratorio del arándano azul y la *Clorhexidina* 0,12% que no es muy notable, lográndose mayor promedio de efectividad en la acción en el segundo tratamiento; sin embargo se presenta menor dispersión en los resultados con el arándano azul, esto es, existe mayor homogeneidad en los resultados con este producto, al igual su error es mucho menor a la *Clorhexidina* 0,12% donde existe aunque de forma alta más dispersión en sus resultados y error bajo, pero mayor que el arándano (ver Cuadro 1).

Cuadro 2 Prueba de t para muestras independientes

Estadísticos	Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias					95% de intervalo de confianza de la diferencia	
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior
	Se asumen varianzas iguales	29,344	0,000	-22,958	242	0,000	-1,68043	0,07320	-1,82461
No se asumen varianzas iguales			-23,411	208,400	0,000	-1,68043	0,07178	-1,82194	-1,53892

Fuente: Investigación directa (2020)
Elaboración: María del Pilar Muñoz Oviedo

Análisis e interpretación:

Para el cumplimiento del primer objetivo se aplicó la prueba de Levene para la igualdad de varianzas, ello nos indica si podemos o no suponer varianzas iguales. Así si la probabilidad asociada al estadístico Levene es >0.05 – suponemos varianzas iguales, si es <0.05 – suponemos varianzas distintas; de los resultados obtenidos se asume varianzas distintas entre el arándano azul y la *Clorhexidina* 0,12% por el valor de significancia menor a 0,05.

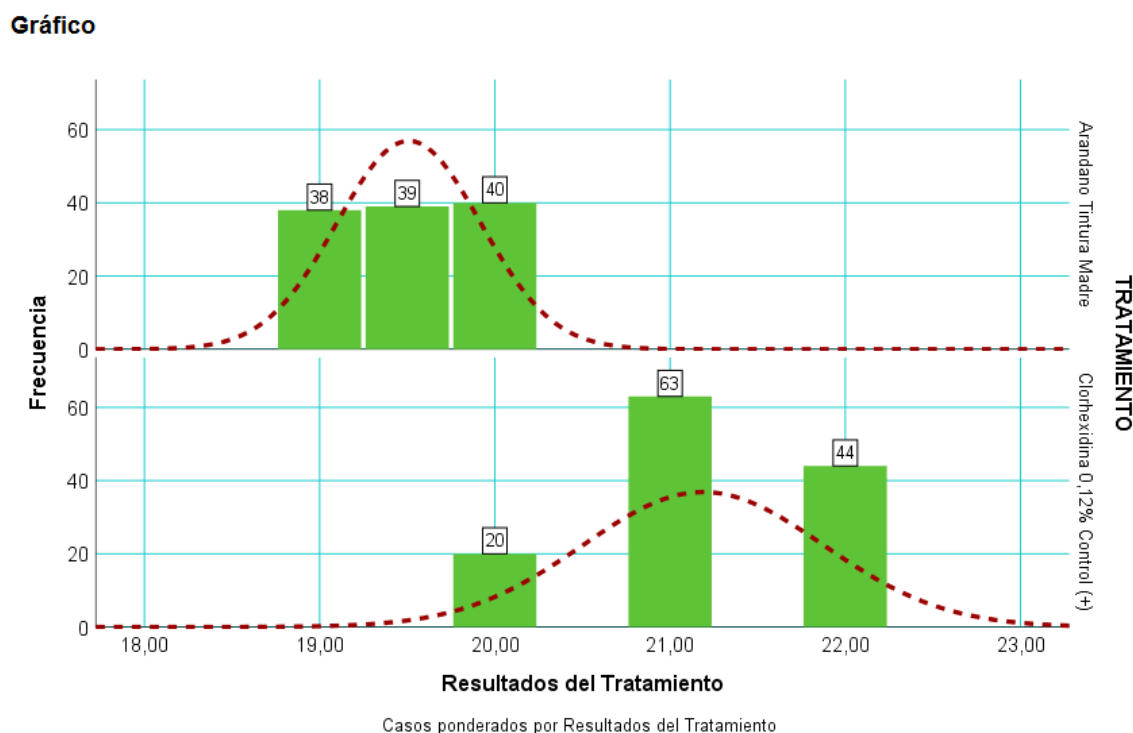
Después de asumir las varianzas no iguales (en el caso de las 2 variables “arándano” y “Clorhexidina 0,12%”) observamos el estadístico t con su nivel de significación bilateral, este valor nos informa sobre el grado de compatibilidad entre la hipótesis de igualdad de medias y las diferencia entre medias poblacionales observadas; en nuestro caso es menor que 0.05, la conclusión es que no hay compatibilidad entre la hipótesis de igualdad de medias poblacionales y las diferencias entre las medias de los grupos representados con tratamiento de arándano y tratamiento con *Clorhexidina* 0,12% grupo. Las medias de los tratamientos son diferentes para cada tratamiento.

Los límites de intervalo de confianza para la diferencia entre tratamientos, nos indican que están entre -1,82194 y -1,53892. El hecho de que el valor 0 no está incluido entre los límites de intervalo de confianza para la diferencia también indica que podemos rechazar la hipótesis de igualdad de medias entre los tratamientos del estudio (ver Cuadro 2).

Si queremos saber cuál es el grupo con la media más alta, volvemos a la tabla de estadísticos (ver cuadro 1). Observamos que la media de grupo con tratamiento con *Clorhexidina* 0,12% es superior al grupo con tratamiento con Arándano Azul, sin embargo, podemos observar que la diferencia no es elevada, aunque estadísticamente está es significativa. Esto puede confirmar que el tratamiento en ambas es efectivo, aunque en mayor medida la *Clorhexidina* 0,12% presenta los valores más confiables.

En las representaciones gráficas de la figura 1, se puede corroborar de una forma diagramada los resultados obtenidos, pudiendo observarse la dispersión de los datos tanto en el tratamiento de arándano y en el *Clorhexidina* 0,12%, esto es:

Grafico 1 Comparación de la efectividad antimicrobiana



Sustantividad antimicrobiana del extracto Arándano azul (*Vaccinium Corymbosum*) cv. Bioxil sobre cepas de *Porphyromonas Gingivalis* ATCC 33277 en diferentes concentraciones

El análisis de la varianza estudia el efecto de una o varias variables independientes denominadas factores sobre la variable dependiente. Es una generalización del contraste de medias para dos muestras con datos independientes y se aplica en las situaciones en las que sean tres o más de tres los grupos que se quieren comparar. Los grupos se definen a partir de los factores, para ello, se considera algunos aspectos en el análisis de la varianza, tales como el tamaño de la población adecuada y cierta normalidad en los tratamientos; los resultados obtenidos se presentan en los cuadros y figuras a continuación:

Cuadro 3 Características de la muestra en el proceso sustantividad antimicrobiana del extracto arándano azul sobre cepas de *Porphyromonas Gingivalis* en diferentes concentraciones.

VARIABLES		TRATAMIENTO							Clorhexidina 0,12% Control (+)	Disco en blanco control (-)	Total
		Arándano Tintura Madre	Extracto etanólico de arándano 100%	Extracto etanólico de arándano 75%	Extracto etanólico de arándano 50%	Extracto etanólico de arándano 25%	Extracto etanólico de arándano 10%				
Halo Inhibitorio 24 horas	f	19	15	14	10	6	6	21	6	97	
	%	19,6%	15,5%	14,4%	10,3%	6,2%	6,2%	21,6%	6,2%	100,0%	
Halo Inhibitorio 48 horas	f	19	13	14	8	6	6	21	6	93	
	%	20,4%	14,0%	15,1%	8,6%	6,5%	6,5%	22,6%	6,5%	100,0%	
Halo Inhibitorio 72 horas	f	18	11	13	6	6	6	21	6	87	
	%	20,7%	12,6%	14,9%	6,9%	6,9%	6,9%	24,1%	6,9%	100,0%	
Halo Inhibitorio 96 horas	f	17	6	6	6	6	6	21	6	74	
	%	23,0%	8,1%	8,1%	8,1%	8,1%	8,1%	28,4%	8,1%	100,0%	
Total	f	73	45	47	30	24	24	84	24	351	
	%	20,8%	12,8%	13,4%	8,5%	6,8%	6,8%	23,9%	6,8%	100,0%	

Fuente: Investigación directa (2020)
Elaboración: María del Pilar Muñoz Oviedo

Análisis e interpretación:

Para el cumplimiento del segundo objetivo en el proceso de conocer sustantividad antimicrobiana del extracto *Arándano azul Biloxi (Vaccinium corymbosum)* sobre cepas de *Porphyromonas Gingivalis* en diferentes concentraciones, en este primer proceso se puede observar mejores resultados en el Halo Inhibitorio a las 96 horas en el arándano de tintura madre (17; 23,00%) y *Clorhexidina* 0,12% (21; 28,40%) en comparación con los menores valores obtenidos en el Halo Inhibitorio a las 24 horas en las concentraciones extracto etanólico de arándano al 25%, 10% y en el disco blanco control respectivamente (6,00; 6,20%), lo expuesto se presenta en el Cuadro 3.

Cuadro 4 Análisis descriptivo de la sustantividad antimicrobiana del extracto arándano azul sobre cepas de *Porphyromonas Gingivalis* en diferentes concentraciones

VARIABLES	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Arándano Tintura Madre	4	18,25	0,957	0,479	16,73	19,77	17	19
Extracto etanólico de arándano 100%	4	11,25	3,862	1,931	5,10	17,40	6	15
Extracto etanólico de arándano 75%	4	11,75	3,862	1,931	5,60	17,90	6	14
Extracto etanólico de arándano 50%	4	7,50	1,915	0,957	4,45	10,55	6	10
Extracto etanólico de arándano 25%	4	6,00	0,000	0,000	6,00	6,00	6	6
Extracto etanólico de arándano 10%	4	6,00	0,000	0,000	6,00	6,00	6	6
Clorhexidina 0,12% Control (+)	4	21,00	0,000	0,000	21,00	21,00	21	21
Disco en blanco control (-)	4	6,00	0,000	0,000	6,00	6,00	6	6
Total	32	10,97	5,861	1,036	8,86	13,08	6	21

Fuente: Investigación directa (2020) Elaboración: María del Pilar Muñoz Oviedo

Análisis e interpretación:

En el análisis descriptivo de la sustantividad antimicrobiana del extracto de arándano azul sobre las cepas de *Porphyromonas Gingivalis* en diferentes concentraciones, se puede observar que existen mayores valores del tratamiento en el *Clorhexidina* 0,12% Control (+) con una media alta (21,00) y no existe dispersión en los mismos; así mismo, es importante resaltar los valores de las medias altas en el arándano tintura madre (18,25) en donde la dispersión es muy baja (0,479); en comparación con los más bajos obtenidos en las concentraciones de extracto etanólico de arándano 10% y 25% y disco blanco control negativo (6,00), estos resultados no tienen dispersión, se puede decir que se presentan homogéneos (ver Cuadro 4)

Análisis de los halos de inhibición de las muestras, concentraciones del extracto Arándano azul (*Vaccinium Corymbosum*) cv. Biloxi sobre cepas de *Porphyromonas Gingivalis* ATCC 33277 en un grupo de control positivo y negativo

La técnica actualmente utilizada para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos es el producto de importantes esfuerzos internacionales desde hace más de dos décadas enfocados a normalizar el método. Los halos de inhibición se midieron en diferentes tiempos, para que los resultados sean confiables los procedimientos fueron controlados y estandarizados cuidadosamente, los resultados se presentan a continuación:

Cuadro 5 Características de la muestra en el análisis de los halos de inhibición de las muestras

VARIABLES		TRATAMIENTO			Total
		Arándano Tintura Madre	Clorhexidin a 0,12% Control (+)	Disco en blanco control (-)	
Halo Inhibitorio Caja Petri N° 1	f	19	21	6	46
	%	41,3%	45,7%	13,0%	100,0%
Halo Inhibitorio Caja Petri N° 2	f	20	21	6	47
	%	42,6%	44,7%	12,8%	100,0%
Halo Inhibitorio Caja Petri N° 3	f	20	22	6	48
	%	41,7%	45,8%	12,5%	100,0%
Halo Inhibitorio Caja Petri N° 4	f	20	21	6	47
	%	42,6%	44,7%	12,8%	100,0%
Halo Inhibitorio Caja Petri N° 5	f	20	20	6	46
	%	43,5%	43,5%	13,0%	100,0%
Halo Inhibitorio Caja Petri N° 6	f	19	22	6	47
	%	40,4%	46,8%	12,8%	100,0%
Total	f	118	127	36	281
	%	42,0%	45,2%	12,8%	100,0%

Fuente: Investigación directa (2020)

Elaboración: María del Pilar Muñoz Oviedo

Análisis e interpretación:

Para el cumplimiento del segundo objetivo en el proceso de análisis de los halos de inhibición de las muestras, en este primer proceso se puede observar mejores resultados en el halo inhibitorio en la caja Petri N° 5 correspondiente al arándano de tintura madre (20; 45,50%) y en el halo inhibitorio de la caja Petri N° 6 correspondiente a la *Clorhexidina* 0,12% (22;

46,80%) en comparación con los menores valores obtenidos en halo inhibitorio de la caja Petri N° 3 en el disco blanco control (6, 12,50%), lo expuesto se presenta en el Cuadro 5

Cuadro 6 Análisis descriptivo en el análisis de los halos de inhibición de las muestras.

	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error	95% del intervalo de confianza para la media		Mínim o	Máxim o
					Límit e inferior	Límit e superior		
Arándano	11	19,508	0,4099	0,0379	19,433	19,583	19,00	20,00
Tintura Madre	7	5	1	0	5	6	19,00	20,00
Clorhexidi na 0,12% Control (+)	12 7	21,189 0	0,6869 8	0,0609 6	21,068 3	21,309 6	20,00	22,00
Disco en blanco control (-)	36	6,0000	0,0000 0	0,0000 0	6,0000	6,0000	6,00	6,00
Total	28 0	18,533 9	4,9153 9	0,2937 5	17,955 7	19,112 2	6,00	22,00

Fuente: Investigación directa (2020) Elaboración: María del Pilar Muñoz Oviedo

Análisis e interpretación:

En el análisis descriptivo de los halos de inhibición de las muestras en los grupos de estudio de control positivo y negativo, se puede observar que existen mayor inhibición mediante el uso de la *Clorhexidina* 0,12% Control (+) con una media alta (21,1890) y Arándano tintura madre (19,5085), siendo la dispersión menor en este último y rango menor; así mismo, es importante resaltar que la media es muy baja en el disco blanco control (-) que es 6, donde no existe dispersión de los datos, se puede decir que se presentan homogéneos aunque muy bajos en comparación con los otros inhibidores (ver Cuadro 6)

Gráfico 2 Halos de inhibición de las muestras

Gráficos de medias

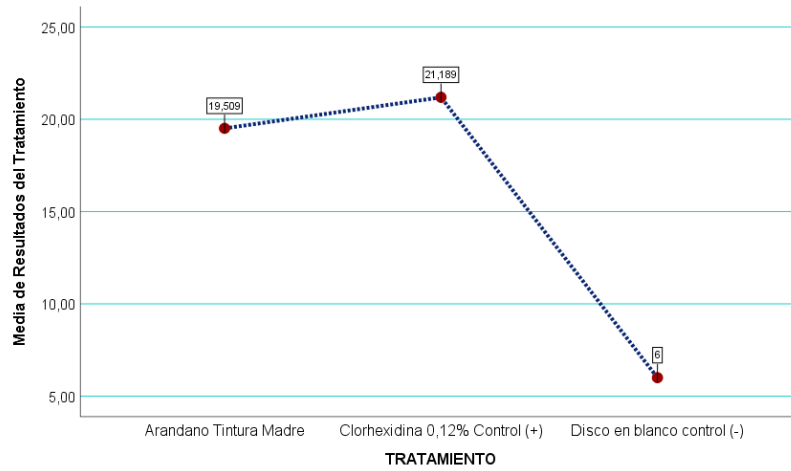
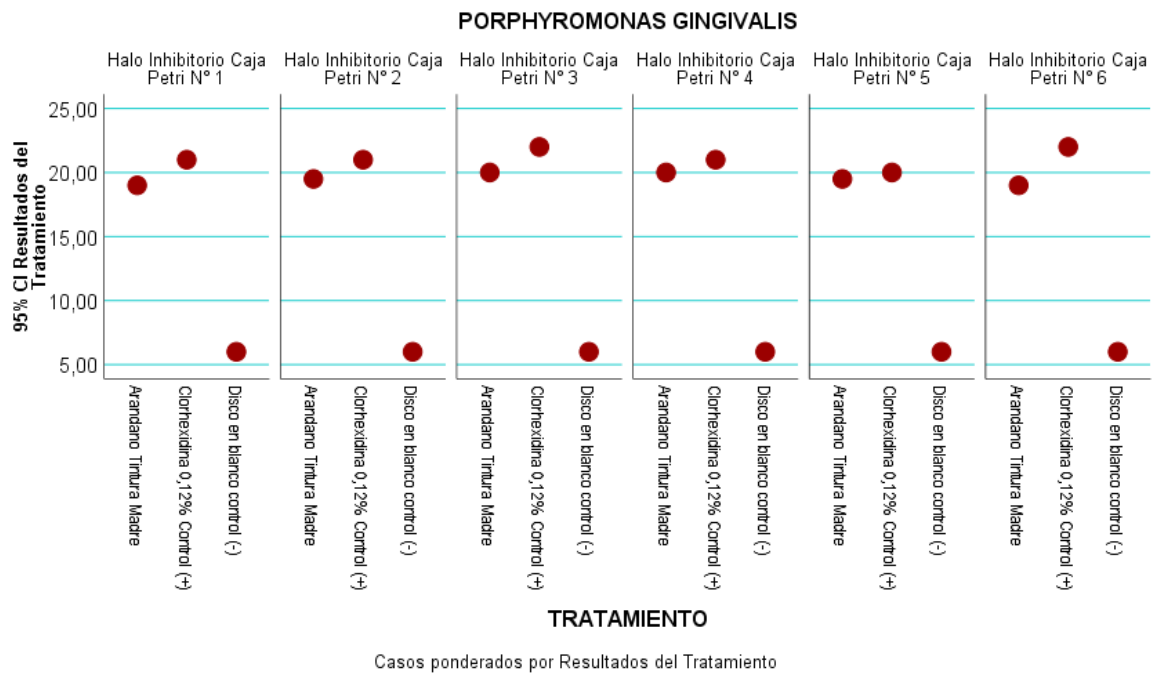


Gráfico 3 tratamiento por resultados



DISCUSIÓN

La periodontitis es una infección *polimicrobiana* multifactorial que se inicia con un proceso inflamatorio que continúa destruyendo progresivamente los tejidos de soporte de los dientes.

En la actualidad el incremento de la enfermedad periodontal a nivel mundial conlleva a evaluar el efecto de diversas sustancias que ayuden a combatir las enfermedades periodontales. Varios estudios afirman que la etiología de esta enfermedad reside en un patógeno muy importante como es la *Porphyromonas Gingivalis* capaz de adherirse a las superficies de las células formando una película y colonizando la cavidad oral, llegando a afectar de forma grave o crónica al huésped. (Lamont, 1998), describe en su artículo la capacidad de este patógeno en afectar los tejidos periodontales y destruir hasta llevar a la pérdida definitiva del órgano dentario.

Es importante señalar que una de las limitaciones en esta investigación fue activar la bacteria, debido a que el manejo de microorganismos en estudios in-vitro es un poco complejo, las bacterias anaerobias necesitan medios de cultivo especiales y controles estrictos referidos en los protocolos del *SEIMC* (2004).

Para la realizar nuestra investigación se utilizaron cepas de *Porphyromonas Gingivalis* ATCC 33277, donde se sembró en medios enriquecidos a partir de Tioglicolato de soya, adicionado con vitamina K y hemina, para luego ser activada y pasar a Agares enriquecidos.

Los métodos que se menciona para el manejo de las bacterias anaerobias estrictas como la *P. Gingivalis* hace énfasis en la necesidad de condiciones anaerobias. Por esta razón es importante adicionar hemina al agar o caldo, ya que esta incrementa en un 10% la tolerancia al oxígeno y permitirá la manipulación de la bacteria en condiciones aerobias (Perfecto, Nakata, & Cadillo., 2011) (Alcalá, Betriu, Sánchez, & Reig, 2004).

De esta manera confirmamos que la hemina tiene un efecto protector sobre el crecimiento del microorganismo en presencia de oxígeno y nos permite trabajar fuera de un ambiente anaerobio en los diferentes procedimientos.

La fruta del arándano ha mostrado actividades biológicas en diversas bacterias periodontopatógenas como el *Streptococcus Mutans*, *P. Gingivalis* y *Fusobacterium Nucleatum*, donde se estudia la influencia de sus componentes como lo son flavonoles (FLAV), *antocianinas* (A) y *proantocianidinas* (PAC) del extracto de arándano en los factores de virulencia. Estos componentes tienen un alto peso molecular, de esta manera impiden la formación de biopelículas e inhiben la producción de ácidos orgánicos como menciona Grenier en su artículo (2010).

Lo antes mencionado nos lleva a coincidir con varios autores en su propiedad inhibitoria y antimicrobiana, según los resultados encontrados y se correlacionan con diversas investigaciones de artículos científicos recientes (Duarte, y otros, 2016) (Otal & Cuadras, 2017) (Medeiros, y otros, 2016).

En el presente estudio observó que el arándano en concentraciones 1:1 presenta propiedades antibacterianas eficaces en la *Porphyromonas Gingivalis* con halos significativos donde inhibe la proliferación bacteriana, igual que el estudio realizado por (Lagha, Dudonné, Desjardins, & Grenier) en su artículo donde se realiza un estudio de las propiedades del arándano aplicadas en un periodontopatógeno como el *Fusobacterium Nucleatum* en concentración de 1mg/1ml demostrando la actividad y la inhibición bacteriana.

En otros estudios realizados Sánchez, y otros, (2020) refiere que el *Arándano* actúa presentando mayor actividad en patógenos Como *Streptococcus Oralis*, *Actinomyces Naeslundii*, *Veillonella Párvula* iniciando la inhibición en tiempos cortos de 30 a 60 segundos, haciendo referencia que este efecto en la *Porphyromonas Gingivalis* tarda un lapso de 6 horas

en la inhibición de la biopelícula, de acuerdo a esta investigación y sus resultados encontramos contradicción ya que el extracto de *Arándano azul Biloxi* inicio su actividad inhibitoria inmediatamente en que se colocó cada disco impregnado con el extracto utilizando el método Kirby Bauer (disco difusión) y logro una sustentividad mínima de 48 H y máxima de 96H. Datos que son contradictorios a la teoría mencionada por Sánchez (2020).

La clorhexidina es sin duda el antiséptico de elección que ha sido utilizado ampliamente en tratamientos odontológicos y ha demostrado ser el agente más efectivo. Su acción se realiza mediante una reducción de la formación de la película adquirida y alteración del desarrollo bacteriano Bascones & Morante. (2006) en su estudio comparan la actividad indiscutible y excelentes resultados frente a bacterias periodontopatógenas. En el estudio in vitro realizado, se correlaciona esta teoría ya que se logró comparar la sustentividad ante la inhibición bacteriana observando buenos resultados en el halo inhibitorio a las 96 horas donde el *Arándano azul Biloxi* de tintura madre reduce significativamente su acción (17; 23,00%) y la *Clorhexidina* 0,12% permanece estable su halo inhibitorio(21; 28,40%) demostrando así una sustentividad mayor que la del extracto de *Arándano azul Biloxi* igual descrito por James; & Worthington (2017)

En estudios realizados por Collins, y otros (2018) reflejan la variabilidad de los halos de inhibición antibacteriana de la clorhexidina al 0,12% indicando que varían desde 7mm hasta 13mm, en comparación con los resultados que obtuvimos se encontraron discrepancias significativas ya que los halos fueron constantes y con mayor actividad antimicrobiana entre 21mm y 22mm.

En una evaluación que se llevó a cabo en un colegio de la India (Dental College, Dhule, Maharashtra) se aplicó a un grupo de estudiantes dos enjuagues bucales uno a base de arándano y otro con *Clorhexidina*, los valores encontrados estuvieron entre 68% para el arándano y 69%

para la clorhexidina en su efectividad inhibitoria, esto se relaciona estrechamente con los valores que encontramos en los halos de inhibición de este estudio ya que los porcentajes de inhibición fueron aproximados, el *Arándano azul Biloxi* presento un rango de 19.,6% frente a la clorhexidina con un rango de 21,6% encontrándose en rangos muy cercanos como lo menciona Khairnar, y otros (2015).

Esta investigación está en conjunto con los resultados de un estudio anterior donde los datos sugirieron que la capacidad de reducir significativamente la *Porphyromonas Gingivalis* in vivo debido a la actividad de antiadhesión del componente arándano asociado con diversas concentraciones de extracto. De tal manera que los hallazgos de este estudio constituyen un aporte al conocimiento científico en el uso de plantas medicinales de aplicación odontológica, mostrando un efecto casi similar de ambos sobre la *P. Gingivalis* UFC / ml, indicando que el extracto de arándano es igualmente efectivo que el enjuague bucal de clorhexidina al 0,12% con efectos beneficiosos locales.

CONCLUSIONES

De acuerdo al estudio realizado se demostró que el extracto de *Arándano azul Biloxi* ejerce un efecto antimicrobiano amplio sobre bacterias patógenas como la *Porphyromonas Gingivalis*, de igual manera la *Clorhexidina* al 0,12% muestra su eficacia en el tratamiento de estas bacterias.

En la comparación del *Arándano azul Biloxi* se confirma que tiene una eficacia del 90,5% frente a la *Clorhexidina* ya que los halos de inhibición de ambas sustancias presentaron medidas significativas. El extracto de *Arándano azul Biloxi* tintura madre dio un halo de sensibilidad promedio de 19mm (19,6%) valor referencial muy cerca de los halos que presenta la *Clorhexidina* de 21mm (21,6%).

Se determina que el *Arándano azul Biloxi* tiene una buena sustentividad manteniendo su efecto hasta por 96H, mientras que la *Clorhexidina* sigue siendo la sustancia de mayor acción prolongada, manteniendo su efecto por más tiempo.

Se concluye que el *Arándano azul Biloxi* si presenta halos de inhibición a partir de concentraciones mínimas al 75% hasta 100% con medidas desde 14mm hasta 19.5mm.

De esta manera se comprobó que el extracto de arándano a diferentes concentraciones es efectivo para inhibir el crecimiento de la *P. Gingivalis* y puede considerarse como alternativa para el tratamiento de las enfermedades periodontales que dieron causa a la investigación, sin embargo, la *Clorhexidina* sigue siendo el agente más potencial para el tratamiento inhibitorio de la *Porphyromonas Gingivalis*.

RECOMENDACIONES

En las investigaciones posteriores se recomienda a estudiantes o profesionales de odontología realizar los estudios comparativos in situ para determinar la efectividad del extracto en la cavidad oral, de acuerdo a las condiciones que se generan en cada paciente, de esta manera se lograría correlacionar el efecto y la sustentividad del arándano frente a los patógenos más prevalentes en la enfermedad periodontal.

En estudios posteriores se recomendaría seguir probando las diferentes concentraciones de arándano para poder elaborar un enjuague bucal que cumpla con requisitos estándar y sea efectivo en el tratamiento de enfermedades periodontales como la gingivitis y periodontitis.

Es necesario realizar ensayos clínicos adicionales a fin de elaborar un enjuague bucal a base de arándano, realizando muestras de mayor tamaño para evaluar su seguridad y sus efectos adversos. De esta manera se podrá realizar más ensayos clínicos sobre las propiedades en un compuesto farmacéutico a base de arándano existiendo una gran posibilidad de que, junto con la mejora en la salud bucal, pueda tener beneficios adicionales en la prevención de infecciones de la cavidad oral.

BIBLIOGRAFÍA

1. (FDA), A. d. (2017). *La FDA advierte acerca de reacciones alérgicas poco comunes pero graves del antiséptico tópico con gluconato de clorhexidina*. Obtenido de <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/la-fda-advierte-acerca-de-reacciones-alergicas-poco-comunes-pero-graves-del-antiseptico-topico-con>
2. (OMS), O. M. (2018). *WHO*. (OMS) Obtenido de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>
3. Agrinova. (2017). *Infoagro*. Obtenido de FAO Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación): http://www.infoagro.com/documentos/el_cultivo_del_arandano.asp
4. Alcalá, L., Betriu, C., Sánchez, J. E., & Reig, M. (2004). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. doi:ISBN: 84-609-2291-X
5. Arévalo, J. M., L, J., Arribas, J. M., Hernández, M., Lizán, & Herruzo, R. (2011). Guía de utilización de antisépticos. *Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene*. Obtenido de <https://www.sefh.es/fichadjuntos/Antisepticos.pdf>
6. Azna, M. N., Cabanilles, P. d., & Loscos, F. G. (2007). Uso de colutorios en la clínica. *Sepa*, 17(1), Fasc. 11:41-52. Obtenido de https://www.sepa.es/images/stories/SEPA/REVISTA_PO/articulos.pdf/17-1_04.pdf
7. Bascones, A., & Morante, S. (2006). Antisépticos orales. Revisión de la literatura y perspectiva actual. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*, 18(1), 21-29. doi:ISSN 2340-3209v

8. Blumberg, J. B., Camesano, T. A., Cassidy, A., Etherton, P. K., Howell, A., Manach, C., . . . Vita, J. A. (2013). Cranberries and their bioactive constituents in human health. *Advances in nutrition. Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, 4(6), 618–632. doi:10.3945 / an.113.004473
9. Bonifait, L., & Grenier, D. (2010). Cranberry Polyphenols: Potential Benefits for Dental Caries and Periodontal Disease. *J Can Dent Assoc.* doi:PMID: 20943032
10. Borrego, J. J. (2018). Robert Koch: El triunfo de la perseverancia. (U. d. Malaga, Ed.) *NoticiaSEM, 117*. Obtenido de <http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/koch.pdf>
11. Caballero, A. D. (2010). Periodontitis, *Porphyromonas gingivalis* and its relation to quorum sensing expression. (Z. Facultad de Odontología Universidad de Cartagena, Ed.) *Revista Cubana de Estomatología*, 47(4), 404-416. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072010000400003
12. Collins, J. R., Olsen, J., Cuesta, A., Vetri, M. S., Hernández, M., Romanos, G., . . . Palma, P. (2018). *In vitro* microbiological analysis on antibacterial, anti-inflammatory, and inhibitory action on matrix metalloproteinases-8 of commercially available chlorhexidine digluconate mouth rinses. *Indian journal of dental research : official publication of Indian Society for Dental*, 29(6), 799–807. doi:10.4103/ijdr.IJDR_406_17
13. Coronel, D., & Carla Verdugo. Maria Fernanda Paredes, E. Y. (2012). Estudio etnobotánico del mortiño (*vaccinium floribundum*) como alimento ancestral y potencial alimento funcional. *La Granja Revista de Estudio de Ciencias de la Vida*, 16. doi:10.17163/lgr.n16.2012.01

14. Cuevas, L. B. (2016). *Microbiología Clínica*. Síntesis, S. A. doi:ISBN: 978-84-9077-318-5
15. Díaz, P. U., & Schuldes, S. V. (2013). *Manual del Arandano*. Chillán, Chile. : Trama Impresores S.A. Recuperado el 2019, de <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR39094.pdf>
16. Diego M. Bonilla, Y. M., Rojas, Á. P., J. C., R. P., & Nerio, L. (2016). *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*. doi:10.15446/rcciquifa.v45n2.59942
17. Duarte, S., Gregoire, S., Singh, A. P., Vorsa, N., Schaich, K., Bowen, W. H., & Koo, H. (2016). Inhibitory Effects of Cranberry Polyphenols on Formation and Acidogenicity of *Streptococcus Mutans* Biofilms. *FEMS Microbiol Lett*. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00147.x.
18. E, P., & KM, S. (2009). Phytochemicals of cranberries and cranberry products: characterization, potential health effects, and processing stability. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 49(9):741-781. doi:10.1080/10408390802145377
19. Eley, B., M. Soory, J., & Manson. (2012). *Periodontia* (6^a ed.). Elsevier Health Sciences.
20. Expofresh, H. (2019). *Información nutricional*. Obtenido de <http://www.hortifrutexpofresh.com.ar/info-nutricional.php>
21. Flórez, S. M., Gallego, J. G., Culebras, J. M., & Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutricion Hospitalaria*. doi:ISSN 0212-1611

22. Genco, R. J., & Williams, R. C. (2011). *Enfermedad Periodontal y Salud General: Una Guía para el Clínico*. Colombia: Producción Gráfica Editores S.A.
23. Gerson, C.-B., Fernanda, G. A., & Claudio, P. A. (2016). Oral Health Status In Ecuadorl. *Revista Activa UC Cuenca*, 1(3), 65-70.
24. González, A., Morales, C. G., Riquelme, J., Hirzel, J., France, A., L, A. P., . . . Becerra, P. R. (2017). *Manual de manejo agronómico del arándano*. Boletín 6, Instituto de Desarrollo Agropecuario - Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Santiago, Chile. Obtenido de <http://www.inia.cl/wp-content/uploads/ManualesdeProduccion/06%20Manual%20Arandanos.pdf>
25. González, P. (2018). El arándano, un fruto de reciente producción en el país. *Revista Lideres*. Obtenido de <https://www.revistalideres.ec/lideres/cultivos-arandano-fruta-empresa-guayllabamba.html>
26. Gutiérrez, M. C., & Baracaldo, F. P. (2012). A Non Destructive Method For Estimating The Leaf Area Of Blueberry (*Vaccinium Corybosum*). *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 15(2), 373 - 379. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v15n2/v15n2a15.pdf>
27. H, R. S. (2012). ¿Y antes de Fauchard qué? La odontología en las cavernas, los templos, los hospitales y las universidades. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral*, 5(1), 29-39. doi:10.4067/S0719-01072012000100006
28. Herrera, D., Meyle, J., & Jin, S. R. (2018). *FDI World Dental Federation*. Obtenido de https://www.fdiworldddental.org/sites/default/files/media/resources/gphp-2018-white_paper-es.pdf

29. How, K. Y. (2016). Porphyromonas gingivalis: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Front Microbiol*, 7-53. doi:10.3389/fmicb.2016.00053
30. Hurtado, C. A., & Bojórquez, A. Y. (2016). 17(54), 1374-1378. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/oral/ora-2016/ora1654f.pdf>
31. J, D. Z., J, Y. F., S, M. R., & C, Á. R. (2012). Virulence and variability on Porphyromonas gingivalis and Aggregatibacter. (U. d. Facultad de Odontología, Ed.) *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Ora*, 5(1), 40-43. Obtenido de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/piro/v5n1/art07.pdf>
32. Jácome, L. E., Durán, M. H., & Castro, C. A. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio. *Medigraphic*. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2014/ir141b.pdf>
33. Khairnar, M. R., Karibasappa, G., Dodamani, A. S., Vishwakarma, P., Naik, R. G., & Deshmukh, M. A. (2015). Comparative assessment of Cranberry and Chlorhexidine mouthwash on streptococcal colonization among dental students: A randomized parallel clinical trial. *Contemp Clin Dent.*, 6(1): 35–39. doi:10.4103/0976-237X.149289
34. Lagha, A. B., Dudonné, S., Desjardins, Y., & Grenier, D. (2015). Wild Blueberry (Vaccinium Angustifolium Ait.) Polyphenols Target Fusobacterium Nucleatum and the Host Inflammatory Response: Potential Innovative Molecules for Treating Periodontal Diseases. *J Agric Food Chem*. doi:10.1021/acs.jafc.5b01525
35. Lamont, R. J. (1998). Life below the gum line: pathogenic mechanisms of Porphyromonas gingivalis. Microbiology and molecular biology reviews. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(4), 1244–1263. doi: PMID: PMC98945

36. Lindhe, J., Karring, T., & Araújo, M. (2009). *Periodoncia Clínica e Implantología Odontologica* (5ª ed., Vol. Tomo I). Panamericana.
37. López, M. d., Álvarez, M. D., & Morales, A. A. (2009). Chlorhexidin: Structural bases and applications in stomatology. *Gaceta Medica, Clínica Estomatológica Provincial Docente. Sancti Spiritus*. Obtenido de <http://revgmespirituana.sld.cu/index.php/gme/article/view/849/727>
38. López, M. T., & Morales, M. D. (2017). La clorhexidina, bases estructurales y aplicaciones en; la estomatología. *Gaceta Médica Espirituana*, 11(1), 8. doi:ISSN 1608-892
39. Lu, J., Nannan, H., Juan, D., & Luo, G. L. (2019). *National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine*. doi:10.3389/fcimb.2019.00262
40. Luz, Z., Ana, H., Carlos, Q., & Antonio, M. (2014). Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos. *Universidad Nacional de Entre Ríos*, 25(49), 166-192. doi:ISSN: 0327-5566
41. M, R., Alemán, H., M, C., Ramírez, G., M. C., & A., M. (2018). In vitro Inhibitory effect of ethanolic propolis extract at 15% and 30% against strains of Lactobacillus. *Rev Estomatol Herediana.*, 28(1), 36-46. Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/pdf/reh/v28n1/a05v28n1.pdf>
42. Martínez, B., & Ruiz, F. (2005). Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*, 17(3), 147-156. Obtenido de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-65852005000300004

43. Mary, O. C., Alejandra, P. G., Paola, S. M., & Erika Muñoz Guarín, V. F. (2014). Porphyromonas gingivalis and systemic diseases. *Revista CES Odontología*, 18(1), 57-73.
44. Maya, J. J., Ruiz, S. J., Pacheco, R., Valderrama, S. L., & Villegas, M. V. (2011). Role of chlorhexidine in the prevention of health care related infections. *Asociación Colombiana de Infectología*, 15(2), 98-107.
45. Medeiros, A. K., Melo, L. A., Alv, R. A., Barbosa, G. A., Lima, K. C., & Carreiro, A. d. (2016). Inhibitory Effect of Cranberry Extract on Periodontopathogenic Biofilm: An Integrative Review. *J Indian Soc Periodontol*. doi:10.4103/jisp.jisp_302_16
46. Najafi, M, T., MR, M., Forouzanfar, A., Farazi, F., Mirzaee, M., & Mehrara, Z. E. (2012). Comparative study of 0.2% and 0.12% digluconate chlorhexidine mouth rinses on the level of dental staining and gingival indices. *Dental research journal*, 9(3), 305-308. doi:PMC3469897
47. Neri, E., Celis, C., Jaen, S. d., Gutiérrez, P., & Eréndira. (2009). El jugo de arándano y su papel en las infecciones de las vías urinarias. *Ginecología y Obstetricia de México*, 77(11), 512-517. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/ginobs/mex/gom-2009/gom0911e.pdf>
48. Newman, M. G., Takei, H. H., Klokkevold, P. R., & Carranza, F. A. (2014). *Periodontología Clínica Carranza 9* (9 ed.). Amolca.
49. Organización Mundial de la Salud. (2005). Manual Bioseguridad OMS. doi:ISBN 92 4 354650 3

50. Otaol, J. M., & Cuadras, F. V. (2017). Proantocianidinas del arándano: cómo combatir de forma natural la gingivitis. *Cient. Dent*, 14(3), 167-172. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22082264>
51. P, J., HV, W., C, P., & al. (2017). Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health. Cochrane. *Cochrane Database Syst Rev.*, 3(3). doi:10.1002/14651858.CD008676.pub2
52. Perfecto, D. R., Nakata, H. M., & Cadillo., E. M. (2011). Porphyromonas gingivalis: predominant pathogen in chronic periodontitis. (U. N. Facultad de Odontología, Ed.) *Odontol. Sanmarquina*, 14(1), 34-38. Obtenido de <https://pdfs.semanticscholar.org/24f4/2f0c0fd177b78e87a8bcceb9deb3a4a28bd0.pdf>
53. Prats, G. (2012). *Microbiología y parasitología Medica*. Madrid: Panamericana. doi:ISBN 978-84-9835-429-4
54. Romero, F. F., & Hernández, L. J. (2018). *Revista de Salud Publica*. doi:10.15446/rsap.V20n2.64654
55. Rubioa, I. S., & Mirónb, A. R. (2010). Atención farmacéutica en la enfermedad periodontal (y II). Plantas medicinales. *Elsevier*, 29(4), 62-67. Obtenido de <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-atencion-farmaceutica-enfermedad-periodontal-y-X0212047X10540729>
56. Ruiz, C. A., Naranjo, C. D., & Ramírez, C. G. (2004). Historia de la periodoncia: primeros rasgos de definición de un espacio social y conceptual y proceso de. *Revista Colombiana de Filosofía de la Ciencia*, 3(11), 77-103.
57. Russo, R. O., & Sánchez, M. S. (2006). Los flavonoides en la terapia cardiovascular. *Revista Costarricense de Cardiología*, 8(1). doi:ISSN 1409-4142

58. Sánchez, M. C., Vidal, H. R., Bartolomé, B., Figuero, E., Arribas, M. V., Sanz, M., & Herrera, D. (2020). New Evidences of Antibacterial Effects of Cranberry Against Periodontal Pathogens. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390 / foods9020246
59. Santamaría, P. C., Coronel, D., Verdugo, K., FernandaParedes, M., Yugsi, E., & Huachi, L. (2012). Ethnobotanical Study Of The Mortiño (*Vaccinium floribundum*) AS. *Revista La Granja*, 16(2). doi:10.17163/lgr.n16.2012.01
60. Serrano, M. E., López, M. L., & Espuñes, T. d. (2006). Bioactive Components of Functional Foods from Vegetable Origin. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(4). Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/579/57937408.pdf>
61. Torres, R. M., & Matías, A. E. (2005). ¿Does cranberry juice have bacteriostatic activity? *Revista de investigación clínica*. doi: ISSN 0034-8376
62. Winkelhoff, Van, A. J., Abbas, F., Siebers, & Théke. (2018). Periodoncia Clínica. (S. E. Periodoncia, Ed.) *Revista científica de la Sociedad Española*, 11 - 19.
63. Yamanaka, A., Kimizuka, R., Kato, T., & Okuda, K. (2004). Inhibitory Effects of Cranberry Juice on Attachment of Oral Streptococci and Biofilm Formation. *Oral Microbiol Immunol*. doi:10.1111/j.0902-0055.2004.00130.x.

ANEXO 1

NORMAS DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO Y EL MANEJO

MICROBIOLÓGICO

Medidas generales de seguridad Barrera La seguridad como prevención viene definida por una serie de barreras.

1. Barreras primarias: Las localizadas en tomo al origen del riesgo, como son:

- Contenedores, equipo e instrumental correcto y "buena práctica" (la técnica de trabajo ordenada y rigurosa es probablemente la mejor protección que existe)
- Uso de desinfectantes y cabinas de seguridad

2. Barreras secundarias: Localizadas en el círculo del operador, incluirán:

- Higiene personal rigurosa.
- Vacunación
- Vestimenta: uso de ropa adecuada, guantes, gafas, cabello recogido.
- No frotarse los ojos o la nariz con las manos contaminadas.
- No inhalar los aerosoles producidos durante la centrifugación, la sedimentación o el derrame de cultivos líquidos.
- Evitar ingerir microorganismos por accidente, al llevarse los dedos o el lápiz a la boca.
- No sufrir inoculación percutánea, por ejemplo, al pincharse con una aguja.
- No comer, beber, fumar o aplicarse cosméticos.
- No colocarse o quitarse lentes de contacto.
- No pipetear con la boca.
- Presuponer que todos los pacientes están potencialmente infectados por HIV u otros patógenos transportados por la sangre.

Observaciones: Las heridas en las manos deben vigilarse, ya que pueden ser una puerta de entrada a la infección. En caso de tenerlas, deben cubrirse adecuadamente con material resistente al agua. Lavarse a conciencia las manos y otras superficies de la piel tras quitarse los guantes e inmediatamente después de cualquier contaminación.

3. Barreras terciarias: Localizadas alrededor del laboratorio

- Ningún material tóxico o infeccioso abandone el laboratorio.
- Acceso restringido a determinadas áreas de laboratorio.
- Contenedores especiales para material bio-peligroso, autoclaves e incineradores para desechos contaminados.
- Acceso al laboratorio únicamente al personal capacitado.

4. Desinfección, descontaminación y esterilización

Existen muchos agentes químicos o físicos para eliminar los microorganismos podemos distinguir tres grupos: □ Agentes antisépticos: son germicidas químicos para la utilización en la piel como, por ejemplo; alcohol, eudóforos, etc.

Agentes desinfectantes: destruyen microorganismos en superficies e instrumentos, como, por ejemplo: soluciones fenólicas al 3 o 5%, hipocloritos.

Agentes esterilizantes: destruyen toda forma de vida incluidas las esporas. Por ejemplo: los sistemas de autoclave, calor seco, óxido de etileno.

5. Eliminación de residuos peligrosos

Todos los materiales contaminados son agentes potencialmente infecciosos que deben ser descontaminados antes de su eliminación. Esto implica porciones no utilizadas de las muestras de los pacientes, cultivos de las muestras cultivos almacenados de microorganismos e instrumentos descartables, por ejemplo, escalpelos y jeringas con agujas.

Los residuos infecciosos se deben descontaminar mediante autoclave, incinerador o cualquiera de los diversos métodos alternativos de tratamiento de residuos.

Mantener siempre señalizado todo con los respectivos símbolos de riesgo para los envases, lugares y reactivos.

6. Manejo del mechero de Bunsen y estufa

La llama más utilizada en el laboratorio es la producida por la combustión de un gas (propano, butano o gas ciudad), con el oxígeno del aire. La combustión completa (con exceso de oxígeno) produce agua y dióxido de carbono, una llama poco luminosa y de gran poder calorífico.

Encendido del mechero: Cerrar totalmente la entrada de aire, abrir ligeramente la llave de paso del gas y acercar, lateralmente, una cerilla encendida a la boca del cañón. Regular la llave hasta obtener una llama con la altura deseada, gradualmente, abrir la entrada de aire. No abrir repentinamente porque puede apagarse el mechero. Para obtener mayor temperatura, abrir más el flujo de gas y la entrada de aire.

Estufa: debe manejarse con precaución al igual que el mechero y siempre usar guantes para retirar los agares que se estén trabajando en ella.

Observaciones: es importante siempre tener una llama ligera y cerrar cuando no se esté trabajando, de igual manera alejar objetos o reactivos inflamables.

(Organización Mundial de la Salud, 2005)

ANEXO 2

OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE ARÁNDANO POR MACERACIÓN

El procedimiento se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de fitoquímica ubicado en el centro de análisis químico de la universidad nacional de Loja

Objetivo: Establecer el procedimiento para la elaboración de un extracto etanólico de arándano por el método de maceración.

Control: encargada de laboratorio de fitoquímica Dra. Ximena

METODOLOGÍA:

Recolección del fruto de arándano

Se obtuvo de la empresa Bio Arándanos productora de *Arándano azul Biloxi* certificados de buena calidad, los cuales se recogieron directamente de un distribuidor para ser llevados en cajas hasta las instalaciones del laboratorio de fitoquímica.

Selección y/o eliminación de impurezas

Obtenida el fruto se procedió a realizar la separación de frutos que se encontraban en condiciones no favorables, se lavó y descontaminando.

Secado del fruto (materia vegetal)

Una vez lista la selección de los frutos estos se parten a la mitad y son llevados a un triturador manual para obtener partes muy pequeñas y lograr un mejor manejo. Luego se coloca la materia vegetal (fruto arándano triturado) en bandejas de aluminio previamente esterilizadas, donde se

distribuye uniformemente para ser llevadas a la estufa de secado, a una temperatura de 40°C por un lapso de 7 días siendo constantemente movido para garantizar un secado homogéneo.

Se pesó en una balanza analítica y se comparó el peso inicial de 858,50 gr y el peso final seco de 289,20 gr, de igual manera se realizaron pruebas de humedad en lunas de reloj con cantidades de arándano seco con pesos de 16,57gr.

Maceración del arándano

Se utilizó una proporción 1:20 para realizar la maceración, colocando en un frasco de vidrio 250gr de materia vegetal (arándano seco) y 5000ml de etanol al 70%.

Luego el frasco es tapado herméticamente y tapado con papel aluminio para llevarlo a un lugar a temperatura ambiente donde permanecerá en maceración 6 días.

Proceso de filtración

Una vez terminado el tiempo de maceración procedemos a filtrar por medio de una bomba de vacío, con la ayuda de papel filtro y un matraz kitasato, esto con el fin de eliminar todas las impurezas que pudieran existir y quede solamente el extracto etanólico de arándano al 70%.

Proceso de concentración

En este proceso utilizamos un rotaevaporador que servirá para evaporar sustancias mediante destilación y luego condensarlas para separar los componentes básicos de la concentración.

Iniciamos colocando 100 ml en balón, lo ajustamos al rotaevaporador y llevamos este al baño maría a 35°C encendemos y controlamos constantemente, terminada la destilación del

etanol recogemos en un matraz la concentración de tintura madre con una concentración de 0,94% en 5,3 ml de extracto puro.

Almacenamiento

Obtenido el extracto puro de *Arándano azul Biloxi* con concentración del 0,94% se coloca en frascos ámbar estériles y se lleva a la refrigeración para su conservación.





ANEXO 3

PREPARACION DE SOLUCION ENRIQUECEDORA DE CULTIVO DE HEMINA

El procedimiento se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de microbiología ubicado en las instalaciones de la CLÍNICA MEDILAC en Loja.

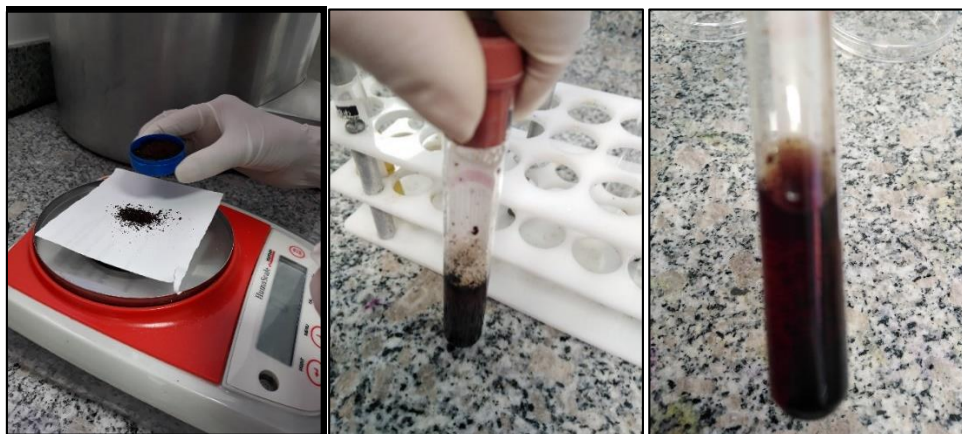
Objetivos: Establecer el procedimiento para la elaboración de una solución madre como medio enriquecedor de cultivo de Hemina, procedimiento que será aplicado en la elaboración del medio de cultivo agar sangre y caldo de tripticasa de soya.

Responsable de evaluar el procedimiento: MD. PTH. Patología. María Cumandà Charfuelàn Espinoza

METODOLOGÍA:

Para preparar la hemina pesamos 10µg en una balanza analítica, colocamos en un tubo de ensayo estéril y adicionamos 1ml de agua destilada, calentamos a temperatura ambiente 37°C agitando constantemente y luego la llevamos a centrifugar por 15 minutos a 2500 rpm todo utilizando medidas de bioseguridad y material estéril.

Observaciones: la hemina debe calentarse a temperatura ambiente y prepararse al mismo tiempo que será preparado el agar y adicionada como enriquecimiento en un medio de cultivo



ANEXO 4

PROTOCOLO PARA ACTIVACIÓN Y CONSERVACIÓN DE CEPA

PORPHYROMONAS GINGIVALIS ATCC 33227

CON EL MÉTODO DE ESTRIADO POR AGOTAMIENTO

El procedimiento se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de microbiología ubicado en las instalaciones de la CLÍNICA MEDILAC en Loja.

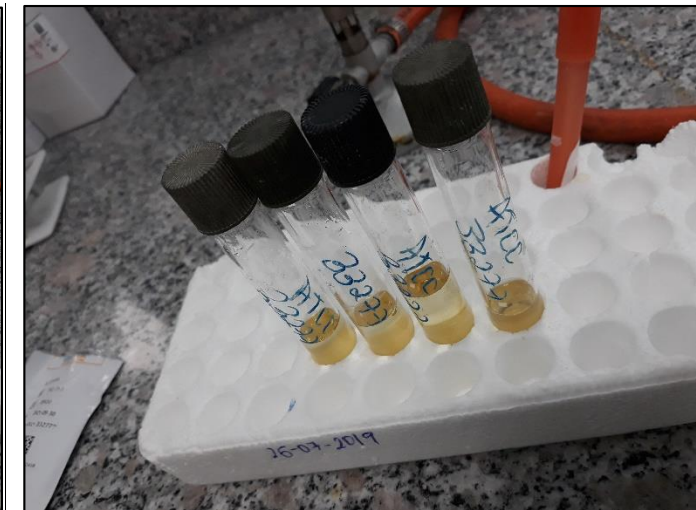
Objetivos: Establecer el procedimiento para la activación y conservación de la cepa en un medio de cultivo Agar Sangre preparado en el laboratorio de Medilac y Agar Sangre De Cordero realizado por Medibac Lab.

Responsable de evaluar el procedimiento: MD. PTH. Patología. María Cumandà Charfuelàn Espinoza

METODOLOGÍA:

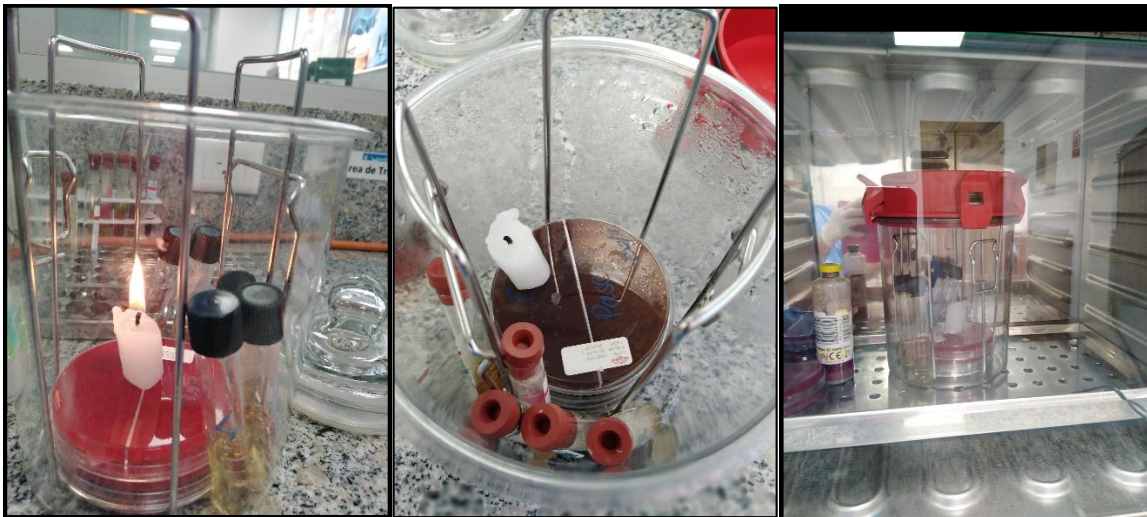
Activación de cepa control

1. Abrir el vial por la mitad en un medio estéril
2. Colocar de 0,5 ml de caldo tripticasa de soya preparado y colocar en el vial
agitar
3. Llevar el vial a la incubadora 45 minutos
4. Luego se procede a sembrar por agotamiento en agar tripticasa de soya y dejar
incubar 48 horas
5. Se realizan siembra por agotamiento en agar sangre de cordero y Agar sangre
enriquecido con vitamina K y Hemina.
6. A las 48 horas de incubación de los tubos con tripticasa se procede hacer un
pase en Agar sangre con hemina y vitamina K.



Conservación de cepa control

1. Todo el material debe estar estéril y garantizar mantenerlo en estas condiciones
2. Colocar en un tubo estéril una cantidad de 8 ml de caldo tripticasa de soya
3. De las cepas crecidas en agar sangre se procede a coger colonias de *Porphyromonas Gingivalis* KWIK-Stik™ Microbiologics, Inc. (ATCC® 33277™)
4. Realizar varios pases para garantizar la actividad microbiana cada 48 o 72 horas
5. Luego de varios pases se toma una colonia y se mide en la escala de McFarlan 0.5 estandarizada de la carga bacteriana.



ANEXO 5

PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO AGAR SANGRE

El procedimiento se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de microbiología ubicado en las instalaciones de la CLÍNICA MEDILAC en Loja.

Objetivos: Establecer el procedimiento para la elaboración del medio de cultivo Agar Sangre enriquecido con Hemina y Vitamina K, procedimiento que será aplicado para la siembra de colonias ATCC 33277

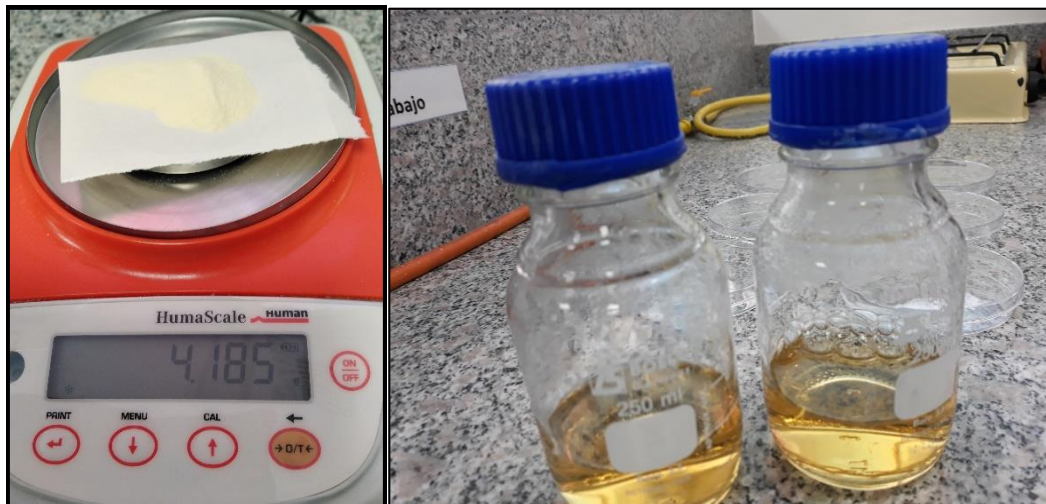
Control: MD. PTH. Patología. María Cumandà Charfuelàn Espinoza

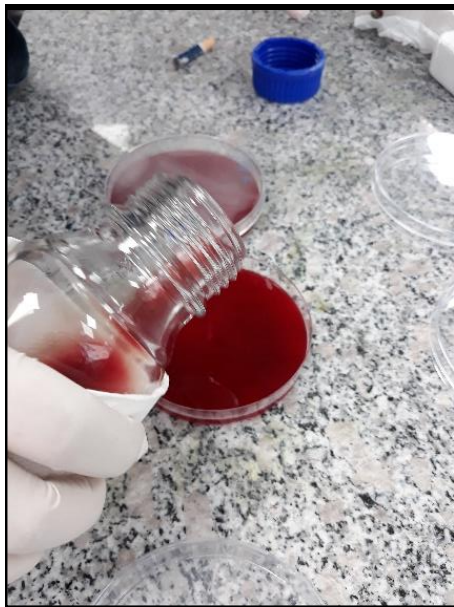
METODOLOGÍA

1. Se debe seguir las indicaciones de la casa comercial (BBL Mueller Hinton Broth) para la preparación del Agar Sangre, donde se indica suspender 40 g del polvo de Agar Base en un litro de agua destilada.
2. Realizamos el cálculo por medio de la regla de tres para el polvo y el agua destilada
3. Se realiza el peso del Agar Base en polvo en un abalanza analítica, y se procede a colocar en un frasco para añadir el agua estilada según proporción establecida, agitar bien.
4. Llevar al fuego por unos 5 minutos para que se disuelva totalmente el Agar
5. Luego llevamos la solución de Agar base a esterilización a una temperatura de 121°C por 15 minutos
6. Terminado de esterilizar retiramos y dejamos enfriar entre 45-50°C, agregamos sangre desfibrinada al 5%, se le añade Vitamina K y Hemina, para luego

homogenizar todo.

7. Se procede a distribuir el medio en las cajas de Petri estériles en una medida de 20ml en cada una, tapar dejar que pasen a un estado gelatinoso consistente para ser llevadas a un medio adecuado que evite la contaminación, en caso de utilizarlas realizarlo en una cabina de flujo laminar.





ANEXO 6

PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL AGAR: MUELLER HINTON

El procedimiento se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de microbiología ubicado en las instalaciones de la CLÍNICA MEDILAC en Loja.

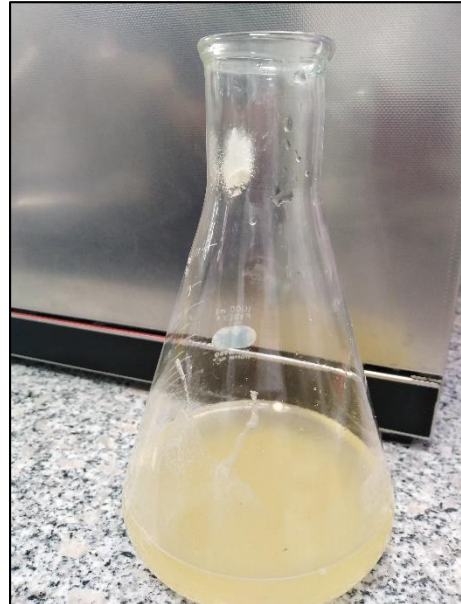
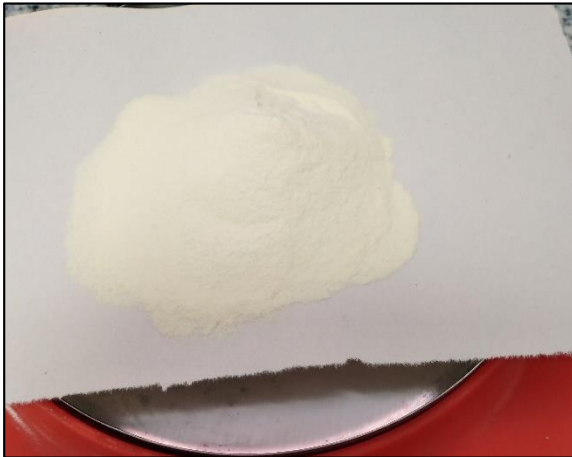
Objetivos: Establecer el procedimiento para la elaboración del medio de cultivo Agar Muller Hinton, procedimiento que será aplicado para realizar la prueba de susceptibilidad de la ATCC 33277

Responsable de evaluar el procedimiento: MD. PTH. Patología. María Cumandà Charfuelàn Espinoza

METODOLOGÍA

1. Se debe seguir las indicaciones de la casa comercial (BBL Mueller Hinton Broth) para la preparación del Agar Sangre, donde se indica suspender 38 g del polvo de Agar Mueller Hinton en un litro de agua destilada.
2. Realizamos el cálculo por medio de la regla de tres para el polvo y el agua destilada
3. Se realiza el peso del Agar Base en polvo en un abalanza analítica, y se procede a colocar en un frasco para añadir el agua estilada según proporción establecida, agitar bien.
4. Llevar al fuego por unos 5 minutos para que se disuelva totalmente el Agar
5. Luego llevamos la solución de Agar base a esterilización a una temperatura de 121°C por 15 minutos
6. Terminado de esterilizar retiramos y dejamos enfriar entre 45-50°C, agregamos sangre desfibrinada al 5%, se le añade Vitamina K y Hemina, para luego homogenizar todo.

7. Se procede a distribuir el medio en las cajas de Petri estériles en una medida de 20ml en cada una, tapar dejar que pasen a un estado gelatinoso consistente para ser llevadas a un medio adecuado que evite la contaminación, en caso de utilizarlas realizarlo en una cabina de flujo laminar.





ANEXO 7

SIEMBRA EN ESTRÍA POR AGOTAMIENTO

El procedimiento se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de microbiología ubicado en las instalaciones de la CLÍNICA MEDILAC en Loja.

Objetivo: sembrar o inocular es introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano, para su desarrollo y multiplicación. Una vez sembrado, el medio de cultivo se incuba a una temperatura adecuada para el crecimiento, y la técnica de agotamiento su finalidad es la obtención de colonias aisladas.

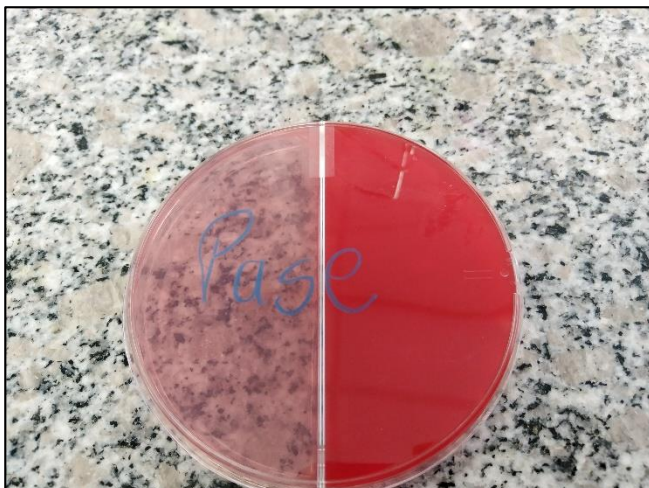
Responsable de evaluar el procedimiento: MD. PTH. Patología. María Cumandà Charfuelàn Espinoza

METODOLOGÍA:

1. Con un hisopo estéril procedemos a tomar un poco del inóculo ATCC 33277 que se encuentra en uno de los tubos de ensayo con el reconstituido en tripticasa de soya ya antes activado por 48 a 72 horas en un medio adecuado (anaerobio 37C según indicaciones de siembra de la casa comercial.
2. Debemos eliminar el exceso de carga en el hisopo presionando dentro de las paredes del tubo levemente para ser llevado a estriar.
3. Se toma la placa y se gira a 90°, se vuelve a estriar tocando 3 o 4 veces el área sembrada inicialmente y cubriendo el otro tercio de la placa.
4. Por último, se estría el resto de la superficie sin sembrar hasta agotar lo que tenemos tomado del último sector estriado, procedemos a dar dos vueltas al contorno de la placa
5. Terminado el proceso llevamos a la jarra de anaerobiosis las placas sembradas

con el inóculo activo.

6. Dentro de la jarra (Oxoid AnaeroJar 2,5 litros) de anaerobiosis colocaremos una vela encendida, cerraremos herméticamente, esperaremos a que esta se apague garantizando el consumo total de oxígeno y llevamos a la estufa a 37 de 24 a 48 horas



ANEXO 8

PROCEDIMIENTO PARA SIEMBRA EN ESTRÍA POR AGOTAMIENTO PARA LOS PASES Y LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIBACTERIANA

El procedimiento se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de microbiología ubicado en las instalaciones de la CLÍNICA MEDILAC en Loja.

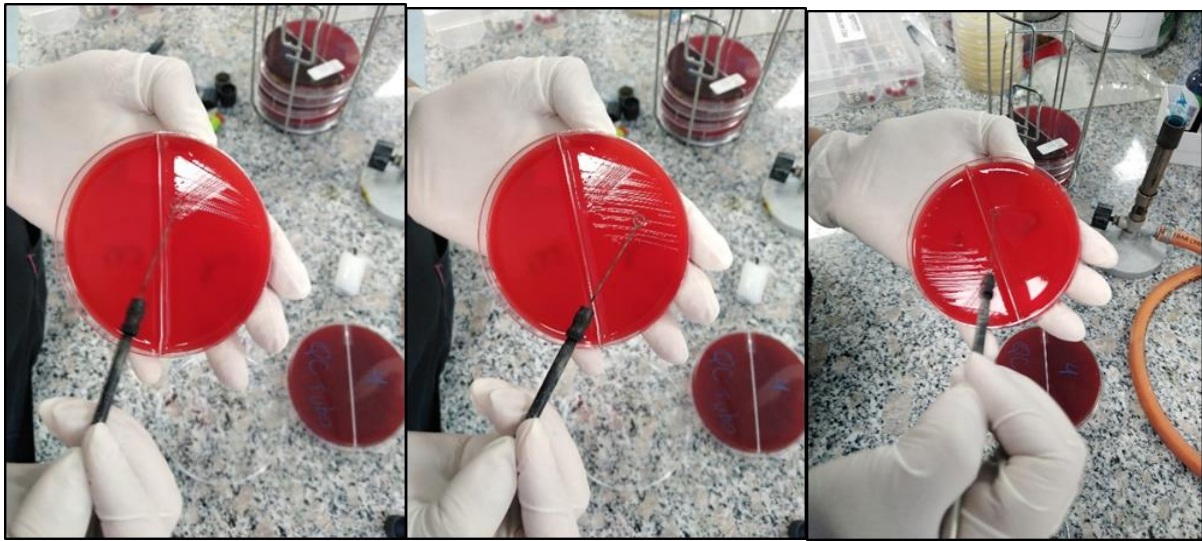
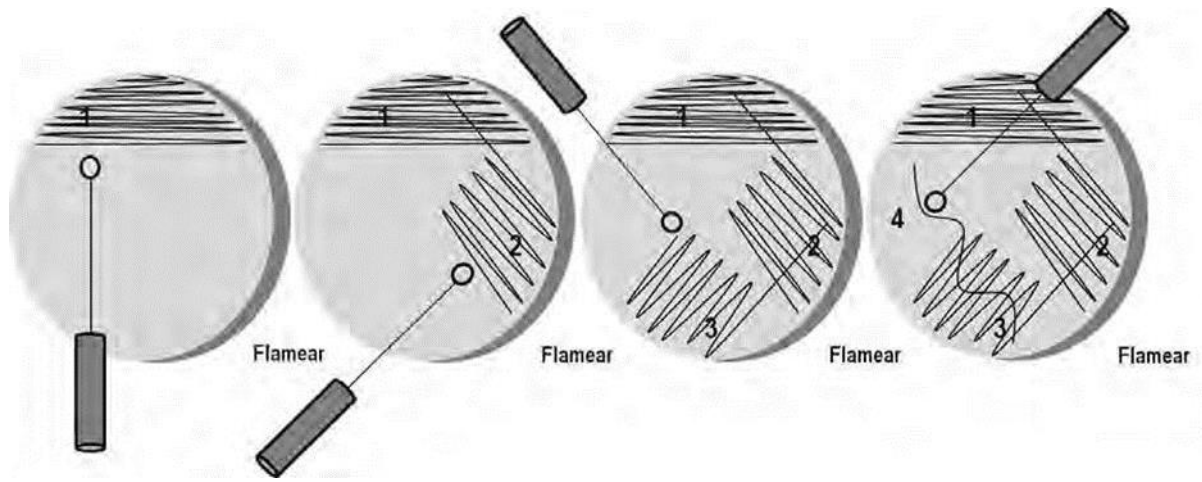
Objetivo: sembrar en un medio con una técnica y distribución adecuada, con el fin de iniciar un cultivo microbiano, para a su vez realizar en estas pruebas de sensibilidad bacteriana.

Responsable de evaluar el procedimiento: MD. PTH. Patología. María Cumandà Charfuelàn Espinoza

METODOLOGÍA:

1. Teniendo lista la caja Petri con el Agar Sangre Enriquecido y Muller Hinton iniciamos a estriar con la técnica por agotamiento.
2. Cargamos el asa con una colonia de la muestra del cultivo de ATCC 33277 y hacer estrías paralelas en la tercera parte de la superficie de la placa.
3. Luego se quema el asa, se enfría, se gira la placa a 90° y se vuelve a estriar tocando 3 o 4 veces el área sembrada inicialmente y cubriendo el otro tercio de la placa.
4. Por último, sin quemar el asa, se estriá el resto de la superficie sin sembrar hasta agotar lo que tenemos tomado del último sector estriado.
5. Procedemos a dar dos vueltas al contorno de la placa

Observaciones: trabajar en medio totalmente esterilizado, usar el asa con una leve inclinación y evitar contaminar el medio.



ANEXO 9

CARGA DE DISCOS DE SENSIBILIDAD

El procedimiento se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de microbiología ubicado en las instalaciones de la CLÍNICA MEDILAC en Loja.

Objetivo: cargar una sustancia determinada para ser colocados en un agar especializado (Muller Hinton) para determinar la actividad de la sustancia en condiciones ideales para un patógeno *Porphyromonas Gingivalis* ATCC33277

Responsable de evaluar el procedimiento: MD. PTH. Patología. María Cumandà Charfuelàn Espinoza

Definiciones:

Discos de susceptibilidad antimicrobiana

Son discos de papel utilizados en el método de difusión están hechos de papel que se ajuste a las OMS7 y la FDA normas. La impregnación de los discos asegura que las soluciones preparadas de antimicrobianos se aplican con precisión a través del papel. Los procedimientos de secado utilizados no afectan a esta distribución uniforme o provocar un deterioro en la actividad del antimicrobiano

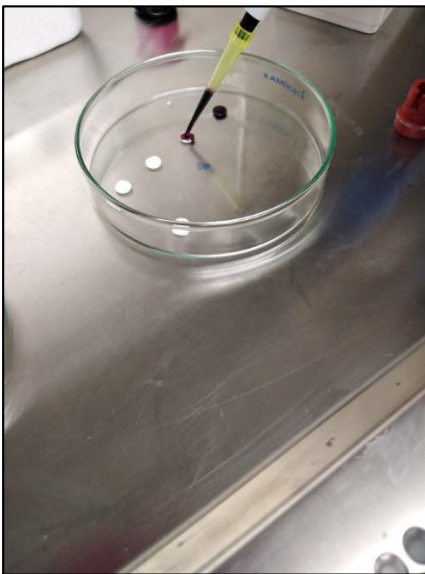
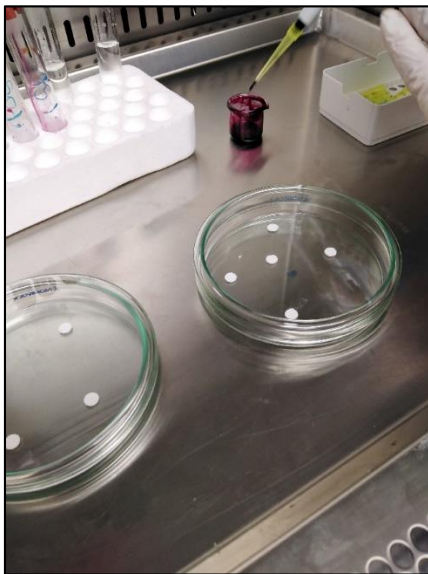
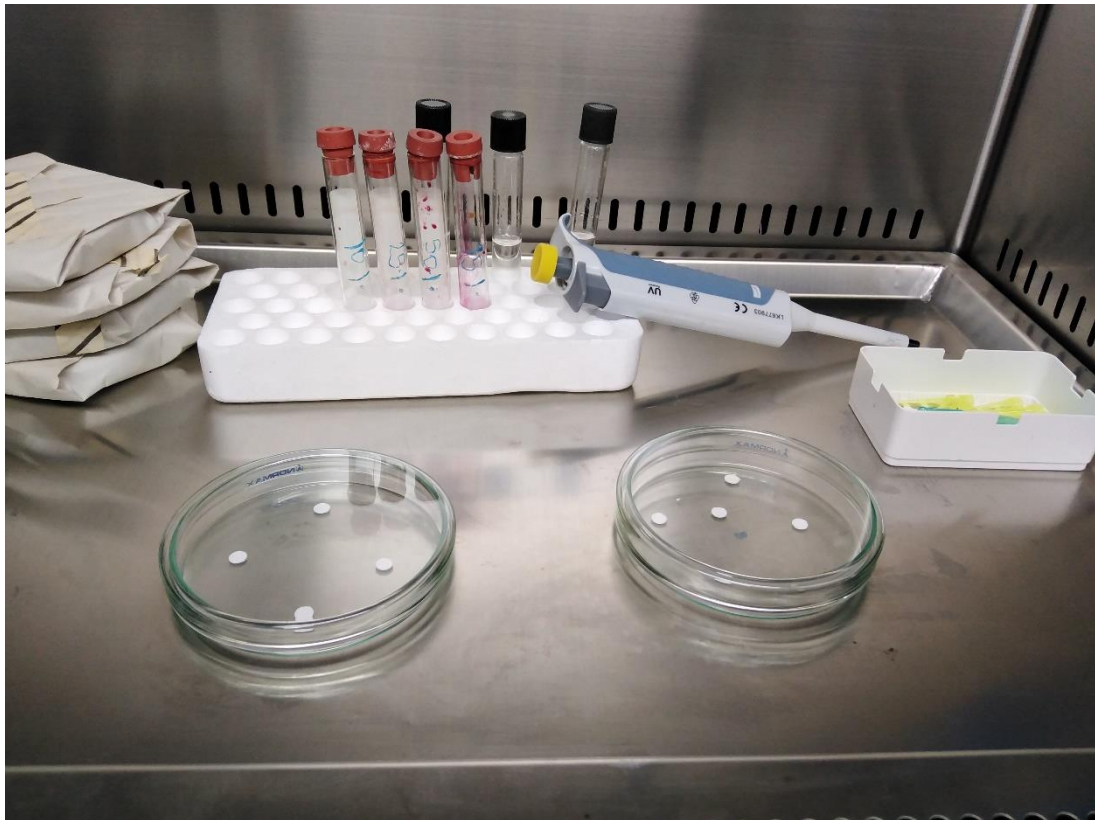
Tintura madre: Es un extracto producido a partir de plantas parte de ellas con varios procedimientos y con varios solventes como el alcohol.

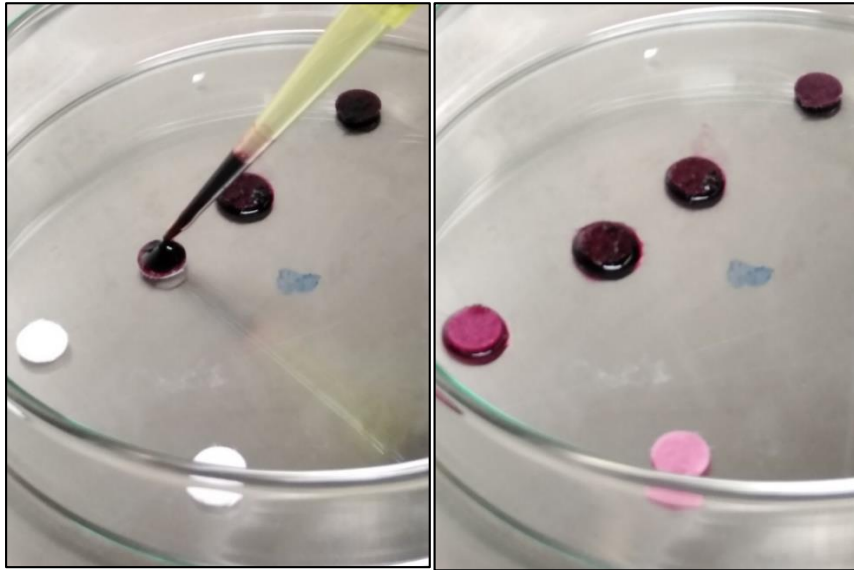
Etanol: El Etanol o alcohol etílico es un compuesto líquido, incoloro, volátil, inflamable y soluble en agua cuyas moléculas se componen de carbono, hidrógeno e hidroxilos (CH₃-CH₂-OH).

Dilución: Es diluir un volumen inicial de la concentración de un soluto (tintura madre de arándano 100% en un volumen conocido del solvente (etanol al 30%). Con esto logramos calcular la concentración mínima inhibitoria

METODOLOGÍA

1. Utilizamos el dispensador de discos (100 mm) Oxoid guardado en refrigeración según indicaciones del fabricante en un medio estéril.
2. Procedemos a extraer disco a disco con una pinza esterilizada, que llevaremos al fuego por cada contacto con el disco y con la caja Petri estéril vacía donde se realizara la carga y mediante una cámara de flujo laminar para garantizar las condiciones adecuadas.
3. Teniendo distribuidos los discos en la caja iniciaremos la carga con una pipeta vol. Variable 10-100ul usando en cada uno puntas para pipeta estériles y descartables de esta manera colocaremos una distribución de tres discos por agar.
4. Cargamos 30ul en cada disco, el primero con una concentración específica de extracto de *Arándano azul Biloxi*, el segundo con concentración de clorhexidina y el tercero un disco en blanco sin carga como prueba de control.
5. La impregnación se realiza por absorción directa del extracto de la planta en el disco en blanco en condiciones estandarizadas.





ANEXO 10

PROCEDIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DE LA TINCIÓN DE GRAM

El procedimiento se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de microbiología ubicado en las instalaciones de la CLÍNICA MEDILAC en Loja.

Objetivo: establecer un protocolo estandarizado para la realización de la tinción de Gram.

Responsable de evaluar el procedimiento: MD. PTH. Patología. María Cumandà Charfuelàn Espinoza

DEFINICIONES

Frotis: Preparación para examen microscópico, generalmente cultivos bacterianos, en la que estas sustancias se disponen sobre un portaobjeto con ayuda de otro, de manera que forman una capa muy fina.

Tinción: Acción y efecto de teñir con Colorantes o Soluciones.

Fijación: Acción y efecto de fijar, pasando el portaobjetos tres veces a través de la llama del mechero de Bunsen.

Solución Colorante: Es de naturaleza básica, el compuesto de este tipo más utilizado es el cristal violeta que tiñe bacterias Gram positivas y negativas.

Solución Mordiente: Se combina con el primer colorante y forma un complejo que es insoluble, el mordiente empleado es la solución de Yodo.

Agente Decolorante: Es un disolvente orgánico alcohol cetona. Mientras que este tratamiento decolora a las bacterias Gram negativas.

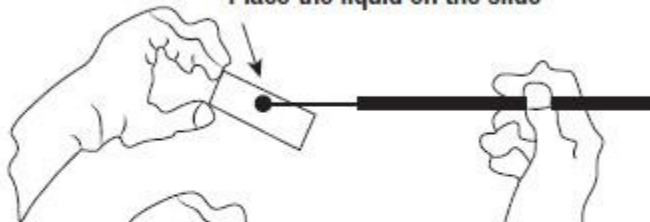
Colorante de Contraste: Es un colorante básico de distinto color que el primer colorante. El colorante de contraste más utilizado es la safranina, este colorante teñirá solo a las bacterias Gram negativas.

METODOLOGÍA

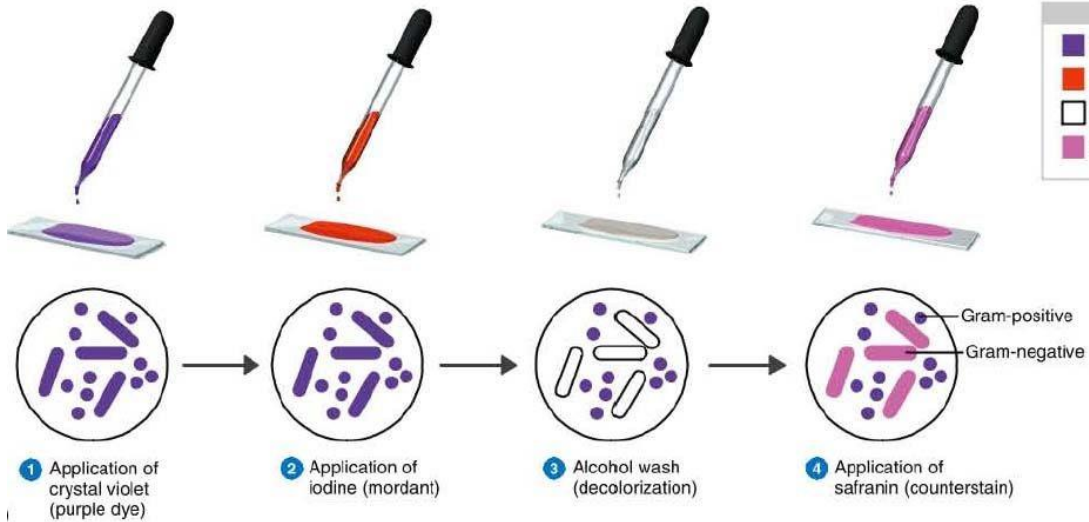
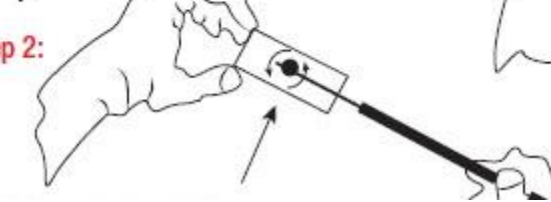
- La tinción de Gram se realiza mediante la extensión sobre un portaobjetos de una colonia bacteriana con una gota de agua estéril, se deja secar, fijar y se tiñe con varios colorantes.
- Colocar una gota de agua estéril sobre una porta objetos, con un asa estéril suspender una colonia bacteriana. Dejar secar al ambiente. Fijar el frotis pasando por el mechero de Bunsen. Dejarlo enfriar antes de aplicar la tinción.
- La tinción de Gram requiere la utilización de cuatro soluciones en el siguiente orden:
- Cubrir el frotis con cristal violeta dejando que el colorante actúe por un minuto. Enjuagar suavemente la preparación con agua corriente y dejar escurrir.
- Colocar el frotis con solución de lugol dejando que actúe el colorante un minuto y enjuagar suavemente con agua corriente y dejar que escurra.
- Cubrir el frotis con alcohol cetona por 30 segundos y enjuagar suavemente la preparación con agua corriente y dejar que escurra.
- Por ultimo colocamos una solución de Safranina dejando que el colorante actúe por un minuto. Enjuagar suavemente la preparación con agua corriente y dejar secar la preparación al aire libre.
- Y procedemos a observar en el microscopio las colonias de la ATCC 37277

Step 1:

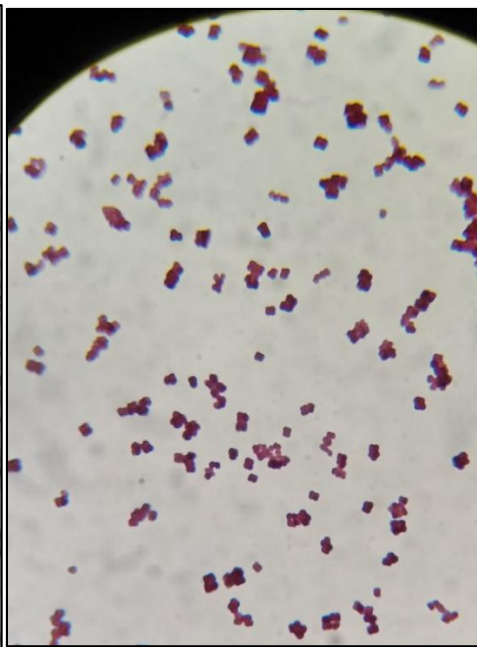
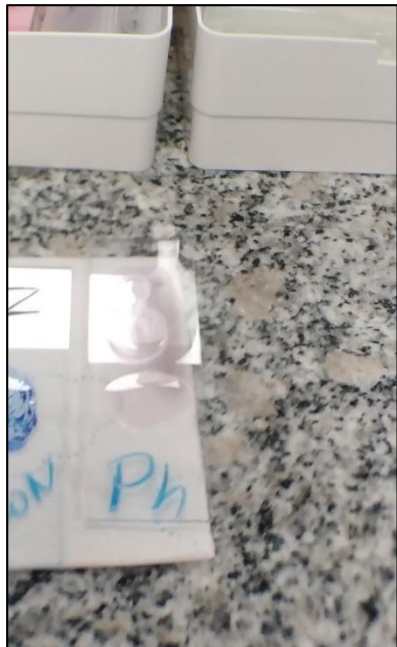
Place the liquid on the slide



Step 2:



KEY	
■	Crystal violet
■	Iodine
	Alcohol
■	Safranin



ANEXO 11

PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL PATRÓN N.- 5 DE MAC FARLAND

Patrón Mac Farland: es una escala de turbidez, cuya finalidad es establecer una relación entre una precipitación química y una suspensión bacteriana.

Objetivo: proporciona una densidad óptica comparable a la densidad de una suspensión bacteriana de 1.5×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml.

Preparación del patrón de turbidez MacFarland 0.5

Técnica

- Una vez sembrado y obtenido el crecimiento de los microorganismos de una muestra clínica, “evaluar correctamente” el hallazgo antes de decidir la realización del antibiograma.
- Seleccionar 4 a 5 colonias similares del microorganismo susceptible de practicar el antibiograma y colocarlas en el caldo de cultivo.
- Incubar a 37°C y mantenerlos en esa temperatura de 2 a 5 horas.
- Ajustar la turbidez del cultivo a la turbidez del estándar MacFarland 0.5.
- Si la turbidez del cultivo sobrepasa a la del estándar diluir con agua destilada estéril a la concentración deseada.



ANEXO 12

OBJETIVO GENERAL

Conocer el efecto antibacteriano del extracto de Arándano azul Biloxi (*Vaccinium corymbosum*) cv. sobre cepas de *Porphyromonas Gingivalis* ATCC 33277 mediante un diseño experimental in vitro.

Objetivos específicos

- Comparar la efectividad antimicrobiana del extracto Arándano azul Biloxi (*Vaccinium corymbosum*) cv. frente a la clorhexidina 0,12%.
- Determinar la sustentividad antimicrobiana del extracto Arándano azul Biloxi (*Vaccinium corymbosum*) cv. Bioxil sobre cepas de *Porphyromonas Gingivalis* ATCC 33277 en diferentes concentraciones.
- Analizar los halos de inhibición de cada una de las muestras correspondientes a las concentraciones del extracto Arándano azul Biloxi (*Vaccinium corymbosum*) cv. sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 en un grupo de control positivo y negativo, para determinar la capacidad mínima inhibitoria.



BIO ARANDANO

Juan Montalvo S8-82 y Córdova Galarza
Cayambe - Pichincha
gerentegeneral@bioarandano.com.ec

Cayambe, 09 de Julio del 2019



CERTIFICADO

Por medio del presente documento se certifica que la empresa Bio Arándano con RUC: 1091763695001 es la proveedora del producto con marca FRUTA FRESCA BIO ARANDANO con EAN 13 - 7868000817300

La presente certificación se expide a solicitud de la Dra. María del Pilar Muñoz Oviedo.

Atentamente
Jefferson Loor

Gerente General Bio Arándano



BIO ARÁNDANO
RUC: 1091763695001
r. Juan Montalvo S8-82 y Córdova Galarza



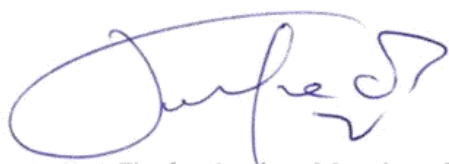


Loja, 15 de noviembre del 2019

A QUIEN INTERESE/CORRESPONDA:

Certifico que en el herbario "Reinaldo Espinosa" –LOJA- de la Universidad Nacional de Loja, se ha realizado la identificación taxonómica de la planta denominada Arándano, que corresponde a la especie *Vaccinium corymbosum* L. de la familia Ericaceae, que consta en las bases Tropicos y The Plant List, que son referencias válidas para la ciencia.

Lo certifico para los fines pertinentes.



Ing. Zhofre Aguirre Mendoza Ph.D.



DIRECTOR DEL HERBARIO LOJA



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Porphyromonas Gingivalis Catalog Number: 0912 Lot Number: 912-71** Reference Number: ATCC® 33277™* Purity: Pure Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2021/9/30 Release Information: Quality Control Technologist: Mary L Bowman Release Date: 2019/10/23
---	---

Performance	
Macroscopic Features: Small, circular, transparent colonies that become brown with age. Microscopic Features: Gram negative rod, pleomorphic bacillary to coccoid forms.	Medium: A/R SBAP Method: Gram Stain (1)

ID System: MALDI-TOF (1)

See attached ID System results document.

Amanda Kuperus
 Quality Control Manager
 AUTHORIZED SIGNATURE

**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.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

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

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(*) 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.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.



Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results


+ Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
200 – 300	High-confidence identification	(+++)	green
170 – 199	Low-confidence identification	(+)	yellow
000 – 169	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: 2019-10-22T09:52:42.942 MLB

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

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
E11 (+++) (A)	912-71	Porphyromonas gingivalis	2.22

Comments:

N/A

Loja, 06 de mayo de 2020

Por medio de la presente

Certifico.

Que la Sra. María de Pilar Muñoz Oviedo, con Número de pasaporte: AW329920, egresada de la carrera de Odontología de la Universidad Nacional de Loja realizó el acompañamiento de los procedimientos en microbiología durante el desarrollo del tema de investigación: "ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS DEL EXTRACTO DE ARANDANO FRENTE A LA CLORHEXIDINA AL 0,12% EN EL EFECTO INHIBITORIO DE UN PATOGENO PERIODONTOPATOGENO (PORPHYROMONAS GINGIVALIS) ESTUDIO IN VITRO", durante el tiempo comprendido entre Noviembre de 2019 y febrero de 2020; desempeñándose de forma responsable e intachable durante todo este tiempo.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad, facultando a la interesada hacer uso del presente en lo que creyera conveniente dentro de los límites legales.



MD. PATH. M. CUMANDA CHARFUELAN ESPINOZA

MEDICO ESPECIALISTA EN PATOLOGIA CLINICA/MEDICINA DE LABORATORIO

ENCARGADA DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA-MEDILAB.

ATENCIÓN

24 HORAS

 Av. Eugenio Espejo y Shuaras
 73950600 * LOJA - ECUADOR
 Correo: medilabloja@hotmail.com • Loja – Ecuador

www.medilab.com.ec



UNL

Universidad
Nacional
de Loja

108
Facultad
de la Salud
Humana

Of.N° 581-DCO-FSH-UNL

Loja, 23 de julio de 2019

Srta. María Muñoz Oviedo

ESTUDIANTE DE LA CARRERA DE ODONTOLOGÍA DE LA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA.

Presente,

Estimada estudiante

Con un cordial y atento saludo, atendiendo la petición presentada por usted para aprobación del tema, me permito comunicarle que en sesión de Consejo Consultivo de fecha 23 de julio de 2019, se aprobó el tema planteado titulado ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS DEL EXTRACTO DE ARÁNDANO FRENTE A LA CLORHEXIDINA AL 0.12% EN EL EFECTO INHIBITORIO DE UN PERIODONTOPATOPATOGENO (PORPHYROMONAS GINGIVALIS) ESTUDIO IN VITRO". por lo que pongo a su conocimiento para los fines pertinentes.

Atentamente,

Dra. Deisy Patricia Saraguro Ortega Mg .
**GESTORA ACADÉMICA DE LA CARRERA
DE ODONTOLOGÍA DE LA FSH-UNL**



DSO/ep

C.c Archivo



UNL

Universidad
Nacional
de Loja

109

Facultad
de la Salud
Humana

OF. N.º 537-DCO-FSH-UNL

Loja, 08 de julio de 2019

Odt. Esp. Juan Peñafiel Vintimilla


DOCENTE DE LA CARRERA DE ODONTOLOGÍA DE LA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA.

Presente.

Estimado docente con un cordial y atento saludo pongo a su conocimiento que se le ha designado docente tutor a fin de que se le brinde las directrices necesarias en la construcción del proyecto de investigación a la Srta. Maria del Pilar Muñoz Oviedo, estudiante del IX ciclo de la Carrera de Odontología,

Particular que pongo a su conocimiento para los fines legales pertinentes.

Atentamente,


Dra. Deisy Patricia Saraguro Ortega Mg.
**GESTORA ACADÉMICA DE LA CARRERA
DE ODONTOLOGÍA DE LA FSH-UNL**



DSO/ep

C.c. Srta. Maria del Pilar Muñoz Oviedo, Archivo,



UNL

Universidad
Nacional
de Loja

110
Facultad
de la Salud
Humana

OF. N.º 753-DCO-FSH-UNL

Loja, 09 de septiembre de 2019

Srta. María del Pilar Muñoz Oviedo

ESTUDIANTE DE LA CARRERA DE ODONTOLOGÍA, DE LA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA.

De mi consideración

Estimada estudiante, adjunto al presente el informe de pertinencia emitida por el docente Odt. Esp. Juan Peñafiel Vintimilla, de su proyecto de tesis titulado **"ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS DEL EXTRACTO DE ARÁNDANO FRENTE A LA CLORHEXIDINA AL 0,12% EN EL EFECTO INHIBITORIO DE UN PERIODONTOPATOGENO (PORPHYROMONAS GINGIVALIS) ESTUDIO IN VITRO"**.

Particular que pongo a su conocimiento para los fines pertinentes.

Atentamente

Dra. Deisy Patricia Saraguro Ortega Mg.
**GESTORA ACADÉMICA DE LA CARRERA
DE ODONTOLOGÍA DE LA FSH-UNL**



DSO/ep

C.c. Archivo,

Oficio Nro. 290-DI-UNL-2019
Loja, 24 de julio de 2019

Ingeniero
Patricio Aguirre Carrión
RESPONSABLE DEL LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO
Ciudad.

De mi consideración:

Para su conocimiento y fines pertinentes remito a usted el oficio Nro. 564-DCO-FSH-UNL suscrito por la Dra. Deisy Saraguro Gestora Académica de la carrera de Odontología relacionado con el **proyecto de investigación que realizará la Srta María del Pilar Muñoz Oviedo estudiante del noveno ciclo de la carrera de Odontología de la Facultad de la Salud Humana** para que coordine estas actividades.

Particular que comunico a usted para los fines pertinentes.

Atentamente,



Ing. Max Encalada Córdova PhD
DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN



Copia : archivo

MEC/fao

Recibido
25-06-2019
11:07
T.S.

English Speak Up Center

Nosotros "English Speak Up Center"

CERTIFICAMOS que

La traducción del resumen de tesis titulada "ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS DEL EXTRACTO DE ARÁNDANO FRENTE A LA CLORHEXIDINA AL 0,12%, EN EL EFECTO INHIBITORIO DE UN PERIODONTOPATÓGENO (PORPHYROMONAS GINGIVALIS) ESTUDIO IN VITRO." documento adjunto solicitado por la señorita María del Pilar Muñoz Oviedo con cédula pasaporte número AW329920 ha sido realizada en el Centro Particular de Enseñanza de Idiomas "English Speak Up Center".

Esta es una traducción textual del documento adjunto. El traductor es competente y autorizado para realizar traducciones.

Loja, 24 de julio de 2020


Mg. Sc. Elizabeth Sánchez Burneo

DIRECTORA ACADÉMICA

