



Universidad Internacional del Ecuador

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DEL ECUADOR FACULTAD DE
CIENCIAS MÉDICAS, DE LA SALUD Y DE LA VIDA ESCUELA DE
ODONTOLOGÍA**

**EFECTO INHIBITORIO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE
ARÁNDANO AZUL (*VACCINIUM CORYMBOSUM*) EN DIFERENTES
CONCENTRACIONES: 25 %, 50 %, 75 %, 100 %, FRENTE A LA CEPA
DE *FUSOBACTERIUM NUCLEATUM*, EN RELACIÓN CON LA
CLORHEXIDINA AL 0.12 %**

ESTUDIO MICROBIOLÓGICO IN VITRO

**TRABAJO DE TITULACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE TÍTULO DE
ODONTÓLOGO**

ANTONIO SEBASTIÁN FLORES TAPIA

TUTORA: DRA. ALICIA MARTÍNEZ

COTUTORA: DRA. AMPARO FUENTES

SEPTIEMBRE, 2020

CERTIFICACIÓN

Yo, Antonio Sebastián Flores Tapia, con cédula de identidad número 1720037645, declaro bajo juramento que el trabajo titulado **“Efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico de arándano azul (*Vaccinium corymbosum*) en diferentes concentraciones: 25 %, 50 %, 75 % y 100 %, frente a la cepa *Fusobacterium nucleatum*, en relación con la clorhexidina al 0.12 %”** es de mi autoría y que no ha sido presentado anteriormente como trabajo de titulación para la obtención de un título profesional. He realizado el trabajo investigativo y consultado la bibliografía necesaria para su elaboración.

Cedo mis derechos de propiedad intelectual a la Universidad Internacional del Ecuador, para que sea publicada y divulgada en internet, según lo establecido en la Ley de Propiedad Intelectual, reglamento y leyes.



CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

Yo, Dra. Alicia Martínez, certifico que conozco al autor del presente trabajo, siendo él responsable tanto de su originalidad y autenticidad, como de su contenido.



Dra. Alicia Martínez Martínez.

DEDICATORIA

A quien siempre me ayudó a salir adelante, Dios.

A mis padres, que gracias a ellos mi meta fue posible y por nunca dejarme caer y siempre apoyarme.

A mi hermano, quien es pilar fundamental en mi vida y motor para salir adelante, quien va a seguir mis pasos.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora de trabajo de titulación, doctora Alicia Martínez, por ser una gran maestra a lo largo de mi carrera y por ayudarme a cumplir mi meta.

A mi cotutora de trabajo de titulación, doctora Amparo Fuentes, por compartir su tiempo y experiencia para la realización de este trabajo.

A todos los docentes que tuve a lo largo del camino ya que han sabido impartir bien los conocimientos que me ayudaran a ser un buen profesional y un buen ser humano.

A todos mis amigos que hice a lo largo del camino, especialmente a mi gran amigo Esteban Izurieta, ya que aparte de ser uno de mis mejores amigos tuve el honor de realizar este trabajo junto a él.

Al personal de la clínica, que con su trabajo y su amistad se logró un ambiente de trabajo amigable y respetuoso en la clínica de especialidades Odontológicas de la Universidad Internacional del Ecuador.

RESUMEN

La población puede presentar enfermedad periodontal desde etapas tempranas de la vida (niñez y adolescencia) aunque el mayor porcentaje de personas que padecen esta enfermedad está asociado a la edad adulta y tercera edad. Esta enfermedad es causada principalmente por bacterias periodontopatógenas entre las cuales tenemos a *Fusobacterium nucleatum* el cual tiene un papel clave en el inicio y desarrollo de la enfermedad periodontal (Zerón y Gutiérrez de Velasco & Porras Lira, 2016).

Los polifenoles presentes en el arándano azul han sido relacionados con actividad antimicrobiana (Basu, Masek, & Ebersole, 2018), por lo tanto, la obtención de su extracto puede ser capaz de demostrar resultados prometedores para la neutralización de la microbiota que se relaciona como factor etiológico de la enfermedad periodontal. Para determinar la eficacia del extracto hidroalcohólico del arándano azul, éste fue dispersado a través del método de difusión en agar Kirby-Bauer, ampliamente utilizado para determinar la sensibilidad de cierto microorganismo frente a un agente antimicrobiano específico.

Se demostró la presencia de efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico de arándano azul ante la bacteria *Fusobacterium nucleatum*, además de una diferencia de la eficacia frente a la clorhexidina al 0.12% de concentración que fue tomada como gold estándar, concluyendo con la viabilidad de utilización en enjuagues bucales u otros productos a base de arándano azul para la prevención y control de la enfermedad periodontal.

Palabras clave: *Fusobacterium nucleatum*, arándano azul, Kirby-Bauer, periodontitis, colutorio.

ABSTRACT

Population in general may suffer periodontal disease since early stages of life (childhood and adolescence) although the highest average of people with periodontal disease, is associated to adults and seniors, the main cause of periodontal disease is the presence of periodontopathic bacteria, the *Fusobacterium nucleatum* is one of them and has a key role in the beginning and development of periodontal disease (Zerón y Gutiérrez de Velasco & Porras Lira, 2016).

Blueberry (*Vaccinium corymbosum*) contains significant amounts of polyphenols to which an antimicrobial effect have been associated (Basu, Masek, & Ebersole, 2018). Therefore, obtaining blueberry hydroalcoholic extract may be able to demonstrate promising results for the neutralization of microbiota associated as an etiological factor. To determinate the effectiveness of blueberry hydroalcoholic extract, it was scattered through Kirby-Bauer agar diffusion method, widely used to determinate the sensibility of a certain microorganism against an specific antimicrobial.

The inhibitory effect of the blueberry hydroalcoholic extract against *Fusobacterium nucleatum* bacteria has been demonstrated, besides the difference in efficacy against 0,12% chlorhexidine that was taken as a gold standard, concluding with the viability of blueberry-based mouthwashes and other products to prevent and control the periodontal disease.

Key words: *Fusobacterium nucleatum*, blueberry plants, Kirby-Bauer, periodontal disease, mouthwash.

ÍNDICE

1.	Introducción	1
2.	Planteamiento del problema.....	2
3.	Objetivos	4
3.1.	Objetivo general	4
3.2.	Objetivos específicos.....	4
4.	Justificación	5
5.	Hipótesis	6
5.1.	Hipótesis nula.....	6
	Marco teórico.....	7
	CAPÍTULO I.....	7
1.	Periodonto.....	7
1.1	Periodonto de inserción.....	7
1.2	Periodonto de protección.....	8
2.	Enfermedad periodontal.....	9
2.1	Clasificación de enfermedades periodontales	9
2.2	Determinantes de diagnóstico periodontal	10
2.3	Gingivitis.....	13
2.4	Periodontitis	14
	Etiología de la enfermedad periodontal	17
	Factores locales	17
	Factores sistémicos.....	17

CAPÍTULO II.....	18
3. Biofilm	18
3.1 Formación del biofilm.....	18
3.2 Manejo del biofilm.....	20
3.2.1 Control mecánico del biofilm.....	20
3.2.2 Control químico del biofilm.....	20
3.2.3 Características ideales de los agentes químicos para el control de placa.....	20
3.2.4 Clorhexidina.....	20
3.2.5 Mecanismo de acción de la clorhexidina	21
3.2.6 Uso de clorhexidina en odontología.....	21
3.2.7 Efectos secundarios de la clorhexidina	21
4. Microorganismos en la cavidad oral	22
4.1 Microorganismos Periodontopatógenos.....	22
4.2 Fusobacterium nucleatum	23
4.2.1 Taxonomía.....	24
4.2.2 Estructura y morfología.....	24
4.2.3 Factores de virulencia	24
5. Medicina natural y tradicional	25
5.1 Fitoterapia	25
5.2 Arándano azul	26
5.2.1 Taxonomía arándano azul	27
5.2.2 Botánica arándano azul	28

5.2.3 Valores nutricionales del arándano azul	28
5.2.4 Compuestos fenólicos del arándano azul	29
CAPÍTULO III	31
Tipología de la investigación	31
1. Población y muestra.....	32
1.1. Población.....	32
1.2. Muestra.....	32
2. Criterios de inclusión y de exclusión.....	33
2.1. Criterios de inclusión	33
2.2. Criterios de exclusión.....	33
3. Variables	33
3.1. Variables independientes.....	33
3.2. Variables dependientes.....	34
3.3. Operación de variables	34
4. Materiales.....	35
4.1. Instalaciones	35
4.2. Tipos de materiales empleados	35
Barreras de protección.....	35
Insumos	35
Sustancias.....	36
Instrumentos	36
Artefactos	37

5. Procedimiento	37
5.1. Adquisición del arándano azul	37
5.2. Elaboración del extracto hidroalcohólico de arándano azul.....	37
5.3. Efecto de inhibición Kirby-Bauer	39
5.3.1. Medio de cultivo	39
5.3.2. Activación de la cepa liofilizada <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC® 25586™	41
5.3.3. Tinción Gram.....	43
5.3.4. Obtención del grado de turbidez	47
5.3.5. Preparación de las cajas monopetri con la sustancia a inocular.....	48
5.3.6. Impregnación y distribución de los discos de papel filtro.....	49
5.3.7. Proceso incubatorio <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC® 25586™.....	52
5.3.8. Obtención de los resultados	53
5.3.9. Halos inhibitorios	54
Extracto hidroalcohólico de arándano azul al 25 %	54
Extracto hidroalcohólico de arándano azul al 50 %	55
Extracto hidroalcohólico de arándano azul al 75 %	56
Extracto hidroalcohólico de arándano azul al 100%	57
5.3.10 Recolección de residuos	58
Resultados	59
Exposición de datos.....	59
1 ANOVA	60

1.1 ANOVA: Comparación de halos inhibitorios a las 24 horas: arándano azul 25%, 50%, 75%, clorhexidina al 0,12% y agua destilada.....	60
1.2 ANOVA: Comparación de halos inhibitorios a las 48 horas: arándano azul 25%, 50%, 75%, clorhexidina al 0,12% y agua destilada.....	62
1.3 ANOVA: Comparación de halos inhibitorios a las 72 horas: arándano azul 25%, 50%, 75%, clorhexidina al 0,12% y agua destilada.....	64
2 Pruebas post hoc TUKEY	66
2.1 TURKEY: Comparación a las 24 horas: arándano azul 25%, 50%, 75%, clorhexidina al 0,12% y agua destilada.....	66
2.2 TURKEY: Comparación a las 48 horas: arándano azul 25%, 50%, 75%, clorhexidina al 0,12% y agua destilada.....	69
2.3 TURKEY: Comparación a las 72 horas: arándano azul 25%, 50%, 75%, clorhexidina al 0,12% y agua destilada.....	71
3 Prueba t student	74
3.1 Prueba <i>t student</i> del extracto hidroalcohólico de arándano azul al 25%	74
3.2 Prueba <i>t student</i> del extracto hidroalcohólico de arándano azul al 50%.....	75
3.3 Prueba <i>t student</i> del extracto hidroalcohólico de arándano azul al 75%.....	76
3.4 Prueba <i>t student</i> del extracto hidroalcohólico de arándano azul al 100%.....	77
3.5 Prueba <i>t student</i> de la clorhexidina al 0,12%.	78
3.6 Prueba <i>t student</i> del agua destilada.	79
4 Prueba chi-cuadrada de Pearson.....	80
4.1 Prueba chi-cuadrada de Pearson de sustancias a las 24 horas.....	80

4.2 Prueba chi-cuadrada de Pearson de sustancias a las 48 horas.....	81
4.3 Prueba chi-cuadrada de Pearson de sustancias a las 72 horas.....	83
Discusión	85
Conclusiones.....	87
Recomendaciones	88
Bibliografía.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Pirámide de Socransky	22
Figura 2: Producto: extracto hidroalcohólico de arándano azul 25%, 50%, 75% y 100% ..	38
Figura 3 y Figura 4: Preparación del medio de cultivo Müller-Hinton	39
Figura 5 y Figura 6: Preparación del medio de cultivo Müller-Hinton	40
Figura 7 y Figura 8: Preparación del medio de cultivo Müller-Hinton	40
Figura 9 y Figura 10: Activación de la cepa liofilizada <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC® 25586™	41
Figura 11 y Figura 12: Activación de la cepa liofilizada <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC® 25586™	42
Figura 13: Activación de la cepa liofilizada <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC® 25586™	42
Figura 14 y Figura 15: Tinción Gram <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC® 25586™	44
Figura 16: Tinción Gram <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC® 25586™	44
Figura 17: Tinción Gram <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC® 25586™	45
Figura 18 y Figura 19: Tinción Gram <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC® 25586™	45
Figura 20: Tinción Gram <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC® 25586™	46
Figura 21: Tinción Gram <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC® 25586™	46
Figura 22 y Figura 23: Obtención del grado de turbidez	47
Figura 24 y Figura 25: Obtención del grado de turbidez	48
Figura 26: Preparación de las cajas Petri con la sustancia por inocular	48
Figura 27 y Figura 28: Preparación de las cajas Petri con la sustancia por inocular	49
Figura 29 y Figura 30: Preparación de las cajas Petri con la sustancia por inocular	50
Figura 31: Preparación de las cajas Petri con la sustancia por inocular	50
Figura 32: Preparación de las cajas Petri con la sustancia por inocular	51
Figura 33 y Figura 34: Preparación de las cajas Petri con la sustancia por inocular	51

Figura 35: Micropipeta estandarizada	Figura 36: Cajas Petri listas	52
Figura 37: Proceso incubatorio <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC® 25586™.....		52
Figura 38 y Figura 39: Proceso incubatorio <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC® 25586™		53
Figura 40: Regla ZoneScale™		53
Figura 41: Halos inhibitorios a las 24 horas	Figura 42: Halos inhibitorios a las 48 horas	54
Figura 43: Halos inhibitorios a las 72 horas		54
Figura 44: Halos inhibitorios a las 24 horas	Figura 45: Halos inhibitorios a las 48 horas	55
Figura 46: Halos inhibitorios a las 72 horas		55
Figura 47: Halos inhibitorios a las 24 horas	Figura 48: Halos inhibitorios a las 48 horas	56
Figura 49: Halos inhibitorios a las 72 horas		56
Figura 50: Halos inhibitorios a las 24 horas	Figura 51: Halos inhibitorios a las 48 horas	57
.....		57
Figura 52: Halos inhibitorios a las 72 horas		57
Figura 53 y Figura 54: Recolección y manejo de desechos		58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Valores nutricionales del arándano azul.....	28
Tabla 2: Compuestos fenólicos del arándano azul	29
Tabla 3: Operación de variables	34
Tabla 4: Comparación a las 24 horas: arándano azul 25%, 50%, 75%, clorhexidina al 0,12% y agua destilada.....	60
Tabla 5: ANOVA 24 horas.....	61
Tabla 6: Comparación a las 48 horas: arándano azul 25%, 50%, 75%, clorhexidina al 0,12% y agua destilada.....	62
Tabla 7: ANOVA 48 horas.....	63
Tabla 8: Comparación a las 72 horas: arándano azul 25%, 50%, 75%, clorhexidina al 0,12% y agua destilada.....	64
Tabla 9: ANOVA 72 horas.....	65
Tabla 10: Pruebas <i>post hoc</i> (Tukey) del extracto hidroalcohólico de arándano azul a las 24 horas	66
Tabla 11: Turkey 24 horas.....	67
Tabla 12: Pruebas <i>post hoc</i> (Tukey) del extracto hidroalcohólico de arándano azul a las 48 horas	69
Tabla 13: Turkey 48 horas.....	70
Tabla 14: Pruebas <i>post hoc</i> (Tukey) del extracto hidroalcohólico de arándano azul a las 72 horas	71
Tabla 15: Turkey 72 horas.....	73
Tabla 16: Comparación entre las 24 horas – 48 horas – 72 horas arándano azul 25%	74
Tabla 17: Comparación entre las 24 horas – 48 horas – 72 horas arándano azul 50%	75
Tabla 18: Comparación entre las 24 horas – 48 horas – 72 horas arándano azul 75%	76

Tabla 19: Comparación entre las 24 horas – 48 horas – 72 horas arándano azul 100%	77
Tabla 20: Comparación entre las 24 horas – 48 horas – 72 horas clorhexidina al 0,12% ...	78
Tabla 21: Comparación entre las 24 horas – 48 horas – 72 horas clorhexidina al 0,12% ...	79
Tabla 22: Sensibilidad de las sustancias a las 24 horas	80
Tabla 23: Prueba chi-cuadrada de Pearson sustancias a las 24 horas.....	81
Tabla 24: Sensibilidad de las sustancias a las 48 horas	81
Tabla 25: Prueba chi-cuadrada de Pearson sustancias a las 48 horas.....	82
Tabla 26: Sensibilidad de las sustancias a las 72 horas	83
Tabla 27: Prueba chi-cuadrada de Pearson sustancias a las 72 horas.....	83

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico Estadístico 1: Comparación de medias del extracto hidroalcohólico de arándano azul en diferentes concentraciones a las 24 horas	61
Gráfico Estadístico 2: Comparación de medias del extracto hidroalcohólico de arándano azul en diferentes concentraciones a las 48 horas	63
Gráfico Estadístico 3: Comparación de medias del extracto hidroalcohólico de arándano azul en diferentes concentraciones a las 72 horas.	65
Gráfico Estadístico 4: Sensibilidad a las 24 horas.....	81
Gráfico Estadístico 5: Sensibilidad a las 48 horas.....	82
Gráfico Estadístico 6: Sensibilidad a las 72 horas.....	84
Gráfico Interpretativo 1: Prueba <i>t student</i> del extracto hidroalcohólico de arándano azul al 25 %.....	75
Gráfico Interpretativo 2: Prueba <i>t student</i> del extracto hidroalcohólico de arándano azul al 50 %.....	76
Gráfico Interpretativo 3: Prueba <i>t student</i> del extracto hidroalcohólico de arándano azul al 75 %.....	77
Gráfico Interpretativo 4: Prueba <i>t student</i> del extracto hidroalcohólico de arándano azul al 100 %.....	78
Gráfico Interpretativo 5: Prueba <i>t student</i> de clorhexidina al 0,12%	79
Gráfico Interpretativo 6: Prueba <i>t student</i> del agua destilada.....	80

1. Introducción

La enfermedad periodontal envuelve acciones intrínsecas del biofilm junto con la respuesta inmunológica inflamatoria del hospedador (Offenbacher, y otros, 2007). Ha sido descrita como una enfermedad multifactorial es decir que el agente causante de la misma puede ser más de uno, dentro de los más importantes de ellos tenemos la presencia de bacterias peridontopatógenas en la cavidad oral, las cuales han sido divididas en varios grupos de acuerdo a su grado de virulencia o patogenicidad en base a diferentes colores de cada grupo los cuales son: rojo, naranja, amarillo, azul, violeta y verde (Socransky, Haffajee, Cugini, Smith , & Kent, 1998).El *Fusobacterium nucleatum* se encuentra dentro del grupo naranja; el cual es el segundo grupo más agresivo de los seis grupos que existen, el cual es solo superado por el grupo rojo que son las bacterias que tienen mayor virulencia.

El *Fusobacterium nucleatum* cumple un papel importante dentro del biofilm ya que ayuda en la coagregación bacteriana entre grampositivos y gramnegativos ya que el *Fusobacterium nucleatum* es un colonizador intermedio que fomenta cambios físico-químicos internamente en el surco gingival lo cual ayuda a la futura colonización y proliferación de los periodonto patógenos tardíos.

Existe un tratamiento para la enfermedad periodontal por medio del uso de colutorios con presencia de clorhexidina al 0,12% ya que posee muy buenas propiedades antimicrobianas. En varios estudios sobre el arándano azul (*Vaccinium corymbosum*) se ha demostrado que sus componentes como el polifenol que tiene un efecto antimicrobiano y también pueden inhibir la adhesión de bacterias a la mucosa oral (Ben Lagha, Dudonné, Desjardins, & Greiner, 2015), y los flavonoides quienes tienen capacidad antiinflamatoria y antioxidante principalmente, pueden ser beneficiosos para la salud periodontal motivo por el que su demanda se ha visto en aumento en los últimos años (Basu, Rhone, & Lyons, 2010).

El propósito del presente estudio in vitro es medir los halos inhibitorios del extracto hidroalcohólico de arándano azul a diferentes concentraciones, además de una comparación con la capacidad inhibitoria de la clorhexidina con una concentración única de 0.12 %, frente a la bacteria *Fusobacterium nucleatum*, lo cual serviría para establecer parámetros preventivos y/o terapéuticos del producto.

2. Planteamiento del problema

Las enfermedades del periodonto son muy comunes en nuestro medio, siendo la periodontitis es la que más prevalece y está principalmente asociada a una higiene deficiente que produce formación y acumulación de biofilm. Otros factores de riesgo como el trauma oclusal y la ortodoncia también se asocian frecuentemente tanto a la Periodontitis como a la Gingivitis (Martínez Martínez, Llerena, & Peñaherrera-Manosalva, 2017).

Está establecido que los niños presentan una alta frecuencia de gingivitis que aumenta con la edad, y la población en general presenta un alto componente inflamatorio en las encías. En los adolescentes ya existe evidencia de destrucción de tejidos periodontales, medida mediante la pérdida del nivel de inserción clínico, y esta destrucción aumenta de forma considerable en la población adulta y adulta mayor, siendo responsable en gran medida de la pérdida de dientes. Sus principales indicadores de riesgo son la edad, el género, el nivel de escolaridad, el nivel socioeconómico, el acceso a la salud y el tabaquismo. (Carvajal, 2016)

El *Fusobacterium nucleatum* ha sido asociado con varias formas de enfermedad periodontal y es una de las principales especies bacterianas envuelta en interacciones físicas entre Gram + comensales o colonizadores primarios y con Gram - periodontopatógenos o colonizadores tardíos. Adicionalmente, el *Fusobacterium nucleatum* puede causar una variedad de enfermedades infecciosas extra orales, incluyendo endocarditis bacteriana, enfermedad intestinal inflamatoria y abscesos cerebrales (Ben Lagha, Dudonné, Desjardins, & Greiner, 2015).

El tratamiento mecánico, no quirúrgico de la inflamación gingival y periodontal se da a través de la remoción mecánica de irritantes de las superficies gingivales, técnica que se repite hasta que los tejidos blandos adyacentes recuperen un estado saludable (Suvan , 2005). El procedimiento incluye control de placa, raspado y alisado radicular y es uno de los más utilizados para el tratamiento de las enfermedades periodontales (Cugini, Haffajee, Smith , Kent Jr, & Socransky, 2000).

El uso de un colutorio que tenga como agente antimicrobiano al extracto de arándano azul se puede utilizar como coadyuvante al tratamiento y control de la enfermedad periodontal gracias a su composición de polifenoles.

Cabe mencionar que también una ventaja del arándano azul es su bajo costo y su fácil adquisición. Por lo tanto, ¿es el extracto hidroalcohólico de arándano azul a concentraciones del 25, 50, 75 y 100% efectivo en cuanto a inhibición de la bacteria *Fusobacterium nucleatum*?

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Determinar el efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico de arándano azul, en concentraciones del 25 %, 50 %, 75 % y 100 % frente a la cepa *Fusobacterium nucleatum*, en un tiempo de 24, 48 y 72 horas.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar qué concentración del extracto hidroalcohólico de arándano azul tiene mayor eficacia frente a la cepa *Fusobacterium nucleatum*.
- Comparar el efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico de arándano azul en todas sus concentraciones con la clorhexidina.
- Medir el diámetro del halo inhibitorio del extracto hidroalcohólico de arándano azul en concentraciones del 25 %, 50 %, 75 % y 100 %, frente a la cepa *Fusobacterium nucleatum*, en un rango de tiempo de 24, 48 y 72 horas.

4. Justificación

En el mundo a lo largo de la historia y desde tiempos ancestrales de la humanidad se han venido usando elementos que nos brinda la naturaleza ya sean plantas frutos o ciertos tipos de alimentos con propósitos medicinales ya sean terapéuticos, preventivos o paliativos ya que está demostrado que muchos de ellos tienen efectos beneficiosos para la salud y tienen propiedades curativas dependiendo del tipo de enfermedad, por esta razón es que se han podido sintetizar medicamentos a partir de productos que nos ofrece la naturaleza.

Desde el punto de vista de salud en Ecuador actualmente existe una cultura que sigue utilizando plantas, frutos o alimentos con fines terapéuticos para cierto tipo de enfermedades ya que es un país con una cultura ancestral indígena y existe una gran cantidad de elementos naturales gracias a su rico ecosistema y posición geográfica.

Alimentos o frutos como los arándanos gracias a estudios recientes se ha demostrado que poseen polifenoles los cuales nos dan muchos efectos beneficiosos para la salud (Basu, Rhone, & Lyons, 2010), en este caso se ha demostrado que poseen efecto inhibitorio frente al *Fusobacterium nucleatum* uno de los principales periodontopatógenos y uno de los más agresivos (Ben Lagha, Dudonné, Desjardins, & Greiner, 2015).

Existen varios estudios que nos indican la presencia de polifenoles en el arándano azul y otras especies de arándanos (Basu, Rhone, & Lyons, 2010), pero aún no se ha logrado establecer una diferencia entre el efecto inhibitorio de este a diferentes concentraciones ante el *Fusobacterium nucleatum* en comparación al efecto inhibitorio del gluconato de clorhexidina al 0,12% que como ya establecido tiene un efecto inhibitorio importante frente a periodontopatógenos y una alta sustantividad lo cual hace su uso muy común en la prevención y el tratamiento de las enfermedades periodontales.

Desde el punto de vista económico en el Ecuador existe gran cantidad de población rural y campesina, también de bajos recursos económicos en la cual se puede observar una mayor prevalencia de las enfermedades periodontales, por lo cual la importancia y relevancia de este estudio recae en la comparación y establecimiento del efecto inhibitorio de un fruto natural y abundante en el país el cual es el arándano azul, por medio de su extracto hidroalcohólico a diferentes concentraciones, el cual ayudaría a mejorar la prevención y

tratamiento de la enfermedad periodontal ya que es de origen natural, de alta disponibilidad y buena accesibilidad económica.

5. Hipótesis

El extracto hidroalcohólico de arándano azul (*Vaccinium corymbosum*) al 25 %, 50 %, 75 % y 100 % en un tiempo de 24, 48 y 72 horas, presenta un efecto inhibitorio frente a la cepa *Fusobacterium nucleatum*.

5.1. Hipótesis nula

El extracto hidroalcohólico de arándano azul (*Vaccinium corymbosum*) en al 25 %, 50 %, 75 % y 100 %, en un tiempo de 24, 48 y 72 horas, no presenta inhibición alguna frente a la cepa *Fusobacterium nucleatum*.

Marco teórico

CAPÍTULO I

1. Periodonto

El periodonto normal provee el soporte necesario para mantener el funcionamiento de las estructuras dentales. Consiste en 4 componentes principales: encía, ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar los mismos que son parte del periodonto de protección y del periodonto de inserción. Cada uno de estos componentes periodontales son diferentes en su localización, arquitectura de tejidos, composición bioquímica y composición química, sin embargo estos componentes funcionan juntos como una sola unidad (Newman & Carranza, 2019).

1.1 Periodonto de inserción

1.1.1 Ligamento periodontal

El ligamento periodontal está compuesto por un complejo vascular y tejido conectivo celular que rodea la raíz del diente y la conecta con la pared interna del hueso alveolar su espesor aproximadamente es de 0.2mm aunque existen variaciones por lo general debidas a que el diente ha sido expuesto a una hiperfunción. Las funciones del ligamento periodontal son físicas, formativas y de remodelación, nutricionales y sensitivas. (Newman & Carranza, 2019)

1.1.2 Cemento radicular

El cemento es el tejido conjuntivo calcificado que cubre la dentina de la raíz y en el que se insertan los haces de fibras del ligamento periodontal. Puede considerarse como un hueso de anclaje y es el único tejido dental específico del periodonto. Es de color amarillo pálido y más blando que la dentina, El grosor del cemento es muy variable y el

tercio coronal puede medir sólo 16-60 um. En cambio, el tercio apical puede tener un grosor de 200 um o incluso mayor (Eley, Soory, & Manson, 2011).

1.1.3 Hueso alveolar

Es la porción del maxilar y la mandíbula que forma y sostiene a los alveolos dentarios, este se forma cuando el diente erupciona con el fin de proveer inserción ósea para el ligamento periodontal, el hueso alveolar desaparece de manera gradual una vez que se pierde la pieza dentaria. (Newman & Carranza, 2019)

1.2 Periodonto de protección

1.2.1 Encía

La encía normal cubre el hueso alveolar y la raíz dental hasta un nivel coronal desde la unión cemento-esmalte. La encía está dividida anatómicamente en encía marginal, encía adherida y encía interdental. Cada tipo de encía posee una variación considerable en cuanto a diferenciación, histología y espesor de acuerdo a sus demandas funcionales. En otras palabras, la estructura específica en los diferentes tipos de encía refleja la efectividad de cada uno como una barrera frente a la penetración de microorganismos y agentes nocivos hacia sus zonas más profundas (Eley, Soory, & Manson, 2011).

1.2.1.1 Encía marginal

Es el borde de la encía que rodea el diente en forma de collar, mide aproximadamente 1mm, puede estar separada de la superficie dental, su parte más apical se llama cenit gingival (Eley, Soory, & Manson, 2011).

1.2.1.2 Encía insertada

Es la continuación de la encía marginal, es firme, resilente y estrechamente adherida al periostio del hueso alveolar. La superficie de la encía insertada es punteada, como piel de naranja. La encía insertada puede medir entre 0 y 9 mm de

anchura. Suele ser más ancha en la región de los incisivos (3-5 mm) y más estrecha en los caninos y premolares inferiores (Eley, Soory, & Manson, 2011).

1.2.1.3 Encía interdental

La encía entre los dientes es cóncava y se ha descrito como un nicho o col que une las papilas vestibulares y linguales. Donde contactan los dientes, el col adopta la forma de los dientes en su parte apical al área de contacto. Cuando dos dientes adyacentes no están en contacto, no hay col y la encía interdental es plana o convexa.

La región interdental tiene una importancia especial porque es el lugar de mayor depósito de bacterias y su estructura la hace especialmente vulnerable. *Es* el lugar de inicio de la gingivitis (Eley, Soory, & Manson, 2011).

2. Enfermedad periodontal

Las enfermedades periodontales se encuentran localizadas en la encía y las estructuras de soporte del diente que son: ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar, estas enfermedades son producidas por algunas bacterias que provienen de la placa subgingival. Dentro de estas bacterias tenemos las que son anaerobias y gramnegativas como las más importantes y que más prevalecen en el área subgingival (Bascones Martínez, Mudarra Morante, & Perea Pérez, 2002).

2.1 Clasificación de enfermedades periodontales

La Academia Americana de Periodoncia (AAP) y la Federación Europea de Periodoncia (EFP) han elaborado un nuevo sistema de clasificación de las patologías y alteraciones periodontales y periimplantarias, que es el siguiente:

Salud periodontal y enfermedades/condiciones de trastornos gingivales

- Salud periodontal
- Gingivitis inducida por placa bacteriana
- Alteraciones gingivales no inducidas por placa bacteriana

Periodontitis

- Enfermedades periodontales necrosantes.
- Periodontitis como manifestación directa de enfermedades sistémicas.
- Periodontitis, que debe ser caracterizada mediante estadios y grados.

Otras causas de enfermedad periodontal

- Abscesos periodontales (AP)
- Lesiones endodónticas-periodontales (LEP)
- Anomalías mucogingivales
- Trauma oclusal y fuerzas oclusales excesivas
- Factores que se relacionan con prótesis dentales y dientes

Patologías y condiciones periimplantarias

- Salud periimplantaria
- Mucositis periimplantaria
- Periimplantitis
- Deficiencias/morfología de tejidos duros y blandos

2.2 Determinantes de diagnóstico periodontal

Profundidad de sondaje

La profundidad del sondaje periodontal (PSP) es la distancia desde el margen gingival hasta la base de la bolsa periodontal y se suele medir en seis puntos alrededor del diente. (Eley, Soory, & Manson, 2011) Esta nos ayuda a determinar si existe o no la presencia de una bolsa periodontal.

El surco periodontal se define como el espacio alrededor de los dientes entre la encía marginal y la superficie del diente y que está limitado en su parte más apical por las células más coronales del epitelio de unión (Weinberg & Eskow, 2003). Se ha

considerado en estudios clínicos en humanos que este espacio puede medir entre 1 y 3 mm en ausencia de inflamación clínica (Greenstein, 2005).

La bolsa periodontal se define como la profundización patológica del surco periodontal, dada por la pérdida de inserción ósea y de inserción periodontal (Weinberg & Eskow, 2003), su profundidad va desde 4mm en adelante (Toto & Gargiulo, 1970).

Nivel de inserción clínica (NIC)

Esta medida hace referencia a las fibras de tejido conectivo gingivales que se insertan al cemento radicular a través de fibras de Sharpey (Botero & Bedoya, 2010). Es la distancia entre un punto reproducible fijo y la base de la bolsa, el punto fijo ideal es la unión amelo cementaria (Eley, Soory, & Manson, 2011).

Sangrado al sondaje (SS)

El sangrado al sondaje puede ser considerado un predictor de enfermedad periodontal, pero más que un predictor de enfermedad periodontal, puede ser considerado en conjunto con signos clínicos de inflamación, como un indicador de inflamación periodontal (Botero & Bedoya, 2010).

El sangrado es inducido por la penetración de la sonda periodontal, hay que tener en cuenta algunos aspectos del sondaje como son la fuerza y el grado de inflamación, ya que nos pueden hacer variar la interpretación (Lang, Nyman, Senn, & Joss, 1991).

Línea mucogingival (LMG)

La distancia desde el margen gingival hasta la línea mucogingival resulta útil para calcular la cantidad de encía queratinizada y encía insertada (Talari & Ainamo, 1976).

Se ha estimado que la cantidad de encía aumenta con la edad debido a el proceso de erupción pasiva (Ainamo & Talari, 1976).

Recesiones Gingivales

La recesión gingival (RG) es el desplazamiento del margen gingival apical a la unión del cemento y esmalte, con la exposición de la superficie radicular al ambiente oral (Chambrone, Sukekava, & Araujo, 2010). Es una condición frecuente tanto en

pacientes con buena y mala higiene oral, así como en pacientes con enfermedad periodontal incipiente o enfermedad avanzada (Castro & Grados , 2014).

Clasificación de las recesiones gingivales según Miller

Clase I: Migración del tejido que no llega hasta la unión mucogingival.

Clase II: Migración del tejido que llega a la línea mucogingival; no se observa destrucción de la zona interproximal.

Clase III: Migración del tejido que sobrepasa la unión mucogingival; se observa una leve pérdida del tejido interproximal.

Clase IV: Migración del tejido que sobrepasa la línea mucogingival y presenta una destrucción importante del tejido interproximal (Ardila Medina, 2009).

Movilidad dental

Esto generalmente se evalúa como la amplitud del desplazamiento de la corona resultante de la aplicación de una fuerza definida. La magnitud de este movimiento se ha utilizado para distinguir entre movilidad dental fisiológica y patológica, cuando hay movilidad de hasta 0.2 mm es considerado como movilidad fisiológica. En los dientes con tejido periodontal no inflamado, factores histológicos fundamentales determinan la movilidad del diente: la altura del soporte del tejido periodontal y el ancho del ligamento periodontal (Lang & Bartold, 2018).

La movilidad dental se mide de la siguiente forma empleando dos instrumentos metálicos y aplicando presión en sentido vestibulo-lingual (Salvi, Lindhe, & Lang, 2008).

Grado 0: movilidad fisiológica, 0.1-0.2 mm en dirección horizontal

Grado 1: movimiento hasta 1mm en sentido horizontal.

Grado2: movimiento más de 1 mm en sentido horizontal.

Grado 3: movimiento en sentido horizontal y en sentido vertical (Botero & Bedoya, 2010).

Lesiones de furca

El término defecto de furcación se refiere a la destrucción de los tejidos de soporte de dientes multirradiculares, de manera tal que esta destrucción permite el acceso clínico o incluso la visualización del área interradicular de manera parcial o total. La destrucción de los tejidos de soporte se produce principalmente por el avance de la enfermedad periodontal (Ikeda Artacho & Mori Arambulo, 2010).

Clasificación de lesiones de furca de Hamp

Grado I: Pérdida de soporte periodontal horizontal menor a 3 mm.

Grado II: Pérdida de soporte horizontal > a 3 mm pero sin traspasar.

Grado III: Pérdida horizontal de lado a lado (Arias Herrera, Carbajo, & Bascones Martínez, 2016).

Clasificación de lesiones de furca de Tarnow y Fletcher

Subclasificación basada en el grado de pérdida vertical:

Subclase A: 0-3 mm.

Subclase B: 4-6 mm.

Subclase C: >7 mm (Arias Herrera, Carbajo, & Bascones Martínez, 2016).

2.3 Gingivitis

Gingivitis inducida por placa bacteriana

La gingivitis inducida por biofilm de placa bacteriana a nivel de cada localización se define como una inflamación local inducida por el acúmulo de biofilm de placa dental bacteriana, contenido dentro del tejido gingival, que normalmente no se extiende hasta la inserción periodontal (Chapple I, Mealey, & van Dyke, 2018).

Alteraciones gingivales no inducidas por placa bacteriana

Las alteraciones gingivales no inducidas por placa son un grupo de diferentes trastornos no inducidos por el acúmulo de placa bacteriana en los márgenes gingivales que no son resueltos por completo tras la eliminación de la placa. Estas lesiones pueden estar localizadas en los tejidos gingivales o ser manifestaciones de ciertas enfermedades sistémicas (Holmstrup, Plemons, & Meyle, 2018). Aun así, hay que recordar que la gravedad de estos trastornos puede aumentar por el acúmulo de placa (Stone, Heasman, Staines, & McCracken, 2015).

2.4 Periodontitis

Enfermedades periodontales necrosantes

Las EPN presentan algunas características típicas (necrosis de las papilas, sangrado y dolor) y están asociadas a alteraciones de la respuesta inmunitaria del huésped (Herrera, Retamal-Valdes, Alonso, & Feres, 2018).

Se describen dos categorías claras según el nivel de compromiso inmunitario: pacientes comprometidos de forma crónica, grave (por ejemplo, pacientes con SIDA, niños con malnutrición grave, condiciones de vida extremas o infecciones graves), y pacientes inmunocomprometidos de forma temporal y/o moderada (por ejemplo, fumadores o pacientes adultos sometidos a estrés psicológico) (Herrera, Figuero , Shapira, Jin, & Sanz, 2018).

- **Gingivitis necrosante:** Es un proceso inflamatorio agudo que afecta a los tejidos gingivales. Los signos primarios son la presencia de necrosis/úlceras en las papilas interdentes, sangrado gingival y dolor. Otros signos y síntomas incluyen halitosis, pseudomembranas, linfadenopatías regionales, fiebre y sialorrea (en niños) (Herrera, Figuero , Shapira, Jin, & Sanz, 2018).
- **Periodontitis necrosante:** Es un proceso inflamatorio que afecta al periodonto. Los signos primarios son la presencia de necrosis/úlceras en las papilas interdentes, sangrado gingival, halitosis, dolor y pérdida ósea rápida. Otros signos y síntomas incluyen formación de pseudomembranas, linfadenopatías y fiebre (Herrera, Figuero , Shapira, Jin, & Sanz, 2018).

- **La estomatitis necrosante:** Es un trastorno inflamatorio grave del periodonto y la cavidad oral, con necrosis de los tejidos blandos más allá del tejido gingival y denudación ósea a través de la mucosa alveolar, con osteítis y secuestros óseos, en pacientes con compromisos sistémicos graves (Herrera, Figueroa, Shapira, Jin, & Sanz, 2018).

Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas

La clasificación de estas condiciones debe basarse en la enfermedad sistémica primaria de acuerdo a los códigos de la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas de Salud Relacionados (ICD) (Jepsen, Caton, & Albandar, 2018).

Periodontitis clasificada en grados y estadios

Estadio: se refiere a la severidad de la enfermedad. Los estadios de la periodontitis son inicialmente definidos por la pérdida clínica de la inserción, en ausencia de estos valores, se utiliza la pérdida ósea radiográfica (Sánchez Puetate, de Carvalho, & Spin, 2018).

- **Estadio I-Periodontitis Inicial:** 1-2 mm de pérdida de inserción interproximal en el peor sitio o pérdida ósea radiográfica en el tercio coronal (<15%) (Tonetti, Greenwell, & Kornman, 2018).
- **Estadio II-Periodontitis Moderada:** 3-4 mm de pérdida de inserción interproximal en el peor sitio o pérdida ósea radiográfica en el tercio coronal (15-33%) (Tonetti, Greenwell, & Kornman, 2018).
- **Estadio III-Periodontitis Severa con potencial para pérdida dental adicional:** 5 mm o más de pérdida de inserción interproximal en el peor sitio o pérdida ósea radiográfica que se extiende hasta el tercio medio o apical de la raíz dental (Papapanou, y otros, 2018).

- **Estadío IV-Periodontitis Severa con potencial para pérdida de la dentición:** 5 mm o más de pérdida de inserción interproximal en el peor sitio o pérdida ósea radiográfica que se extiende hasta el tercio medio o apical de la raíz dental además de disfunción masticatoria, trauma oclusal secundario (movilidad grado 2 y 3) defectos severos del reborde, problemas masticatorios y menos de 20 dientes remanentes (Tonetti, Greenwell, & Kornman, 2018) (Papapanou, y otros, 2018).

Extensión y distribución

- Localizada.
- Generalizada.
- Distribución molar-incisivo.

Localizada menos del 30% de dientes, generalizada más del 30% de los dientes presentes (Escudero Castaño , Perea García , & Bascones Marínez, 2008).

Grados: Evidencia o riesgo de progresión rápida, respuesta anticipada al tratamiento.

Riesgo de progresión: evidencia directa mediante radiografías periapicales o pérdida de NIC, o indirecta (proporción pérdida ósea/edad). Respuesta anticipada al tratamiento: fenotipo, tabaquismo, diabetes (Tonetti, Greenwell, & Kornman, 2018).

- **Grado A-Tasa lenta de progresión:** Evidencia directa de que no hay progresión de la pérdida de inserción durante 5 años o pérdida indirecta del factor de pérdida ósea/edad de hasta 0,25 mm (Tonetti, Greenwell, & Kornman, 2018).
- **Grado B-Tasa moderada de progresión:** Evidencia directa de progresión con menos de 2 mm durante 5 años o pérdida indirecta del factor de pérdida ósea/edad de hasta 0,25 - 1 mm (Tonetti, Greenwell, & Kornman, 2018).
- **Grado C-Tasa rápida de progresión:** Evidencia directa de progresión igual o superior a 2 mm durante 5 años o pérdida indirecta del factor de pérdida ósea/edad superior a 1 mm (Tonetti, Greenwell, & Kornman, 2018) (Papapanou, y otros, 2018).

Etiología de la enfermedad periodontal

La principal causa de la enfermedad periodontal es la infección bacteriana. Sin embargo, pequeñas cantidades de placa son compatibles con la salud gingival y periodontal y algunos pacientes pueden convivir con grandes cantidades de placa durante largos períodos sin desarrollar periodontitis, aunque presenten gingivitis (Lang, Cumming, & Löe, 1973).

Otros factores locales y sistémicos predisponen a la acumulación de placa o alteran la respuesta gingival a la misma. Se consideran factores etiológicos secundarios (Eley, Soory, & Manson, 2011).

Factores locales

- Restauraciones defectuosas.
- Lesiones de caries.
- Impactación de comida.
- Prótesis parciales mal diseñadas.
- Aparatología ortodóntica.
- Dientes mal alineados.
- Falta de sellado labial o respiración oral.
- Surcos congénitos en esmalte cervical o superficie de la raíz.
- Tabaco, que puede tener efectos locales y sistémicos (Eley, Soory, & Manson, 2011).

Factores sistémicos

- Neoplasias (por ejemplo, carcinoma oral epidermoide)
- Diabetes mellitus
- Obesidad
- Tabaquismo (dependencia nicotínica)
- Trastornos genéticos:

Enfermedades asociadas a trastornos inmunológicos

Enfermedades que afectan a la mucosa oral y el tejido gingival

Enfermedades que afectan a los tejidos conjuntivos

Trastornos metabólicos y endocrinológicos

- Enfermedades con inmunodeficiencia adquirida
- Enfermedades inflamatorias (Albandar, Susin, & Hughes, 2018).

CAPÍTULO II

3. Biofilm

Los biofilms se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo (Costerton, Lewandowski, Caldwell, Korber, & Lappin-Scott, 1995).

El biofilm se considera, además, un conjunto de biomasa con microcirculación, que permite a las diferentes comunidades bióticas complementarse nutricionalmente. Es una unidad sellada, englobada en polisacáridos extracelulares, que le confiere resistencia ante las defensas del huésped y los antibióticos. (Loera Muro, Ramírez Castillo, Avelar González, & Guerrero Barrera, 2012)

El biofilm se diferencia de la placa bacteriana ya que este es más complejo a nivel de organización y resistencia al ser considerado como un conjunto de biomasa con microcirculación, que permite a las diferentes comunidades bióticas complementarse nutricionalmente. Es una unidad sellada, englobada en polisacáridos extracelulares, que le confiere resistencia ante las defensas del huésped y los antibióticos (Loera Muro, Ramírez Castillo, Avelar González, & Guerrero Barrera, 2012).

3.1 Formación del biofilm

La formación del biofilm se puede dividir en tres fases:

Formación de la película dental (película adquirida):

Esta es la etapa inicial en el desarrollo del biofilm. En todas las zonas de la cavidad oral existe una recubierta de glucoproteínas la cual está formada por componentes de

la saliva, líquido crevicular, desechos y productos celulares del huésped y bacterianos; las fuerzas electroestáticas, fuerzas de Van der Waals y propiedades hidrófobas influyen en la formación del biofilm.

Las películas operan como barreras de protección, lubrican las superficies e impiden la desecación del tejido. Sin embargo, también aportan un sustrato al cual se fijan las bacterias (Chinea Meneses, de la Rosa Samper, & Morales Aguiar, 2006)

Colonización inicial o colonización primaria

Cuando ya está formada la película tras unas horas se adhieren los primeros colonizadores bacterianos de la biopelícula los cuales son *Actinomyces viscosus* y *Streptococcus sanguis*, mediante moléculas específicas que se denominan adhesinas encontradas en la superficie bacteriana. En esta etapa gracias al consumo de oxígeno de estas bacterias el ambiente que inicialmente fue aerobio se convierte en uno escaso de oxígeno lo cual favorece a la proliferación de bacterias anaerobias gramnegativas (Lang, Mombelli, & Attström, 2008).

Colonización secundaria y maduración

Los microorganismos iniciales modifican el ambiente, de tal manera que estos pueden ser sustituidos por otros que se adapten mejor al ambiente que ya está modificado.

Los colonizadores secundarios son los microorganismos que no colonizaron en un principio superficies dentales limpias, entre ellos *Prevotella intermedia*, *Prevotella loescheii*, especies de *Capnocytophaga*, *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis*. Dichos patógenos se adhieren a las células de bacterias ya presentes en la masa de la biopelícula (Lang, Mombelli, & Attström, 2008)

3.2 Manejo del biofilm

3.2.1 Control mecánico del biofilm

Siendo la cavidad oral de fácil acceso, se pueden eliminar los biofilms por medios mecánicos, bien a nivel supragingival por medio del cepillado y profilaxis dental, bien a nivel subgingival por medio de raspado y alisado radicular, o cirugía periodontal (Marsh, 1997).

3.2.2 Control químico del biofilm

Puesto que las enfermedades periodontales están producidas por bacterias, es adecuado sugerir la utilización de quimioterápicos, con el fin de eliminar la microbiota oral, inhibir la colonización bacteriana en la superficie de los dientes, eliminar la placa establecida e impedir la mineralización de la placa. El control químico puede ser llevado a cabo por una serie de antimicrobianos, entre los que destacamos la clorhexidina. Igualmente los compuestos fenólicos también se han demostrado eficaces como agentes preventivos (Serrano Cuenca & Noguero Rodríguez, 2004).

3.2.3 Características ideales de los agentes químicos para el control de placa.

- Especificidad
- Eficacia
- Sustantividad alta
- Seguridad (toxicidad)

3.2.4 Clorhexidina

El digluconato de clorhexidina es un antimicrobiano sintético que se ha utilizado ampliamente como antiséptico de amplio espectro, la clorhexidina es efectiva frente a bacterias grampositivas y gramnegativas, levaduras y hongos aerobios y anaerobios facultativos (Eley, Soory, & Manson, 2011).

3.2.5 Mecanismo de acción de la clorhexidina

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. (Bascones & Morante, 2006)

3.2.6 Uso de clorhexidina en odontología

Su utilización es amplia y es el agente más efectivo para tratamientos periodontales. La reducción de placa y de gingivitis alcanza el 60% (Bascones & Morante, 2006).

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 (Bascones Martínez, Mudarra Morante, & Perea Pérez, 2002).

3.2.7 Efectos secundarios de la clorhexidina

Aunque la clorhexidina no es tóxica, tiene un sabor desagradable, altera la sensación del gusto y produce una tinción de color marrón en los dientes que resulta difícil de eliminar. Es probable que un grupo catiónico fije la clorhexidina al diente o superficie mucosa, mientras que el otro grupo catiónico produce el efecto bactericida de dañar la pared celular bacteriana. Sin embargo, este grupo catiónico puede fijar también productos de la dieta, como derivados del ácido gálico (polifenoles) que se encuentran en los alimentos y en muchas bebidas como el té y el café y los taninos de los vinos, a la molécula y, por ende, a la superficie dental. La clorhexidina favorece también la formación de cálculo supragingival y las zonas calcificadas y teñidas resultantes se adhieren con fuerza a la superficie del diente (o restauración) y son difíciles de eliminar (Eley, Soory, & Manson, 2011).

4. Microorganismos en la cavidad oral

Actualmente se sabe que la cavidad bucal está habitada por más de 700 especies bacterianas. Ellas están diferencialmente distribuidas sobre las diferentes superficies y si bien se establecen en zonas de tejido mucosal, los más estudiados son los que se forman sobre el diente (Paster, y otros, 2001).

Algunas de estas bacterias han sido implicadas en enfermedades bucales como la caries y la periodontitis, que están entre las infecciones bacterianas más comunes en los seres humanos (Takahashi, 2015).

4.1 Microorganismos Periodontopatógenos

Existen aproximadamente un poco más de 300 especies que se encuentran en los sacos periodontales, pero solo un pequeño porcentaje de estas bacterias es considerado como patógenos periodontales.

Dentro de estas bacterias el grupo de bacilos anaerobios gramnegativos son mayormente relacionados en la etiología de la enfermedad periodontal comprende los Géneros *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Bacteroides* y *Fusobacterium* (Guilarte & Perrone, 2005)

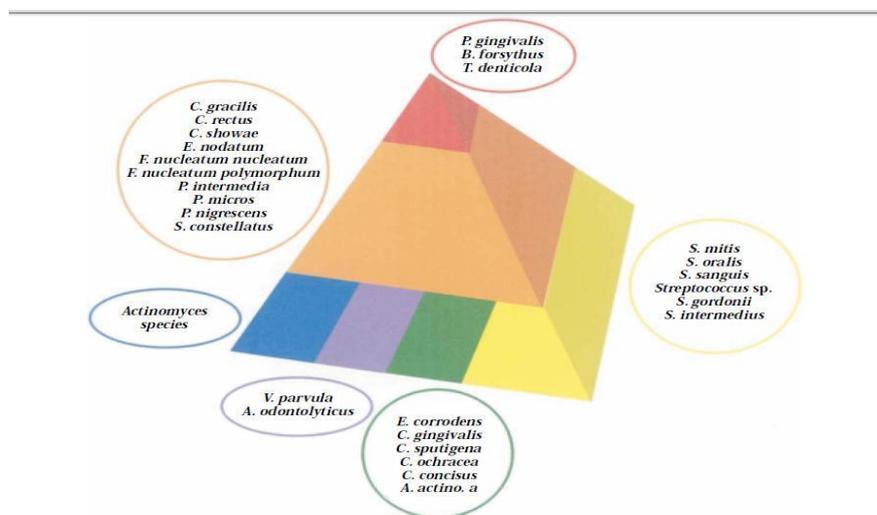


Figura 1: Pirámide de Socransky

Fuente: (Socransky, Haffajee, Cugini, Smith , & Kent, 1998)

4.2 *Fusobacterium nucleatum*

Fusobacterium nucleatum es un residente común de la microbiota orofaríngea en humanos, y es un agudo patógeno en las enfermedades periodontales. De los anaerobios orales, es también el que más probabilidades tiene de causar infecciones extraorales. Sus infecciones metastásicas pueden implicar al cerebro, hígado, articulaciones, y las válvulas del corazón (Afra, Laupland, Leal, Lloyd, & Gregson, 2013).

Fusobacterium nucleatum es una bacteria anaerobia Gram-negativa no formadora de esporas. Las células de *Fusobacterium nucleatum* son bacilos fusiformes o con forma de huso de longitud variable. Todas las cepas obtienen energía de la fermentación de azúcares o aminoácidos, y producen ácido butírico como un importante subproducto metabólico. Una de sus principales funciones dentro del biofilm es que ayuda a la coagregación de grampositivos y gramnegativos tardíos, haciendo el ambiente más adecuado para estos ya que es un colonizador intermedio (Guilarte & Perrone, 2005).

El *Fusobacterium nucleatum* se encuentra en la placa dental de los primates, incluido el hombre. Se ha postulado que este microorganismo desempeña un papel central en la formación de placa dental, en función de su capacidad para adherirse a una amplia gama de microorganismos de placa Gram-positivos y Gram-negativos. El *Fusobacterium nucleatum* se asocia con frecuencia a periodontitis, así como a infecciones humanas invasivas de cabeza y cuello, tórax, pulmón, hígado y abdomen. Las propiedades del *Fusobacterium nucleatum* que pueden estar relacionadas con la virulencia incluyen su adherencia e invasión a las células del huésped y la modulación de la respuesta inmune del huésped (Guilarte & Perrone, 2005).

El *Fusobacterium nucleatum* tiene la capacidad de adherirse a las células epiteliales e invadir al endotelio. El cual es muy probable que con este mismo mecanismo invada a otros tejidos (Han, y otros, 2010). La interacción entre las bacterias y el epitelio que rodea a los dientes son factores críticos en las infecciones bacterianas (Finlay & Cossart, 1997) (Meyer, Mintz, & Fives-Taylor, 1997)

La capacidad del *Fusobacterium nucleatum* para adherirse a las células epiteliales es un factor importante para su colonización. La capacidad de invasión de algunas bacterias

permiten a los patógenos no solamente evadir el sistema inmune sino invadir e infiltrarse en tejidos más profundos (Zerón y Gutiérrez de Velasco & Porras Lira, 2016).

El *Fusobacterium nucleatum* ha demostrado ser altamente invasivo y su actividad es comparable con la del *P. gingivalis*. Y la estimulación que provoca en la producción de IL-8 es 10 veces más duradera que la producida por la *E. coli* (Han, y otros, 2000).

Estudios clínicos demuestran que el *Fusobacterium nucleatum* es altamente prevalente durante las etapas tempranas de la inflamación asociada a la gingivitis y mucho más en la periodontitis (Moore & Moore, 1994).

4.2.1 Taxonomía

Fusobacterium nucleatum es la especie tipo del género *Fusobacterium*, que pertenece a la familia *Bacteroidaceae*. La especie *Fusobacterium nucleatum* se considera bastante heterogénea (Bolstad, Jensen, & Bakken, 1996).

La especie *Fusobacterium* se divide principalmente en tres subespecies:

- *nucleatum*
- *polymorphum*
- *vincentii* (Dzink, Sheenan, & Socransky, 1990).

4.2.2 Estructura y morfología

El nombre *Fusobacterium* tiene su origen en *fusos*, un huso; y *bacterion*, una pequeña varilla: por lo tanto, una pequeña varilla en forma de huso. El término *nucleatum* se origina en la apariencia nucleada que se ve con frecuencia en el microscopio electrónico debido a la presencia de gránulos intracelulares. La mayoría de las células son de 5 a 10 μm de largo y tienen extremos puntiagudos (Bolstad, Jensen, & Bakken, 1996).

4.2.3 Factores de virulencia

Su poder patógeno está asociado a la presencia de fimbrias, lipopolisacáridos, a la producción de factores solubles inhibidores de la quimiotaxis de los polimorfonucleares

y a la elaboración de metabolitos que se comportan como compuestos tóxicos tisulares (Guilarte & Perrone, 2005).

Fimbrias: La adherencia bacteriana a las superficies requiere de diferentes proteínas que se localizan en la cubierta de las bacterias, desde donde actúan como ganchos pegadizos. Las proteínas bacterianas con propiedades adherentes generalmente se encuentran en múltiples copias formando estructuras largas y filamentosas que se extienden hasta por varios micrómetros por fuera de la célula y a estos se los conocen como fimbrias las cuales también permiten la adherencia entre bacterias aledañas, aglutinándolas unas con otras formando comunidades microbianas complejas a las que se denomina biofilm (González Montalvo & González González, 2019).

Lipopolisacáridos o endotoxinas: Son los componentes mayoritarios de la membrana externa de las bacterias Gram negativos; están compuestos por una parte lipídica y cadenas características de oligosacáridos y polisacáridos. Son estimulantes del sistema inmune, con un potente efecto tóxico y entre otras funciones cumplen un papel principal en la adhesión de las bacterias a las células epiteliales (Romero Hurtado & Iregui, 2010).

5. Medicina natural y tradicional

La medicina natural y tradicional (MNT) tiene una historia tan extensa como la de la sociedad humana. El uso de plantas y sustancias naturales data de milenios (Rojas Ochoa, 2013).

Existen diferentes técnicas y procedimientos en la utilización de las técnicas de medicina natural y tradicional entre ellas encontramos: la homeopatía, la fitoterapia, la acupuntura, la apiterapia, etc. Estos métodos han ocupado cada día más un lugar importante en el arsenal terapéutico del paciente en la estomatología (Rodríguez Suárez & González Ramos, 2013).

5.1 Fitoterapia

La fitoterapia es un neologismo empleado por Henri Leclerc, médico francés (1870-1955), en los comienzos de siglo, desde entonces la palabra fitoterapia es utilizada para designar la utilización de las plantas medicinales con fines terapéuticos (Avello L & Cisternas F, 2010).

Dentro de los reinos de la naturaleza que contribuyen hasta hoy en disminuir síntomas y prevenir enfermedades, destaca el reino vegetal. Las plantas, gracias a su maravilloso y complejo metabolismo, constituyen un verdadero arsenal químico, del cual sólo se conoce con éxito un tercio, considerando la variedad de especies existentes a nivel mundial y aquellas inexploradas hasta hoy, sin considerar aquellas especies ya extintas (Avello L & Cisternas F, 2010).

5.2 Arándano azul

Es el tipo de arándano más conocido en el mundo y en la actualidad representa el 54% de la superficie cultivada de arándanos a nivel global, se considera una buena fuente importante de compuestos fenólicos, muy son reconocidos por su alto poder antioxidante (Prior, y otros, 1998).

Las bondades del arándano en la salud hacen que éste sea considerado como la súper fruta del siglo XXI, ya que se utiliza para combatir la diabetes, como antibiótico, antiinflamatorio, antidiarreico, para problemas de visión y en la prevención de ciertos tipos de cáncer (Basu, Rhone, & Lyons, 2010)

Los arándanos azules contienen cantidades significativas de flavonoides a los que se han asociado varios efectos beneficiosos para la salud humana. Los ácidos fenólicos, los flavonoides y las procianidinas están presentes en el extracto de arándano azul. El extracto de arándano tiene actividad antibacteriana contra la bacteria periodontopatógena *Fusobacterium nucleatum*. Esta propiedad puede ser el resultado de la capacidad de los polifenoles de arándanos para quelar el hierro (Ben Lagha, Dudonné, Desjardins, & Greiner, 2015).

Muchos estudios in vitro han examinado los efectos de los polifenoles de la dieta sobre los marcadores inflamatorios y la patogenicidad de las bacterias asociadas con la periodontitis. Estudios clínicos en humanos han demostrado que los polifenoles tienen importantes propiedades antimicrobianas, antioxidantes y antiinflamatorias que dan como resultado marcadores clínicos mejorados en la periodontitis (Basu, Masek, & Ebersole, 2018).

Según un estudio realizado por Ben Lagha, Dudonné, Desjardins y Greiner en el 2015, el efecto del extracto de arándano azul en la formación de biofilm por *Fusobacterium nucleatum* se visualizó mediante microscopía electrónica de barrido. Las micrografías electrónicas mostraron claramente que hubo una marcada reducción en la biopelícula madura y que la arquitectura se vio interrumpida cuando se cultivó *Fusobacterium nucleatum* en presencia del extracto de arándano azul, también se observó inhibición de la actividad del quorum sensing. (Ben Lagha, Dudonné, Desjardins, & Greiner, 2015).

5.2.1 Taxonomía arándano azul

Reino: Plantae

División: Magnoliophytas

Subdivisión: Angiosperma

Clase: Dicotiledónea

Subclase: Dilleniidae

Orden: Ericales

Familia: Ericaceae

Subfamilia: Vaccinioideae

Tribu: Vaccinieae

Sección: Cyanococcus

Género: Vaccinium

Especie: *Vaccinium corymbosum* L (Cronquist, 1981).

5.2.2 Botánica arándano azul

El arándano es un arbusto perenne, de ramificación basitónica, de madera leñosa, que llega alcanzar en su madurez tres metros de altura. Posee hojas alternas, de margen entero o aserrado, que varían de 1 a 8 cm de largo, son de forma lanceolada u ovalada y de color verde pálido (Buzeta P, 1997).

Las flores son pedunculadas, axilares o terminales y se abren solitarias o en racimo; son de color blanco. La corola es esférica de color verde y sobresale el estigma. El ovario está unido al cáliz; contiene entre cinco y cuatro celdas con uno o más óvulos en cada lóculo. La flor tiene de diez a ocho estambres que están insertados en la base de la corola (Buzeta P, 1997).

Según Muñoz C. en el año 1988 "el fruto es una baya esférica que va de 1.5 cm a 0.7 cm de diámetro. Su color depende de la variedad y tiene secreciones cerosas, así mismo se presenta en diferentes colores como azules, negros y morados. Algunos frutos contienen hasta 100 semillas al interior del endocarpio. Comercialmente el fruto tiene una cicatriz estilar que se busca sea pequeña y seca."

Tiene un sistema radicular reducido, fibroso y superficial. No cuenta con pelos radiculares, por lo tanto, las raíces jóvenes son las encargadas de la absorción (Buzeta P, 1997).

5.2.3 Valores nutricionales del arándano azul

Tabla 1: Valores nutricionales del arándano azul

Arándano azul	Valor	Unidad
Valores nutricionales por 100grs		
Energía	33	kcal
Grasas (lípidos)	0,6	g
Proteínas	0,625	g
Agua	87,8	g
Grasas e hidratos de carbono por 100grs		
Fibra	4,9	g
Carbohidratos	6,05	g
Ácidos grasos, monoinsaturados	0	g
Ácidos grasos, poliinsaturados	0	g
Colesterol	0	mg
Vitaminas por 100grs		
Vitamina A	5,7	ug

Vitamina D	0	ug
Vitamina E	1921	mg
Folato	10	ug
Niacina	0,09	mg
Riboflavina	0,02	mg
Tiamina	0,02	mg
Vitamina B-12	0	ug
Vitamina B-6, Total	0,06	mg
Vitamina C (ácido ascórbico)	22	mg
Minerales por 100grs		
Calcio	10	mg
Hierro	0,74	mg
Potasio	78	mg
Magnesio	2,4	mg
Sodio	1	mg
Fosforo	13	mg
Ioduro	1	ug
Selenio	0,1	ug
Zinc	0,131	mg

Fuente: BEDCA (Base de Datos Española de composición de Alimentos). Ministerio de Ciencia e Innovación. Farran A, Zamora R, Cervera P. Tabla de composición de alimentos del CESNID. 2004.

5.2.4 Compuestos fenólicos del arándano azul

Tabla 2: Compuestos fenólicos del arándano azul

Composición fenólica	Valor	Unidad
Antocianinas por cada 100 g		
Cianidina(galactósido)	2,50	mg
Cianidina(glucósido)	0,93	mg
Cianidina(arabinósido)	1,74	mg
Delfinidina(galactósido)	13,12	mg
Delfinidina(glucósido)	1,11	mg
Delfinidina(arabinósido)	8,70	mg
Malvidina(galactósido)	26,16	mg
Malvidina(glucósido)	1,60	mg

Malvidina(arabinósido)	16,57	mg
Petunidina(galactósido)	9,83	mg
Petunidina(glucósido)	1,10	mg
Petunidina(arabinósido)	5,95	mg
Peonidina(galactósido)	2,02	mg
Peonidina(glucósido)	0,99	mg
Ácidos fenólicos por cada 100 g		
Ácido clorogénico	24,19	mg
Ácido o-cumárico	5,54	mg
Ácido ferúlico	0,08	mg
Ácido gálico	1,00	mg
Flavonoles por cada 100 g		
Quercetina (galactósido)	1,08	mg
Quercetina (glucósido)	0,43	mg
Quercetina x	0,50	mg

Fuente: Garrido, V., 2014, USDA National Nutrient Database for Standard Reference.

CAPÍTULO III

Tipología de la investigación

Se ha utilizado diferentes tipos de investigación para realizar este estudio, los cuales son:

In vitro, ya que es una técnica que se utilizó para realizar el estudio en un ambiente controlado en un laboratorio fuera de un organismo vivo.

Experimental, ya que es un proceso que consiste en someter a un objeto o grupo de individuos, a determinadas condiciones, estímulos o tratamiento (variable independiente), para observar los efectos o reacciones que se producen (variable dependiente). Este tipo de investigación es netamente explicativa, por cuanto su propósito es demostrar que los cambios en la variable dependiente fueron causados por la variable independiente. Es decir, se pretende establecer con precisión una relación causa-efecto (Arias, 2012).

Exploratoria ya que es aquella que se efectúa sobre un tema u objeto desconocido o poco estudiado, por lo que sus resultados constituyen una visión aproximada de dicho objeto, es decir, un nivel superficial de conocimientos (Arias, 2012).

Comparativa porque nos ayuda a contrastar varios fenómenos que nos ayudan a obtener diferencias y similitudes entre los mismos. En este caso la diferencia de porcentajes de concentración del extracto hidroalcohólico de arándano azul en comparación con la clorhexidina a un único porcentaje.

Analítica, para concluir si la hipótesis previamente planteada es afirmativa o negativa. Entonces, se analiza la inhibición del extracto hidroalcohólico de arándano azul en concentraciones del 25 %, 50 %, 75 % y 100 % frente a la bacteria *Fusobacterium nucleatum*.

1. Población y muestra

1.1. Población

La bacteria *Fusobacterium nucleatum* ATCC® 25586™, importada por la empresa Medibac Inc. S.A., con su respectivo certificado y registro, toma el papel de la población en este trabajo investigativo.

1.2. Muestra

Las bacterias de *Fusobacterium nucleatum* ATCC® 25586™ sin contaminantes fueron tomadas como muestra para determinar la presencia o no presencia de inhibición del extracto hidroalcohólico de arándano azul a sus diferentes concentraciones y clorhexidina al 0,12%. La muestra utilizada fue de un total de 28 cajas monopetri con agar Müller-Hinton con la bacteria activada de *Fusobacterium nucleatum* presente.

Disposición de cajas monopetri:

- La disposición fue de 6 cajas monopetri con agar Müller-Hinton, con la presencia de la bacteria activada de *Fusobacterium nucleatum* ATCC® 25586™, las mismas que están subdivididas en 4 cajas, cada una con tres discos de papel filtro embebidos en el extracto hidroalcohólico de arándano azul con su respectiva concentración y un disco embebido en agua destilada estéril como el control negativo, en la mitad de la caja monopetri. También, se dispuso 2 cajas monopetri con 4 discos de papel filtro embebidos en el extracto hidroalcohólico de arándano azul con su respectiva concentración, en este caso no se utilizó el disco embebido en agua destilada estéril del control negativo en el centro. Esta disposición fue utilizada en cada uno de los 4 porcentajes de concentración del extracto hidroalcohólico de arándano azul (25 %, 50 %, 75 % y 100 %).

- Para el control positivo se dispuso de 2 cajas monopetri con agar Müller-Hinton, con la presencia de la bacteria activada de *Fusobacterium nucleatum* ATCC® 25586™. Cada una de las 2 cajas monopetri contaban con 3 discos de papel filtro embebidos con gluconato de clorhexidina al 0,12% cada uno y un disco embebido en agua destilada estéril como el control negativo, en la mitad de la caja monopetri.. También, se dispuso 2 cajas monopetri con 4 discos de papel filtro embebidos en gluconato de clorhexidina al 0.12 %, en este caso tampoco se utilizó el disco embebido en agua destilada estéril del control negativo en el centro.

2. Criterios de inclusión y de exclusión

2.1. Criterios de inclusión

- Bacteria *Fusobacterium nucleatum* ATCC® 25586™, sin previa utilización en cajas monopetri con el agar de cultivo Müller-Hinton, preparado según las instrucciones de fabricante.

2.2. Criterios de exclusión

- Muestras contaminadas con diferentes especies bacterianas a *Fusobacterium nucleatum*.

3. Variables

3.1. Variables independientes

- Las concentraciones diferentes del extracto hidroalcohólico de arándano azul (25 %, 50 %, 75 % y 100 %).
- Rango de tiempo de contacto del extracto hidroalcohólico de arándano azul con la bacteria *Fusobacterium nucleatum* ATCC® 25586™ (24, 48 y 72 horas).

3.2. Variables dependientes

- Efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico de arándano azul en la bacteria *Fusobacterium nucleatum ATCC® 25586™*.

3.3. Operación de variables

Tabla 3: Operación de variables

Variable	Tipo de variable	Definición de la operación	Clasificación	Indicador de categoría	Tipo de medición
Extracto hidroalcohólico de arándano azul a distintas concentraciones	Independiente	Tamaño del halo que se forma alrededor de los discos de papel filtro sumergidos en el extracto hidroalcohólico de arándano azul a diferentes concentraciones en las cajas monopetri con la bacteria <i>Fusobacterium nucleatum</i>	Cuantitativa	Concentración: 25% 50% 75% 100%	Nominal
Rango de tiempo en que es expuesto el extracto hidroalcohólico de arándano azul	Independiente	Tamaño del halo que se forma alrededor de los discos de papel filtro sumergidos en el extracto hidroalcohólico de arándano azul al 25%, 50%, 75%, 100% en las cajas monopetri con la bacteria <i>Fusobacterium nucleatum</i> en un tiempo determinado.	Cuantitativa	Tiempo en horas: 24 horas 48 horas 72 horas	Ordinal
Efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico de arándano azul hacia la bacteria <i>Fusobacterium nucleatum ATCC® 25586™</i>	Dependiente	Tamaño del halo que se forma alrededor de los discos de papel filtro sumergidos en el extracto hidroalcohólico de arándano azul al 25%, 50%, 75%, 100% en las cajas monopetri con la bacteria <i>Fusobacterium nucleatum</i> a las 24, 48 y 72 horas.	Cuantitativa	Tamaño del halo inhibitorio en mm Según Durafford: Nulo(-) inf o igual a 8mm Sensible(=o+) de 9 a 14mm Muy sensible(=o++) de 15 a 19mm Sumamente sensible(=o+++ a 20mm	Ordinal
Gluconato de clorhexidina al 12%	independiente	Bisguanida con propiedades antimicrobianas con sustantividad	Cuantitativa	Tamaño del halo inhibitorio en mm Según Durafford: Nulo(-) inf o igual a 8mm Sensible(=o+) de 9 a 14mm Muy sensible(=o++) de 15 a 19mm Sumamente sensible(=o+++ a 20mm	Ordinal
Agua	independiente	H2O	cuantitativa	Positiva o negativa	Ordinal

Fuente: Antonio Flores

4. Materiales

4.1. Instalaciones

El trabajo investigativo titulado “**Efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico de arándano azul (*Vaccinium corymbosum*) en diferentes concentraciones: 25 %, 50 %, 75 % y 100 %, en relación con la clorhexidina al 0.12 % frente a la cepa *Fusobacterium nucleatum*: estudio microbiológico in vitro**” se efectuó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Internacional del Ecuador, sede Quito.

4.2. Tipos de materiales empleados

Barreras de protección

- Gorro
- Guantes
- Mandil
- Mascarilla
- Protectores oculares

Insumos

- Discos de papel filtro en blanco
- Fósforos
- Hisopos largos estériles
- Papel metálico
- Sobres generadores de anaerobiosis

Sustancias

- Aceite de inmersión
- Agar nutritivo
- Agar Müeller-Hinton
- Agar sangre de cordero
- Agua estéril
- Alcohol antiséptico
- Alcohol cetona
- Alcohol industrial
- Cepa de *Fusobacterium nucleatum* ATCC® 25586™
- Cristal violeta
- Extracto hidroalcohólico de arándano azul
- Gluconato de clorhexidina al 0.12%
- Lugol
- Safranina
- *Standard* de McFarland 0.5

Instrumentos

- Cajas monopetri
- Fundas generadoras de anaerobiosis
- Gradilla grande
- Jarra de anaerobiosis
- Lámpara de alcohol
- Matraz Erlenmeyer
- Pinzas dentadas
- Pipeta estandarizada
- Portaobjetos
- Puntas estériles de pipeta
- Regla ZoneScale™
- Tubos de ensayo
- Vaso de precipitación

Artefactos

- Balanza electrónica
- Cocineta eléctrica
- Estufa de esterilización
- Horno de incubación
- Microscopio
- Refrigerador

5. Procedimiento

5.1. Adquisición del arándano azul

La adquisición de los frutos del arándano azul fue realizada en la empresa Ecuarandano, ubicada en la parroquia Guayllabamba, perteneciente al cantón Quito, en la provincia de Pichincha. Inicialmente se adquirió 340g, de los cuales se hizo un proceso de clasificación con el motivo evitar que las frutas con irregularidades o en proceso de descomposición sean utilizadas para la elaboración del extracto.

5.2. Elaboración del extracto hidroalcohólico de arándano azul

Una vez clasificados los arándanos, se procedió su lavado y desinfección para lo cual se utilizó un desinfectante natural a base de toronja llamado kilol, se utilizaron 15ml de kilol disueltos en un litro de agua, donde se sumergió los arándanos durante 5 minutos. Culminada la etapa de lavado y desinfección se procedió a los siguientes pasos:

- Se pesaron 50 gramos de los frutos previamente desinfectados en una balanza semianalítica.
- Se realizó un proceso de prensado de los arándanos azules en un mortero de porcelana.
- Se agregó 50 ml de solución hidroalcohólica, compuesta por 25 ml de alcohol potable a una concentración de 96 % y 25 ml de agua desmineralizada.

- Se introdujo el producto obtenido en un envase PET blanco y se lo colocó en el aparato de agitación rotatorio por 48 horas.
- Se procedió al filtrado del extracto a las 48 horas.
- Se repitió el procedimiento en otros 50 gramos de arándano azul dos veces más.
- Finalizado el proceso de extracción, se filtró el extracto final y se procedió a realizar las diluciones.
- Para la obtención del extracto hidroalcohólico de arándano azul al 25 % se tomaron 2.5 ml de extracto puro y se adicionaron 7,5 ml de solución hidroalcohólica.
- Para la obtención del extracto hidroalcohólico de arándano azul al 50 % se tomaron 5 ml de extracto puro y se adicionaron 5 ml de solución hidroalcohólica.
- Para la obtención del extracto hidroalcohólico de arándano azul al 75 % se tomaron 7,5 ml de extracto puro y se adicionaron 2,5 ml de solución hidroalcohólica.
- Para la obtención del extracto hidroalcohólico de arándano azul al 100 % se tomaron 10 ml de extracto puro sin adicionar sustancia hidroalcohólica.
- Los extractos fueron esterilizados en una cámara UV por 45 minutos y posteriormente envasados y etiquetados.(Fig.2)



Figura 2: Producto: extracto hidroalcohólico de arándano azul 25%, 50%, 75% y 100%

Fuente: Antonio Flores

5.3. Efecto de inhibición Kirby-Bauer

5.3.1. Medio de cultivo

El agar Müeller-Hinton es un medio de cultivo con base de infusión de carne deshidratada, utilizado para los estudios de sensibilidad; es de color marrón claro y liso. Los microorganismos crecen de manera adecuada, ya que es un agar de tipo nutritivo.

- Se procedió a pesar 38 g de polvo agar Müeller-Hinton sobre una balanza electrónica.(Fig. 3 y 4)
- Se midió un litro de agua destilada en un matraz de Erlenmeyer.(Fig. 5)
- Se introdujo 38 g de agar Müeller-Hinton en el litro de agua y se mezcló hasta conseguir una consistencia uniforme, sin partículas de polvo.(Fig. 6)
- Con los frascos sellados se introdujo la mezcla en la estufa de esterilización a una presión de 760 mmHg de atm por un tiempo de 30 minutos. (Fig. 7)
- Se dejaron enfriar los frascos durante aproximadamente diez minutos.
- Se introdujo solución de agar Müeller-Hinton en las cajas monopetri en dosis uniformes e iguales.(Fig. 8)

Aproximadamente en una hora se observó la adquisición de la consistencia adecuada.



Figura 3 y Figura 4: Preparación del medio de cultivo Müeller-Hinton

Fuente: Antonio Flores



Figura 5 y Figura 6: Preparación del medio de cultivo Müller-Hinton

Fuente: Antonio Flores



Figura 7 y Figura 8: Preparación del medio de cultivo Müller-Hinton

Fuente: Antonio Flores

5.3.2. Activación de la cepa liofilizada *Fusobacterium nucleatum* ATCC® 25586™

La bacteria *Fusobacterium nucleatum* ATCC® 25586™, del lote número 328-83-0, certificada por la empresa “Microbiologics”, de procedencia estadounidense, fue importada y distribuida por la empresa “Medibac Inc. S.A”, con registro sanitario AD-541-04-13 y fecha de caducidad 2020-08-31. Se realizó el proceso de activación del microorganismo en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Médicas, de la Salud y la Vida, de la Universidad Internacional del Ecuador, en el medio de cultivo agar sangre de cordero, el mismo que fue obtenido en la empresa “Medibac Inc. S.A”. Una vez realizado el procedimiento inicial de activación, tres cajas monopetri de agar sangre de cordero, con la cepa de *Fusobacterium nucleatum* ATCC® 25586™ debidamente enumeradas (Fig. 9,10), junto con un sobre generador de anaerobiosis (Fig. 11) fueron introducidos dentro de una jarra de anaerobiosis la cual fue sellada herméticamente, para luego ser llevada al horno de incubación a 35 °C, por un tiempo de 72 horas. (Fig. 12)

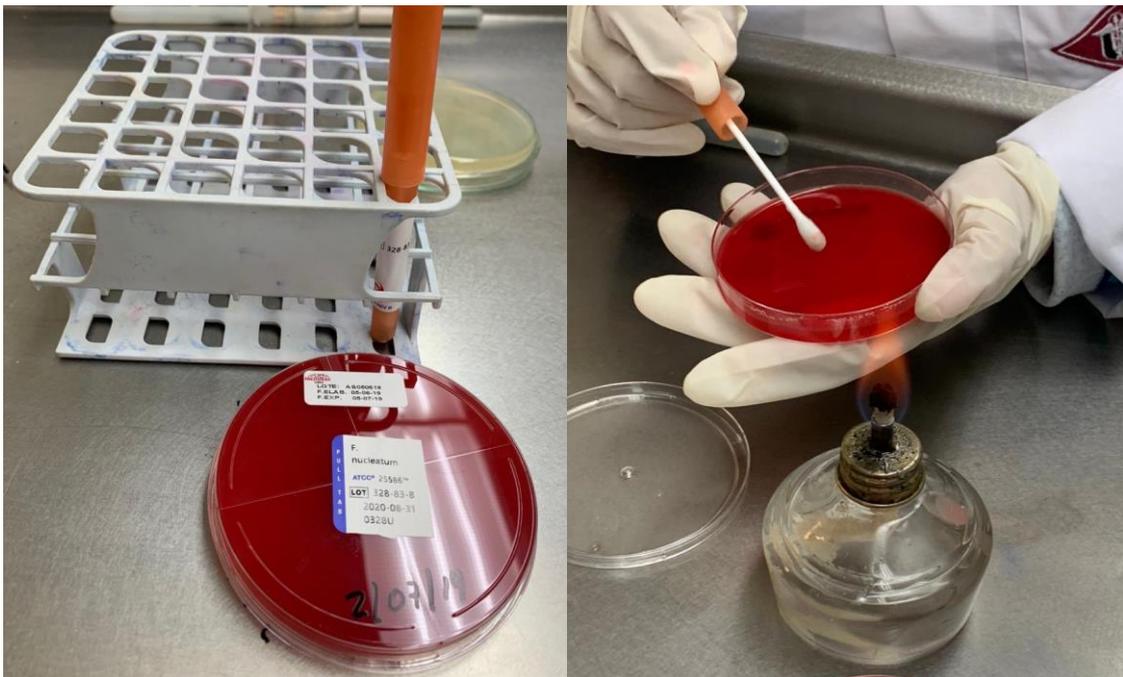


Figura 9 y Figura 10: Activación de la cepa liofilizada *Fusobacterium nucleatum* ATCC® 25586™

Fuente: Antonio Flores



Figura 11 y Figura 12: Activación de la cepa liofilizada *Fusobacterium nucleatum* ATCC® 25586™

Fuente: Antonio Flores



Figura 13: Activación de la cepa liofilizada *Fusobacterium nucleatum* ATCC® 25586™

Fuente: Antonio Flores

Se realizaron controles a las 24, 48 y 72 horas; a las 24 y 48 horas no se observaron colonias bacterianas. A las 72 horas de incubación la caja número 3 presentó una colonización bacteriana.

5.3.3. Tinción Gram

Esta técnica de tinción diferencial bacteriana fue utilizada con el propósito de determinar la presencia de la bacteria Gram negativa *Fusobacterium nucleatum*, para tener la certeza que la muestra bacteriana obtenida de la caja número 3 pertenecía a la bacteria *Fusobacterium nucleatum* para continuar con el estudio.

El protocolo de tinción fue el siguiente:

- Se obtuvo una muestra pura de la colonia bacteriana presente en la caja número 3 de agar sangre de cordero. (*Fig. 14*)
- Sobre una placa porta objetos se mezcló una gota de agua estéril con la muestra de la colonia bacteriana.
- Se procedió a realizar la evaporación del agua estéril colocando cuidadosamente la placa con la mezcla sobre el fuego de un mechero. (*Fig. 15*)
- Se vertió una pequeña cantidad de cristal violeta que cubra toda la superficie a teñir sobre la placa porta objetos durante 60 segundos para pigmentar las bacterias y se lavó con agua estéril. (*Fig. 17*)
- Inmediatamente se administraron unas gotas de lugol por 60 segundos para la fijación de la sustancia anterior y se lavó con agua estéril. (*Fig. 18*)
- Se administraron varias gotas de alcohol acetona para despigmentar la bacteria por 20 segundos y se lavó con agua estéril. (*Fig. 19*)
- Finalmente, se utilizó safranina por 60 segundos para diferenciar las bacterias Gram negativas y se lavó con agua estéril. (*Fig. 20*)



Figura 14 y Figura 15: Tinción Gram *Fusobacterium nucleatum* ATCC® 25586™

Fuente: Antonio Flores



Figura 16: Tinción Gram *Fusobacterium nucleatum* ATCC® 25586™

Fuente: Antonio Flores



Figura 17: Tinción Gram *Fusobacterium nucleatum* ATCC® 25586™

Fuente: Antonio Flores

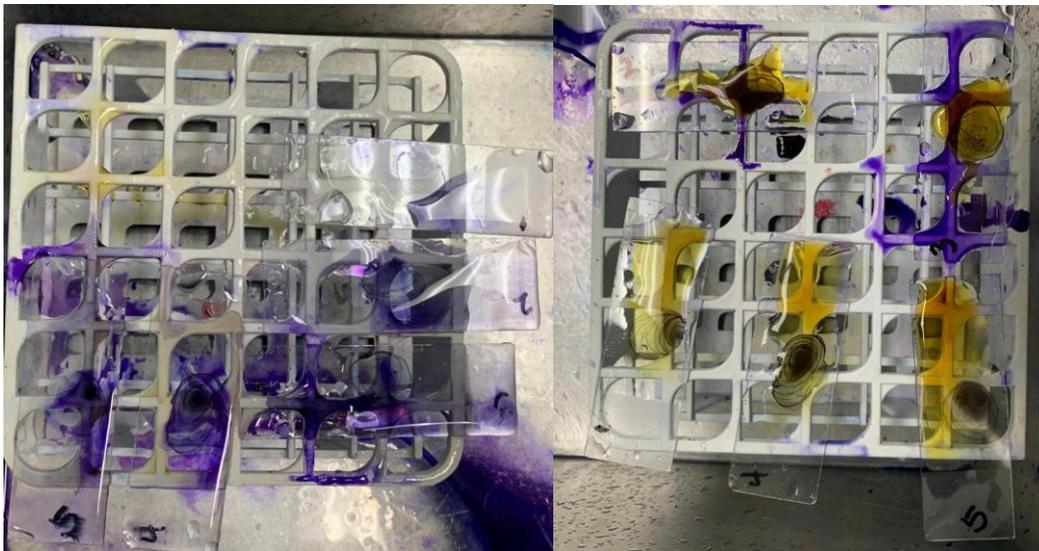


Figura 18 y Figura 19: Tinción Gram *Fusobacterium nucleatum* ATCC® 25586™

Fuente: Antonio Flores



Figura 20: Tinción Gram *Fusobacterium nucleatum* ATCC® 25586™

Fuente: Antonio Flores

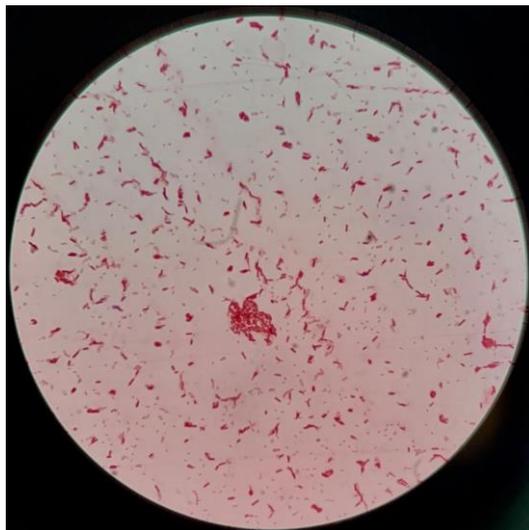


Figura 21: Tinción Gram *Fusobacterium nucleatum* ATCC® 25586™

Fuente: Antonio Flores

- Al finalizar el proceso de tinción Gram, se observó el resultado en microscopio perteneciente al Laboratorio de Microbiología de la Escuela de Odontología para la comprobación respectiva. (Fig. 21)

5.3.4. Obtención del grado de turbidez

- Para este estudio microbiológico se tomó como referencia el estándar de turbidez 0.5 McFarland.
- Se procedió a la colocación de agua estéril dentro de un tubo de ensayo previamente esterilizado.
- Se transportó la bacteria con un asa de inoculación desde la caja monopetri donde se encontraban las colonias bacterianas hasta el interior del tubo de ensayo con agua estéril. (Fig. 22 y 23)
- Se mezcló la muestra con el agua estéril dentro del tubo de ensayo.
- Se comparó el grado de turbidez que contenía la muestra con el de 0.5 McFarland y se verificó con éxito. (Fig. 24 y 25)
- El grado de turbidez aproximadamente contiene 1.5×10^8 UFC/ml de *Fusobacterium nucleatum*.



Figura 22 y Figura 23: Obtención del grado de turbidez

Fuente: Antonio Flores

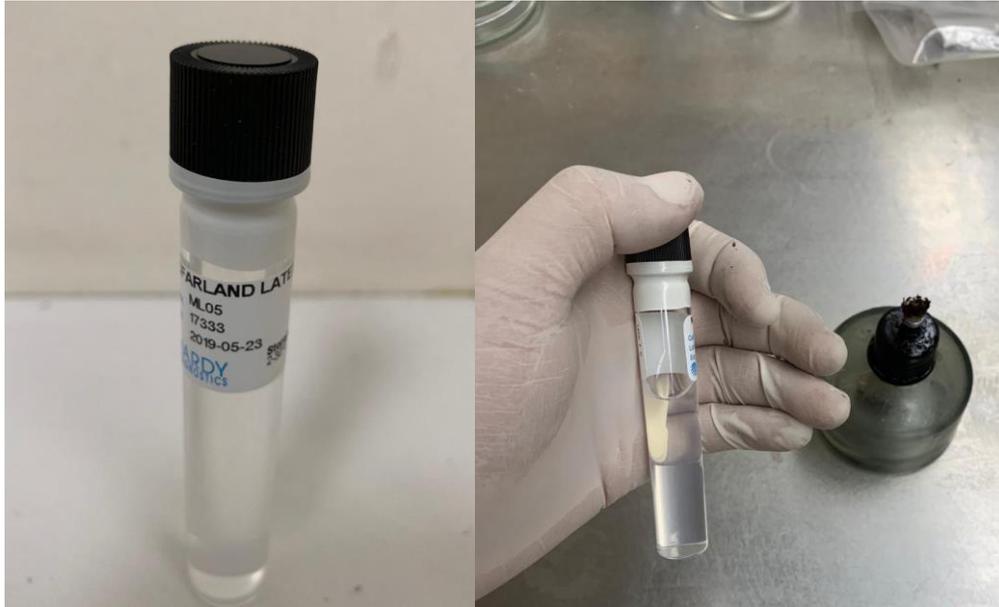


Figura 24 y Figura 25: Obtención del grado de turbidez

Fuente: Antonio Flores

5.3.5. Preparación de las cajas monopetri con la sustancia a inocular

Después de la obtención del grado turbidez adecuado y con las 28 cajas monopetri con agar Müeller-Hinton ya preparadas, junto a una fuente de calor para evitar contaminación cruzada, se utilizó hisopos estériles de 16.3 cm de largo para absorber la mezcla obtenida del tubo de ensayo. (Fig. 26) Se abrieron las cajas monopetri para eliminar el líquido sobrante en algunas de ellas y se realizó el cultivo en sentido vertical y luego horizontal, girando el hisopo para descargar todo el contenido embebido en el mismo y asegurar que la bacteria se disemine en toda la superficie del agar (Fig. 27), de manera regular en todas las cajas monopetri. (Fig. 28)

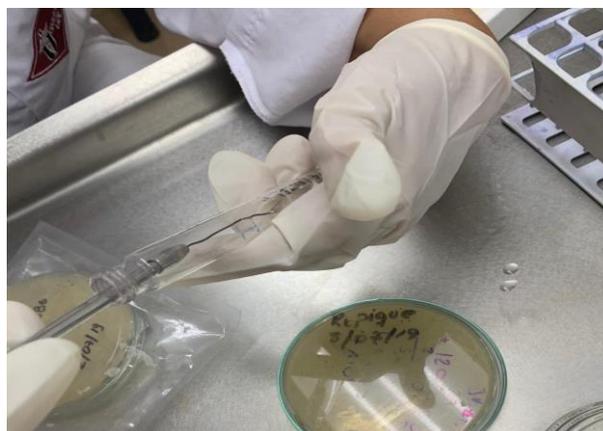


Figura 26: Preparación de las cajas Petri con la sustancia por inocular

Fuente: Antonio Flores

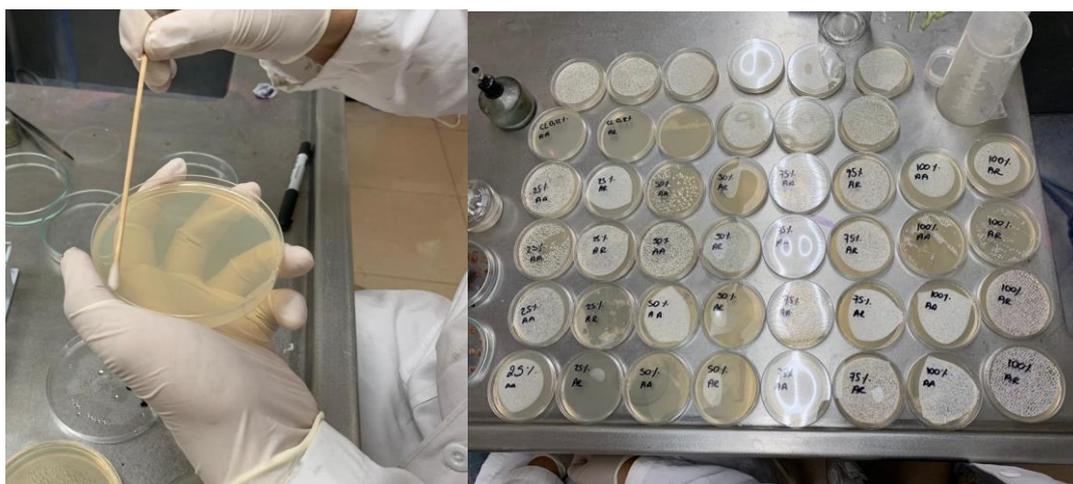


Figura 27 y Figura 28: Preparación de las cajas Petri con la sustancia por inocular

Fuente: Antonio Flores

5.3.6. Impregnación y distribución de los discos de papel filtro

En 11 cajas monopetri vacías y estériles se distribuyeron un total de 104 discos en blanco, a una distancia de 10 mm cada uno, como acopio principal, para luego ser distribuidas con una pinza estéril a las 28 cajas de agar Mueller-Hinton, debidamente identificadas con la bacteria y la concentración del extracto que se iba a utilizar en cada una. Se colocaron:

- Cuatro cajas, cada caja con tres discos de papel filtro con extracto hidroalcohólico de arándano azul al 25 %, y un disco con agua estéril en el centro. Además, dos cajas con cuatro discos de papel filtro con extracto hidroalcohólico de arándano azul al 25 %, sin la presencia del disco de agua estéril.
- Cuatro cajas, cada caja con tres discos de papel filtro con extracto hidroalcohólico de arándano azul al 50 %, y un disco con agua estéril en el centro. Además, dos cajas con cuatro discos de papel filtro con extracto hidroalcohólico de arándano azul al 50 %, sin la presencia del disco de agua estéril.
- Cuatro cajas con tres discos de papel filtro, con extracto hidroalcohólico de arándano azul al 75 %, y un disco con agua estéril en el centro. Además, dos cajas con cuatro

discos de papel filtro con extracto hidroalcohólico de arándano azul al 75 %, sin la presencia del disco de agua estéril.

- Cuatro cajas con tres discos de papel filtro, con extracto hidroalcohólico de arándano azul al 100 %, y un disco con agua estéril en el centro. Además, dos cajas con cuatro discos de papel filtro con extracto hidroalcohólico de arándano azul al 100 %, sin la presencia del disco de agua estéril.
- Dos cajas con tres discos de papel filtro, con gluconato de clorhexidina al 0.12 % y un disco con agua estéril en el centro. Además, dos cajas con cuatro discos de papel filtro con gluconato de clorhexidina al 0.12 %, sin la presencia del disco de agua estéril.



Figura 29 y Figura 30: Preparación de las cajas Petri con la sustancia por inocular

Fuente: Antonio Flores

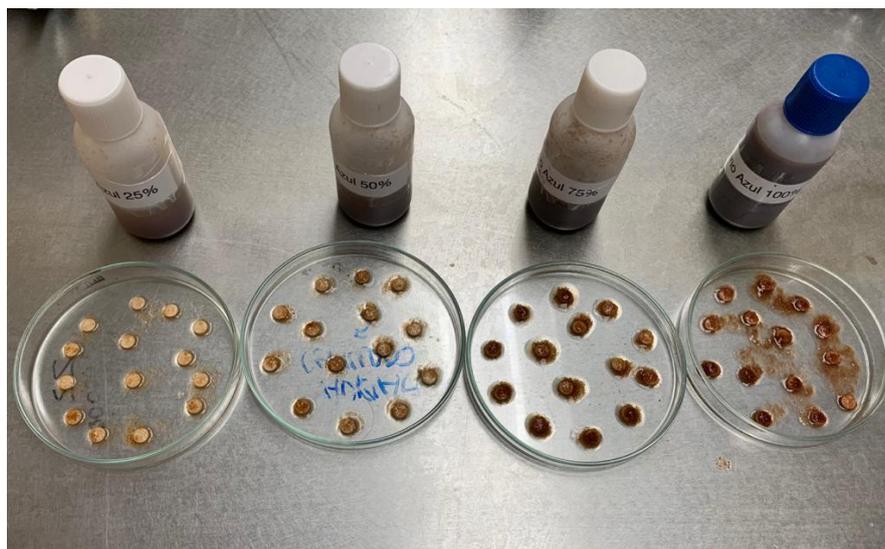


Figura 31: Preparación de las cajas Petri con la sustancia por inocular

Fuente: Antonio Flores



Figura 32: Preparación de las cajas Petri con la sustancia por inocular

Fuente: Antonio Flores

El control positivo en el estudio se realizó con gluconato de clorhexidina al 0.12 % (Fig. 33) mientras que el control negativo se realizó con agua estéril. (Fig. 34)



Figura 33 y Figura 34: Preparación de las cajas Petri con la sustancia por inocular

Fuente: Antonio Flores

En los 104 discos de papel filtro en blanco se administraron 20 μ l de la sustancia correspondiente (agua estéril, clorhexidina, extracto hidroalcohólico de arándano azul en diferentes concentraciones) con una micropipeta estandarizada (Fig. 35).

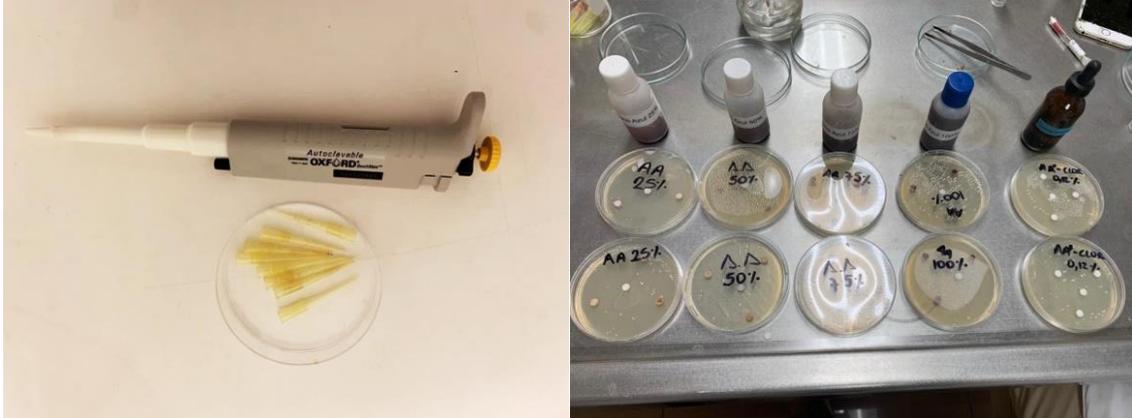


Figura 35: Micropipeta estandarizada

Figura 36: Cajas Petri listas

Fuente: Antonio Flores

5.3.7. Proceso incubatorio *Fusobacterium nucleatum* ATCC® 25586™

Se introdujeron diez cajas monopetri con la bacteria sembrada y con los discos embebidos en su respectiva sustancia dentro de una jarra de anaerobiosis, además de 18 cajas con los discos embebidos en su respectiva sustancia distribuidos dentro de 5 fundas de anaerobiosis, cerradas herméticamente. (Fig. 37) Tanto dentro de la jarra como de cada funda se introdujo un sobre generador de anaerobiosis. Una vez obtenidos los medios adecuados para el desarrollo de la investigación, se procedió a colocar la jarra de anaerobiosis y las fundas de anaerobiosis en el horno de incubación a 35 °C. (Fig. 38 y39)

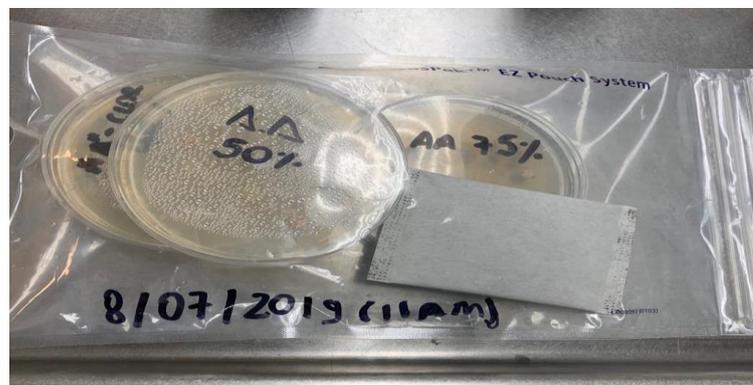


Figura 37: Proceso incubatorio *Fusobacterium nucleatum* ATCC® 25586™

Fuente: Antonio Flores



Figura 38 y Figura 39: Proceso incubatorio *Fusobacterium nucleatum* ATCC® 25586™

Fuente: Antonio Flores

5.3.8. Obtención de los resultados

Se tiene como objetivo medir el diámetro de los halos inhibitorios, formados por el extracto hidroalcohólico de arándano azul en diferentes concentraciones y clorhexidina al 0,12%, se empleó la regla ZoneScale™ estandarizada en círculos con diámetros en milímetros (Fig. 40). La medición de los halos observados se realizó en un intervalo de tiempo de 24, 48 y 72 horas de incubación.

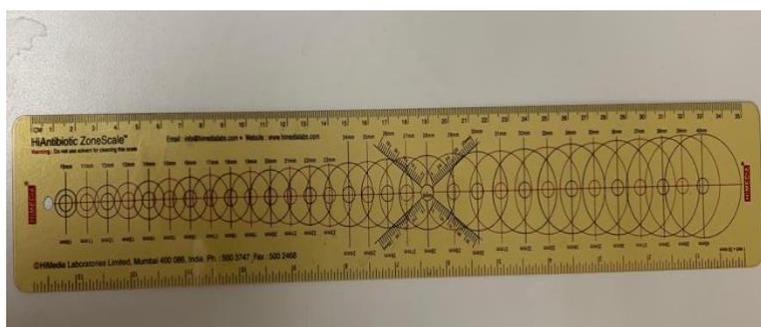


Figura 40: Regla ZoneScale™

Fuente: Universidad Internacional del Ecuador

5.3.9. Halos inhibitorios

Extracto hidroalcohólico de arándano azul al 25 %

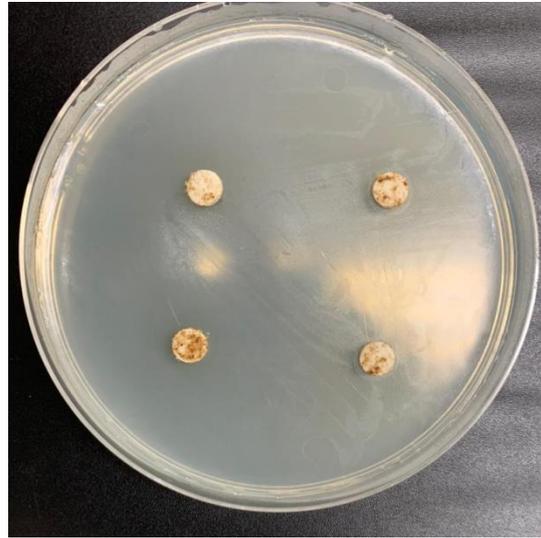


Figura 41: Halos inhibitorios a las 24 horas **Figura 42:** Halos inhibitorios a las 48 horas

Fuente: Antonio Flores

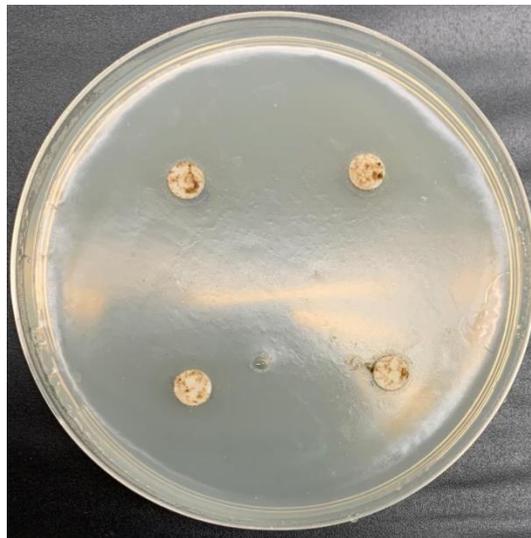


Figura 43: Halos inhibitorios a las 72 horas

Fuente: Antonio Flores

Extracto hidroalcohólico de arándano azul al 50 %

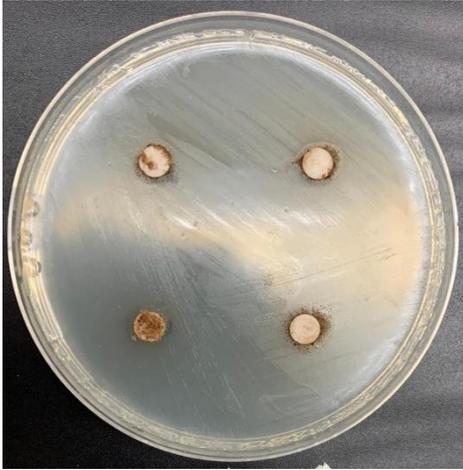


Figura 44: Halos inhibitorios a las 24 horas

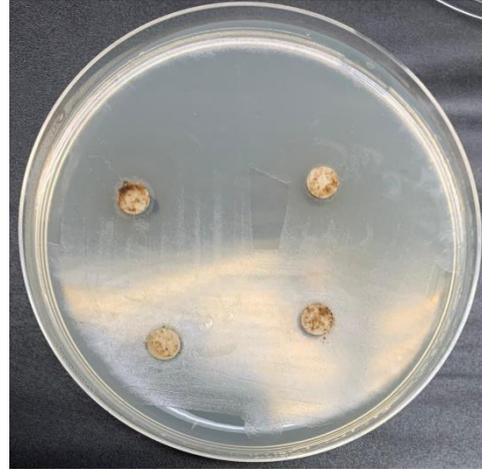


Figura 45: Halos inhibitorios a las 48 horas

Fuente: Antonio Flores

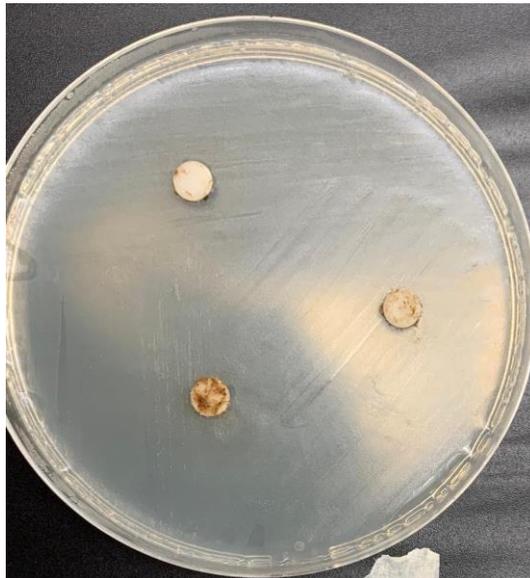


Figura 46: Halos inhibitorios a las 72 horas

Fuente: Antonio Flores

Extracto hidroalcohólico de arándano azul al 75 %

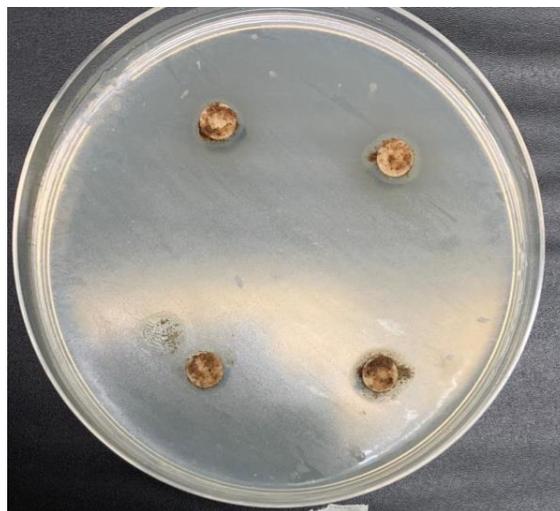
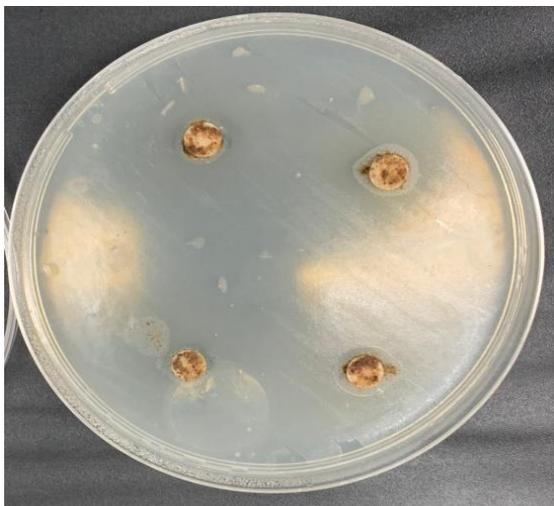


Figura 47: Halos inhibitorios a las 24 horas **Figura 48:** Halos inhibitorios a las 48 horas

Fuente: Antonio Flores



Figura 49: Halos inhibitorios a las 72 horas

Fuente: Antonio Flores

Extracto hidroalcohólico de arándano azul al 100%



Figura 50: Halos inhibitorios a las 24 horas **Figura 51:** Halos inhibitorios a las 48 horas

Fuente: Antonio Flores



Figura 52: Halos inhibitorios a las 72 horas

Fuente: Antonio Flores

5.3.10 Recolección de residuos



Figura 53 y Figura 54: Recolección y manejo de desechos

Fuente: Antonio Flores

A lo largo de todo este trabajo de investigación, se generaron varios desechos en el proceso, como fundas usadas, empaques o sobres, los cuales fueron desechados correctamente en los depósitos correspondientes. Al finalizar el estudio investigativo, todos los materiales de laboratorio que fueron utilizados y pueden ser reutilizados fueron sometidos a un proceso de esterilización durante 45 minutos para eliminar rastros de contaminantes y microorganismos. (Fig. 53 y 54)

Resultados

La meta final de este estudio investigativo y experimental fue determinar la existencia de un efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico de arándano azul (*Vaccinium corymbosum*) a concentraciones de 25 %, 50 %, 75 % y 100 %, frente al periodontopatógeno *Fusobacterium nucleatum* en un rango de 24, 48 y 72 horas de incubación. Mediante la observación científica presencial y la medición del diámetro de los halos inhibitorios, formados por la acción del extracto hidroalcohólico de la fruta, se recopiló la información resultante.

Exposición de datos

Se aplicarán varios estudios estadísticos de datos que serán los siguientes para determinar un mejor resultado.

1 ANOVA

Si los resultados en el estudio ANOVA el valor de significación está por debajo de 0,05 si hay diferencia en medidas y si es mayor, no existen diferencias entre dos o más medidas.

1.1 ANOVA: Comparación de halos inhibitorios a las 24 horas: arándano azul 25%, 50%, 75%, clorhexidina al 0,12% y agua destilada

Tabla 4: Comparación de halos inhibitorios a las 24 horas: arándano azul 25%, 50%, 75%, clorhexidina al 0,12% y agua destilada

Descriptivos							
24 horas							
CONCENTRACIONES	N	Media	DE	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
Arándano azul 25%	20	9,45	3,30	7,91	10,99	0,0	12,0
Arándano azul 50%	20	4,65	5,29	2,17	7,13	0,0	12,0
Arándano azul 75%	20	6,90	5,22	4,46	9,34	0,0	12,0
Arándano azul 100%	20	7,50	5,17	5,08	9,92	0,0	15,0
Clorhexidina al 0,12%	14	19,57	1,60	18,65	20,50	17,0	23,0
Agua destilada	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0
Total	104	8,12	6,69	6,81	9,42	0,0	23,0

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

Interpretación

El extracto hidroalcohólico de arándano azul al 25 % fue el que obtuvo mejores resultados de inhibición, a las 24 horas, presentó una media de 9,45 mm en los halos inhibitorios mientras que el del 50 % presentó una media de 4,65 mm en los halos inhibitorios, siendo el que obtuvo los resultados más bajos en cuanto a grado de inhibición; al 75 % presentó una media de 6,90 mm y al 100 % de concentración la muestra presentó una media de 7,50 mm en los halos inhibitorios. Sin embargo todos estos resultados fueron menores a la muestra de clorhexidina al 0.12 %, con una media de 19,57 mm.

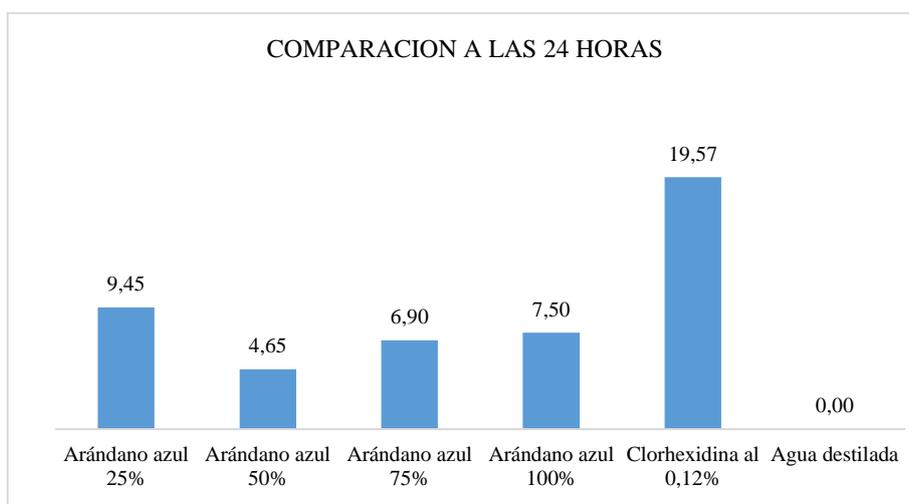


Gráfico Estadístico 1: Comparación de medias del extracto hidroalcohólico de arándano azul en diferentes concentraciones a las 24 horas

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

Interpretación

En las medias propuestas por el gráfico estadístico se puede observar variabilidad entre ellas, siendo la concentración de clorhexidina al 0.12 % la mayor, seguida de las concentraciones al 25%, 100 %, 75 %, 50 % y agua en un tiempo de 24 horas.

Con estos valores se realiza la prueba Anova para determinar si se tienen diferencias significativas entre las muestras:

Tabla 5: ANOVA 24 horas

ANOVA					
24 horas					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2808,887	5	561,777	30,624	0,000
Dentro de grupos	1797,729	98	18,344		
Total	4606,615	103			

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

Interpretación

A las 24 horas en la prueba ANOVA, el valor de significación (Sig = 0,000, F=30,624) es inferior a 0,05, por lo cual las muestras presentan una diferencia significativa.

1.2 ANOVA: Comparación de halos inhibitorios a las 48 horas: arándano azul 25%, 50%, 75%, clorhexidina al 0,12% y agua destilada

Tabla 6: Comparación de halos inhibitorios a las 48 horas: arándano azul 25%, 50%, 75%, clorhexidina al 0,12% y agua destilada

Descriptivos							
48 horas							
CONCENTRACIONES	N	Media	DE	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
Arándano azul 25%	20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0
Arándano azul 50%	20	1,75	4,28	-0,25	3,75	0,0	12,0
Arándano azul 75%	20	6,30	5,29	3,82	8,78	0,0	11,0
Arándano azul 100%	20	9,25	4,24	7,27	11,23	0,0	15,0
Clorhexidina al 0,12%	14	21,29	1,27	20,55	22,02	19,0	23,0
Agua destilada	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0
Total	104	6,19	7,74	4,69	7,70	0,0	23,0

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

Interpretación

El extracto hidroalcohólico de arándano azul al 100 % fue el que obtuvo mejores resultados de inhibición, a las 48 horas, presentó una media de 9,25 mm en los halos inhibitorios mientras que el del 25 % no presentó ningún resultado con media de 0.00 en los halos inhibitorios, siendo el que obtuvo los resultados más bajos en cuanto a grado de inhibición; al 75 % presentó una media de 6,30 mm y al 50 % de concentración la muestra

presentó una media de 1,75 mm en los halos inhibitorios. Sin embargo todos estos resultados fueron menores a la muestra de clorhexidina al 0.12 %, con una media de 21,29 mm.

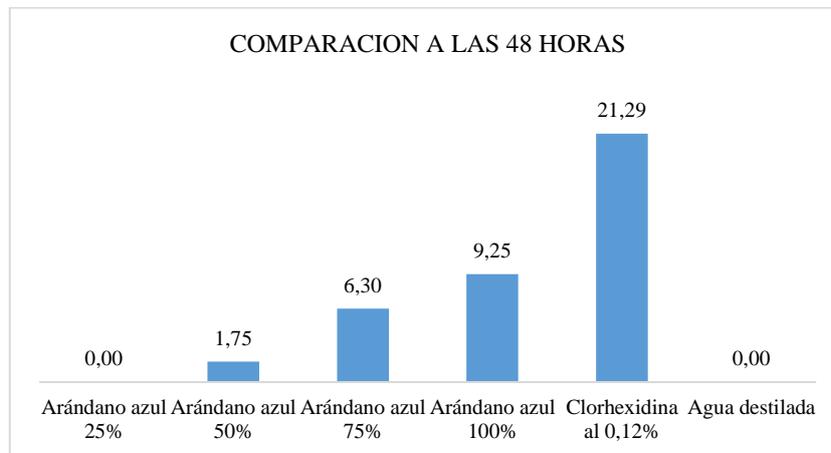


Gráfico Estadístico 2: Comparación de medias del extracto hidroalcohólico de arándano azul en diferentes concentraciones a las 48 horas

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

Interpretación

En las medias propuestas por el gráfico estadístico se puede observar variabilidad entre ellas, siendo la concentración de la clorhexidina al 0.12 % la mayor, seguida de las concentraciones al 100 %, 75 %, 50 % y al final con empate la concentración del 25 % y agua en un tiempo de 48 horas.

Con esto valores se realiza la prueba Anova para determinar si se tienen diferencias significativas entre las muestras:

Tabla 7: ANOVA 48 horas

ANOVA					
48 horas					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4921,597	5	984,319	77,633	0,0000
Dentro de grupos	1242,557	98	12,679		
Total	6164,154	103			

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

Interpretación

A las 48 horas en la prueba ANOVA, el valor de significación (Sig = 0,000, F=77,633) es inferior a 0,05, por lo cual las muestras presentan una diferencia significativa.

1.3 ANOVA: Comparación de halos inhibitorios a las 72 horas: arándano azul 25%, 50%, 75%, clorhexidina al 0,12% y agua destilada

Tabla 8: Comparación de halos inhibitorios a las 72 horas: arándano azul 25%, 50%, 75%, clorhexidina al 0,12% y agua destilada

Descriptivos							
72 horas							
CONCENTRACIONES	N	Media	DE	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
Arándano azul 25%	20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0
Arándano azul 50%	20	0,50	2,24	-0,55	1,55	0,0	10,0
Arándano azul 75%	20	2,65	4,72	0,44	4,86	0,0	11,0
Arándano azul 100%	20	7,70	5,45	5,15	10,25	0,0	16,0
Clorhexidina al 0,12%	14	21,57	1,16	20,90	22,24	20,0	23,0
Agua destilada	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0
Total	104	4,99	7,86	3,46	6,52	0,0	23,0

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

Interpretación

El extracto hidroalcohólico de arándano azul al 100 % fue el que obtuvo mejores resultados de inhibición, a las 72 horas, presentó una media de 7,70 mm en los halos inhibitorios mientras que el del 25 % no presentó ningún resultado con media de 0.00 mm en los halos inhibitorios, siendo el que obtuvo los resultados más bajos en cuanto a grado de inhibición; al 75 % presentó una media de 2,65 mm y al 50 % de concentración la muestra

presentó una media de 0,5 mm en los halos inhibitorios. Sin embargo todos estos resultados fueron menores a la muestra de clorhexidina al 0.12 %, con una media de 21,57 mm.

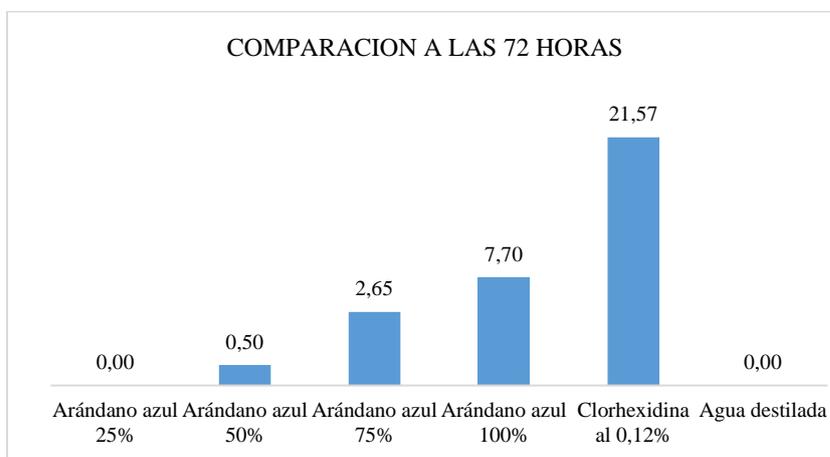


Gráfico Estadístico 3: Comparación de medias del extracto hidroalcohólico de arándano azul en diferentes concentraciones a las 72 horas.

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

Interpretación

En las medias propuestas por el gráfico estadístico se puede observar variabilidad entre ellas, siendo la concentración de la clorhexidina al 0.12 % la mayor, seguida de las concentraciones al 100 %, 75 %, 50 % y al final con empate la concentración del 25 % y agua en un tiempo de 72 horas.

Con esto valores se realiza la prueba Anova para determinar si se tienen diferencias significativas entre las muestras:

Tabla 9: ANOVA 72 horas

ANOVA					
72 horas					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	5255,812	5	1051,162	93,719	0,000
Dentro de grupos	1099,179	98	11,216		
Total	6354,99	103			

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

Interpretación

A las 72 horas en la prueba ANOVA, el valor de significación (Sig = 0,000, F=93,719) es inferior a 0,05, por lo cual las muestras presentan una diferencia significativa.

2 Pruebas post hoc TUKEY

2.1 TURKEY: Comparación a las 24 horas: arándano azul 25%, 50%, 75%, clorhexidina al 0,12% y agua destilada

Tabla 10: Pruebas *post hoc* (Tukey) del extracto hidroalcohólico de arándano azul a las 24 horas

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: 24 horas						
HSD Tukey						
(I) SUSTANCIAS	(J) SUSTANCIAS	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Arándano azul 25%	Arándano azul 50%	4,800*	1,354	0,008	0,86	8,74
	Arándano azul 75%	2,55	1,354	0,419	-1,39	6,49
	Arándano azul 100%	1,95	1,354	0,703	-1,99	5,89
	Clorhexidina al 0,12%	-10,121*	1,492	0,000	-14,46	-5,78
	Agua destilada	9,450*	1,659	0,000	4,63	14,27
Arándano azul 50%	Arándano azul 25%	-4,800*	1,354	0,008	-8,74	-0,86
	Arándano azul 75%	-2,25	1,354	0,560	-6,19	1,69
	Arándano azul 100%	-2,85	1,354	0,294	-6,79	1,09
	Clorhexidina al 0,12%	-14,921*	1,492	0,000	-19,26	-10,58
	Agua destilada	4,65	1,659	0,065	-0,17	9,47
Arándano azul 75%	Arándano azul 25%	-2,55	1,354	0,419	-6,49	1,39
	Arándano azul 50%	2,25	1,354	0,560	-1,69	6,19
	Arándano azul 100%	-0,6	1,354	0,998	-4,54	3,34
	Clorhexidina al 0,12%	-12,671*	1,492	0,000	-17,01	-8,33
	Agua destilada	6,900*	1,659	0,001	2,08	11,72

Arándano azul 100%	Arándano azul 25%	-1,95	1,354	0,703	-5,89	1,99
	Arándano azul 50%	2,85	1,354	0,294	-1,09	6,79
	Arándano azul 75%	0,6	1,354	0,998	-3,34	4,54
	Clorhexidina al 0,12%	-12,071*	1,492	0,000	-16,41	-7,73
	Agua destilada	7,500*	1,659	0,000	2,68	12,32
Clorhexidina al 0,12%	Arándano azul 25%	10,121*	1,492	0,000	5,78	14,46
	Arándano azul 50%	14,921*	1,492	0,000	10,58	19,26
	Arándano azul 75%	12,671*	1,492	0,000	8,33	17,01
	Arándano azul 100%	12,071*	1,492	0,000	7,73	16,41
	Agua destilada	19,571*	1,773	0,000	14,42	24,73
Agua destilada	Arándano azul 25%	-9,450*	1,659	0,000	-14,27	-4,63
	Arándano azul 50%	-4,65	1,659	0,065	-9,47	0,17
	Arándano azul 75%	-6,900*	1,659	0,001	-11,72	-2,08
	Arándano azul 100%	-7,500*	1,659	0,000	-12,32	-2,68
	Clorhexidina al 0,12%	-19,571*	1,773	0,000	-24,73	-14,42

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

En la prueba de Tukey, que compara dos a dos las sustancias se tiene que algunos de los valores del nivel de significación (Sig) son inferiores a 0,05, luego en esos casos las medias de las muestras no son similares, se tiene el siguiente cuadro resumen:

Subconjuntos homogéneos

Tabla 11: Turkey 24 horas

24 horas					
HSD Tukey					
SUSTANCIAS	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
Agua destilada	10	0,00			
Arándano azul 50%	20		4,65		
Arándano azul 75%	20		6,90	6,90	
Arándano azul 100%	20		7,50	7,50	
Arándano azul 25%	20			9,45	
Clorhexidina al 0,12%	14				19,57
Sig.		1,000	0,414	0,540	1,000

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

Interpretación

A las 24 horas el extracto hidroalcohólico de arándano azul al 25% presentó una diferencia significativa con las concentraciones de 50%, clorhexidina al 0.12 % y agua destilada, ya que el valor de significación fue menor a 0,05.

A las 24 horas el extracto hidroalcohólico de arándano azul al 50% presentó una diferencia significativa con las concentraciones de 25% y clorhexidina al 0.12 %, ya que el valor de significación fue menor a 0,05.

A las 24 horas el extracto hidroalcohólico de arándano azul al 75% presentó una diferencia significativa con las concentraciones de a la clorhexidina al 0.12 % y al agua destilada, ya que el valor de significación fue menor a 0,05.

A las 24 horas el extracto hidroalcohólico de arándano azul al 100% presentó una diferencia significativa con las concentraciones de clorhexidina al 0.12 % y al agua destilada, ya que el valor de significación fue menor a 0,05.

A las 24 horas la clorhexidina al 0.12 % presentó una diferencia significativa en su efecto inhibitorio con las concentraciones de extracto hidroalcohólico de arándano azul al 25 %, 50 %, 75 %, 100 % y agua destilada, ya que el valor de significación fue menor a 0,05.

A las 24 horas el agua destilada presentó una diferencia significativa con las concentraciones de extracto hidroalcohólico de arándano azul al 25 %, 75 %, 100 % y clorhexidina al 0.12 %, ya que el valor de significación fue menor a 0,05.

2.2 TURKEY: Comparación a las 48 horas: arándano azul 25%, 50%, 75%, clorhexidina al 0,12% y agua destilada

Tabla 12: Pruebas *post hoc* (Tukey) del extracto hidroalcohólico de arándano azul a las 48 horas

Comparaciones múltiples							
Variable dependiente: 48 horas							
HSD Tukey							
(I) SUSTANCIAS	(J) SUSTANCIAS	Diferencia de medias (I-J)	de	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Arándano azul 25%	Arándano azul 50%	-1,75		1,126	0,630	-5,02	1,52
	Arándano azul 75%	-6,300*		1,126	0,000	-9,57	-3,03
	Arándano azul 100%	-9,250*		1,126	0,000	-12,52	-5,98
	Clorhexidina al 0,12%	-21,286*		1,241	0,000	-24,89	-17,68
	Agua destilada	0		1,379	1,000	-4,01	4,01
Arándano azul 50%	Arándano azul 25%	1,75		1,126	0,630	-1,52	5,02
	Arándano azul 75%	-4,550*		1,126	0,001	-7,82	-1,28
	Arándano azul 100%	-7,500*		1,126	0,000	-10,77	-4,23
	Clorhexidina al 0,12%	-19,536*		1,241	0,000	-23,14	-15,93
	Agua destilada	1,75		1,379	0,801	-2,26	5,76
Arándano azul 75%	Arándano azul 25%	6,300*		1,126	0,000	3,03	9,57
	Arándano azul 50%	4,550*		1,126	0,001	1,28	7,82
	Arándano azul 100%	-2,95		1,126	0,102	-6,22	0,32
	Clorhexidina al 0,12%	-14,986*		1,241	0,000	-18,59	-11,38
	Agua destilada	6,300*		1,379	0,000	2,29	10,31
Arándano azul 100%	Arándano azul 25%	9,250*		1,126	0,000	5,98	12,52
	Arándano azul 50%	7,500*		1,126	0,000	4,23	10,77
	Arándano azul 75%	2,95		1,126	0,102	-0,32	6,22
	Clorhexidina al 0,12%	-12,036*		1,241	0,000	-15,64	-8,43
	Agua destilada	9,250*		1,379	0,000	5,24	13,26
Clorhexidina al 0,12%	Arándano azul 25%	21,286*		1,241	0,000	17,68	24,89
	Arándano azul 50%	19,536*		1,241	0,000	15,93	23,14
	Arándano azul 75%	14,986*		1,241	0,000	11,38	18,59
	Arándano azul 100%	12,036*		1,241	0,000	8,43	15,64
	Agua destilada	21,286*		1,474	0,000	17	25,57
Agua destilada	Arándano azul 25%	0		1,379	1,000	-4,01	4,01

	Arándano azul 50%	-1,75	1,379	0,801	-5,76	2,26
	Arándano azul 75%	-6,300*	1,379	0,000	-10,31	-2,29
	Arándano azul 100%	-9,250*	1,379	0,000	-13,26	-5,24
	Clorhexidina al 0,12%	-21,286*	1,474	0,000	-25,57	-17

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

En la prueba de Tukey, que compara dos a dos las sustancias se tiene que algunos de los valores del nivel de significación (Sig) son inferiores a 0,05, luego en esos casos las medias de las muestras no son similares, se tiene el siguiente cuadro resumen:

Subconjuntos homogéneos

Tabla 13: Turkey 48 horas

48 horas				
HSD Tukey				
SUSTANCIAS	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Arándano azul 25%	20	0,00		
Agua destilada	10	0,00		
Arándano azul 50%	20	1,75		
Arándano azul 75%	20		6,30	
Arándano azul 100%	20		9,25	
Clorhexidina al 0,12%	14			21,29
Sig.		0,729	0,183	1,000

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

Interpretación

A las 48 horas el extracto hidroalcohólico de arándano azul al 25% presentó una diferencia significativa con las concentraciones de 75%, 100% y clorhexidina al 0.12 %, ya que el valor de significación fue menor a 0,05.

A las 48 horas el extracto hidroalcohólico de arándano azul al 50% presentó una diferencia significativa con las concentraciones de 75%, 100% y clorhexidina al 0.12 %, ya que el valor de significación fue menor a 0,05.

A las horas el extracto hidroalcohólico de arándano azul al 75% presentó una diferencia significativa con las concentraciones de 25%, 50%, a la clorhexidina al 0,12% y al agua destilada, ya que el valor de significación fue menor a 0,05.

A las 48 horas el extracto hidroalcohólico de arándano azul al 100% presentó una diferencia significativa con las concentraciones de 25%, 50%, a la clorhexidina al 0,12% y al agua destilada, ya que el valor de significación fue menor a 0,05.

A las 48 horas la clorhexidina al 0.12 % presentó una diferencia significativa en su efecto inhibitorio con las concentraciones de extracto hidroalcohólico de arándano azul al 25 %, 50 %, 75 %, 100 % y agua destilada, ya que el valor de significación fue menor a 0,05.

A las 48 horas el agua destilada presentó una diferencia significativa con las concentraciones de extracto hidroalcohólico de arándano azul al 75 %, 100 % y clorhexidina al 0.12 %, ya que el valor de significación fue menor a 0,05.

2.3 TURKEY: Comparación a las 72 horas: arándano azul 25%, 50%, 75%, clorhexidina al 0,12% y agua destilada

Tabla 14: Pruebas *post hoc* (Tukey) del extracto hidroalcohólico de arándano azul a las 72 horas

Comparaciones múltiples
Variable dependiente: 72 horas
HSD Tukey

(I) SUSTANCIAS	(J) SUSTANCIAS	Diferencia de medias (I-J)	Desv . Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Arándano azul 25%	Arándano azul 50%	-0,5	1,059	0,997	-3,58	2,58
	Arándano azul 75%	-2,65	1,059	0,134	-5,73	0,43
	Arándano azul 100%	-7,700*	1,059	0,000	-10,78	-4,62
	Clorhexidina al 0,12%	-21,571*	1,167	0,000	-24,96	-18,18
	Agua destilada	0	1,297	1,000	-3,77	3,77
Arándano azul 50%	Arándano azul 25%	0,5	1,059	0,997	-2,58	3,58
	Arándano azul 75%	-2,15	1,059	0,333	-5,23	0,93
	Arándano azul 100%	-7,200*	1,059	0,000	-10,28	-4,12
	Clorhexidina al 0,12%	-21,071*	1,167	0,000	-24,46	-17,68
	Agua destilada	0,5	1,297	0,999	-3,27	4,27
Arándano azul 75%	Arándano azul 25%	2,65	1,059	0,134	-0,43	5,73
	Arándano azul 50%	2,15	1,059	0,333	-0,93	5,23
	Arándano azul 100%	-5,050*	1,059	0,000	-8,13	-1,97
	Clorhexidina al 0,12%	-18,921*	1,167	0,000	-22,31	-15,53
	Agua destilada	2,65	1,297	0,326	-1,12	6,42
Arándano azul 100%	Arándano azul 25%	7,700*	1,059	0,000	4,62	10,78
	Arándano azul 50%	7,200*	1,059	0,000	4,12	10,28
	Arándano azul 75%	5,050*	1,059	0,000	1,97	8,13
	Clorhexidina al 0,12%	-13,871*	1,167	0,000	-17,26	-10,48
	Agua destilada	7,700*	1,297	0,000	3,93	11,47
Clorhexidina al 0,12%	Arándano azul 25%	21,571*	1,167	0,000	18,18	24,96
	Arándano azul 50%	21,071*	1,167	0,000	17,68	24,46
	Arándano azul 75%	18,921*	1,167	0,000	15,53	22,31
	Arándano azul 100%	13,871*	1,167	0,000	10,48	17,26
	Agua destilada	21,571*	1,387	0,000	17,54	25,6
Agua destilada	Arándano azul 25%	0	1,297	1,000	-3,77	3,77
	Arándano azul 50%	-0,5	1,297	0,999	-4,27	3,27
	Arándano azul 75%	-2,65	1,297	0,326	-6,42	1,12
	Arándano azul 100%	-7,700*	1,297	0,000	-11,47	-3,93
	Clorhexidina al 0,12%	-21,571*	1,387	0,000	-25,6	-17,54

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

En la prueba de Tukey, que compara dos a dos las sustancias se tiene que algunos de los valores del nivel de significación (Sig) son inferiores a 0,05, luego en esos casos las medias de las muestras no son similares, se tiene el siguiente cuadro resumen:

Subconjuntos homogéneos

Tabla 15: Turkey 72 horas

72 horas				
HSD Tukey				
SUSTANCIAS	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Arándano azul 25%	20	0,00		
Agua destilada	10	0,00		
Arándano azul 50%	20	0,50		
Arándano azul 75%	20	2,65		
Arándano azul 100%	20		7,70	
Clorhexidina al 0,12%	14			21,57
Sig.		0,225	1,000	1,000

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

Interpretación

A las 72 horas el extracto hidroalcohólico de arándano azul al 25% presentó una diferencia significativa con las concentraciones de 100% y clorhexidina al 0.12 %, ya que el valor de significación fue menor a 0,05.

A las 72 horas el extracto hidroalcohólico de arándano azul al 50% presentó una diferencia significativa con las concentraciones de 100%, clorhexidina al 0.12 %, ya que el valor de significación fue menor a 0,05.

A las 72 horas el extracto hidroalcohólico de arándano azul al 75% presentó una diferencia significativa con las concentraciones de 100%, clorhexidina al 0.12 %, ya que el valor de significación fue menor a 0,05.

A las 72 horas el extracto hidroalcohólico de arándano azul al 100% presentó una diferencia significativa en su efecto inhibitorio con las concentraciones de extracto

hidroalcohólico de arándano azul al 25%, 50%, 75%, a la clorhexidina al 0,12% y al agua destilada, ya que el valor de significación fue menor a 0,05.

A las 72 horas la clorhexidina al 0.12 % presentó una diferencia significativa en su efecto inhibitorio con las concentraciones de extracto hidroalcohólico de arándano azul al 25 %, 50 %, 75 %, 100 % y agua destilada, ya que el valor de significación fue menor a 0,05.

A las 72 horas el agua destilada presentó una diferencia significativa con las concentraciones de extracto hidroalcohólico de arándano azul al 100 % y clorhexidina al 0.12 %, ya que el valor de significación fue menor a 0,05.

3 Prueba t student

3.1 Prueba *t student* del extracto hidroalcohólico de arándano azul al 25%

Tabla 16: Comparación entre las 24 horas – 48 horas – 72 horas arándano azul 25%

Estadísticas de muestras emparejadas				Prueba de muestras emparejadas			
TIEMPOS	Media	N	Desviación estándar	COMPARACIONES	t	gl	Sig. (bilateral)
24 horas	9,45	20	3,300	24 horas - 48 horas	12,81	19	0,000
48 horas	0,00	20	0,000	24 horas - 72 horas	12,81	19	0,000
72 horas	0,00	20	0,000	48 horas - 72 horas
48 horas - 72 horas: no se tiene cambios							

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

Existe una diferencia significativa en los efectos del extracto hidroalcohólico de arándano azul al 25% entre las 24 y 48 horas y 24 y 72 horas.

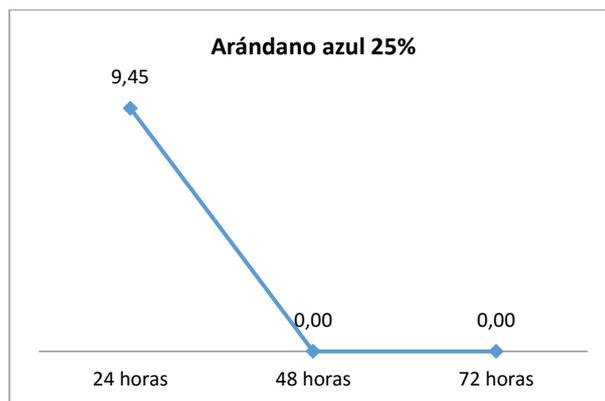


Gráfico Interpretativo 1: Prueba *t student* del extracto hidroalcohólico de arándano azul al 25 %

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

Interpretación

El extracto hidroalcohólico de arándano azul al 25% tiene un comportamiento decreciente entre los tiempos estudiados, a las 24 horas tiene una media de 9,45 mm, luego disminuye a las 48 horas a una media de 0,0 mm y esta es similar a la de 72 horas que tiene una media de 0,0 mm

3.2 Prueba *t student* del extracto hidroalcohólico de arándano azul al 50%.

Tabla 17: Comparación entre las 24 horas – 48 horas – 72 horas arándano azul 50%

Estadísticas de muestras emparejadas				Prueba de muestras emparejadas			
TIEMPOS	Media	N	Desviación estándar	COMPARACIONES	t	gl	Sig. (bilateral)
24 horas	4,65	20	5,294	24 horas - 48 horas	1,63	19	0,120
48 horas	1,75	20	4,278	24 horas - 72 horas	3,01	19	0,007
72 horas	0,50	20	2,236	48 horas - 72 horas	1,12	19	0,279

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

Existe una diferencia significativa en los efectos del extracto hidroalcohólico de arándano azul al 50% entre las 24 y 72 horas, mientras que no existe diferencia significativa entre las 24 y 48 horas y las 48 y 72 horas.

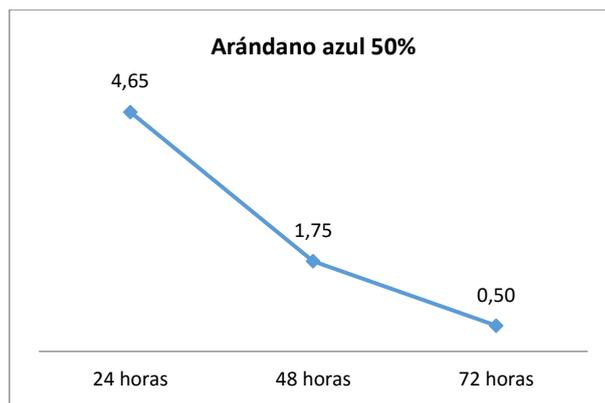


Gráfico Interpretativo 2: Prueba *t student* del extracto hidroalcohólico de arándano azul al 50 %

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

Interpretación

El extracto hidroalcohólico de arándano azul al 50% tiene también un comportamiento decreciente entre los tiempos estudiados, a las 24 horas tiene una media de 4,65 mm, luego disminuye a las 48 horas a una media de 1,75 mm y sigue decreciendo a las 72 horas con una media de 0,50 mm.

3.3 Prueba *t student* del extracto hidroalcohólico de arándano azul al 75%.

Tabla 18: Comparación entre las 24 horas – 48 horas – 72 horas arándano azul 75%

Estadísticas de muestras emparejadas				Prueba de muestras emparejadas			
TIEMPOS	Media	N	Desviación estándar	COMPARACIONES	t	gl	Sig. (bilateral)
24 horas	6,90	20	5,220	24 horas - 48 horas	0,37	19	0,719
48 horas	6,30	20	5,292	24 horas - 72 horas	2,17	19	0,043
72 horas	2,65	20	4,716	48 horas - 72 horas	3,26	19	0,004

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

Existe una diferencia significativa en los efectos del extracto hidroalcohólico de arándano azul al 75% entre las 24 y 72 horas y las 48 y 72 horas, mientras que no existe diferencia significativa entre las 24 y 48 horas.

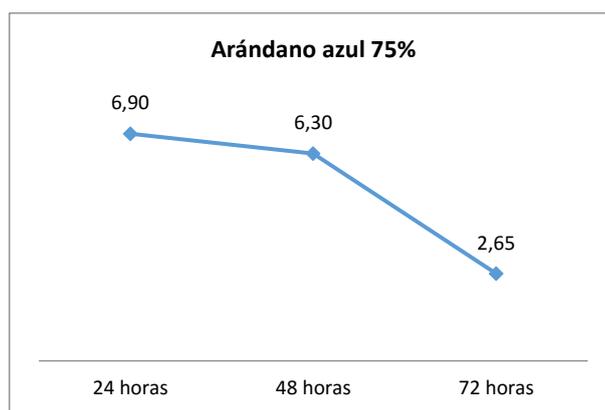


Gráfico Interpretativo 3: Prueba *t student* del extracto hidroalcohólico de arándano azul al 75 %

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

Interpretación

El extracto hidroalcohólico de arándano azul al 75% tiene también un comportamiento decreciente entre los tiempos estudiados, a las 24 horas tiene una media de 6,90 mm, luego disminuye levemente a las 48 horas a una media de 6,30 mm y sigue decreciendo a las 72 horas con una media de 2,65 mm.

3.4 Prueba *t student* del extracto hidroalcohólico de arándano azul al 100%.

Tabla 19: Comparación entre las 24 horas – 48 horas – 72 horas arándano azul 100%

Estadísticas de muestras emparejadas				Prueba de muestras emparejadas			
TIEMPOS	Media	N	Desviación estándar	COMPARACIONES	t	gl	Sig. (bilateral)
24 horas	7,50	20	5,166	24 horas - 48 horas	-1,69	19	0,108
48 horas	9,25	20	4,241	24 horas - 72 horas	-0,14	19	0,894
72 horas	7,70	20	5,449	48 horas - 72 horas	1,86	19	0,079

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

No existe diferencia significativa en el efecto del extracto hidroalcohólico de arándano azul al 100% entre ninguno de los tiempos preestablecidos.

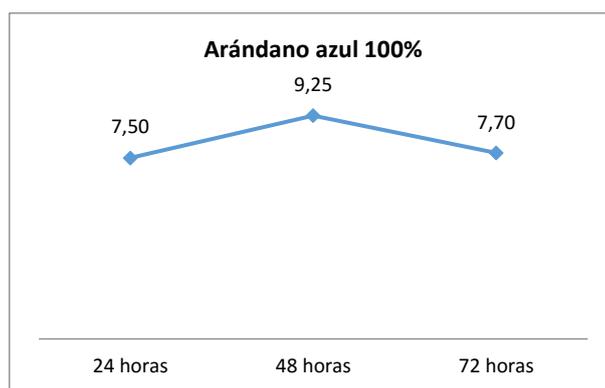


Gráfico Interpretativo 4: Prueba *t student* del extracto hidroalcohólico de arándano azul al 100 %

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

Interpretación

El extracto hidroalcohólico de arándano azul al 100% tiene un comportamiento creciente - decreciente entre los tiempos estudiados, a las 24 horas tiene una media de 7,50 mm, luego crece levemente a las 48 horas a una media de 9,25 mm y sigue decreciendo a las 72 horas con una media de 7,70 mm.

3.5 Prueba *t student* de la clorhexidina al 0,12%.

Tabla 20: Comparación entre las 24 horas – 48 horas – 72 horas clorhexidina al 0,12%

Estadísticas de muestras emparejadas				Prueba de muestras emparejadas			
TIEMPOS	Media	N	Desviación estándar	COMPARACIONES	t	gl	Sig. (bilateral)
24 horas	19,57	14	1,604	24 horas - 48 horas	-2,75	13	0,017
48 horas	21,29	14	1,267	24 horas - 72 horas	-5,10	13	0,000
72 horas	21,57	14	1,158	48 horas - 72 horas	-0,74	13	0,470

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

Existe una diferencia significativa en los efectos de la clorhexidina al 0.12% entre las 24 y 48 horas y las 24 y 72 horas, mientras que no existe diferencia significativa entre las 48 y 72 horas.

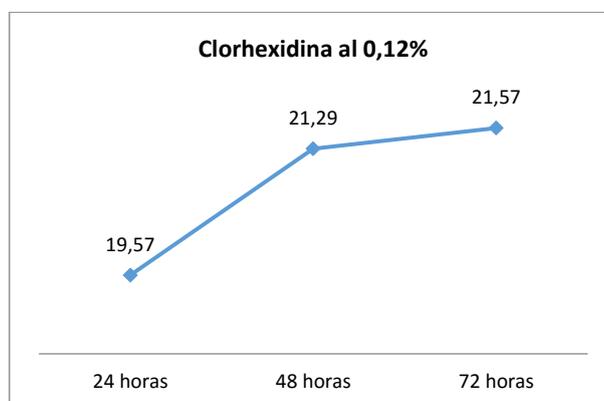


Gráfico Interpretativo 5: Prueba *t student* de clorhexidina al 0,12%

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

Interpretación

La clorhexidina al 0,12% tiene un comportamiento creciente entre los tiempos estudiados, a las 24 horas tiene una media de 19,57 mm, luego crece a las 48 horas a una media de 21,29 mm y sigue creciendo levemente a las 72 horas con una media de 21,57 mm.

3.6 Prueba *t student* del agua destilada.

Tabla 21: Comparación entre las 24 horas – 48 horas – 72 horas clorhexidina al 0,12%

Estadísticas de muestras emparejadas				Prueba de muestras emparejadas			
TIEMPOS	Media	N	Desviación estándar	COMPARACIONES	t	gl	Sig. (bilateral)
24 horas	19,57	10	0,000	24 horas - 48 horas
48 horas	21,29	10	0,000	24 horas - 72 horas
72 horas	21,57	10	0,000	48 horas - 72 horas
No se tiene cambios entre los tiempos							

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

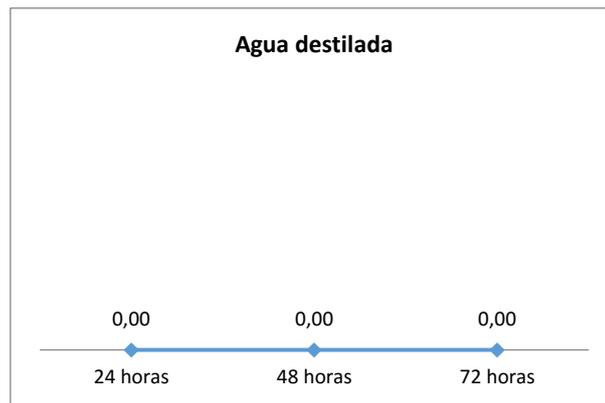


Gráfico Interpretativo 6: Prueba *t student* del agua destilada.

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

Interpretación

El agua destilada tiene un comportamiento estable entre los tiempos estudiados, a las 24 horas tiene una media de 0,0 mm, luego se mantiene a las 48 horas con una media de 0,0 mm y se mantiene a las 72 horas con una media de 0,0 mm.

4 Prueba chi-cuadrada de Pearson

4.1 Prueba chi-cuadrada de Pearson de sustancias a las 24 horas

Tabla 22: Sensibilidad de las sustancias a las 24 horas

SENSIBILIDAD	Arándano azul								Clorhexidina al 0,12%		Agua destilada		Total	
	25%		50%		75%		100%		Cant	%	Cant	%	Cant	%
	Cant	%	Cant	%	Cant	%	Cant	%						
Nulo (-)	2	10,0%	11	55,0%	7	35,0%	6	30,0%	0	0,0%	10	100,0%	36	34,6%
Sensible (o+)	18	90,0%	9	45,0%	13	65,0%	13	65,0%	0	0,0%	0	0,0%	53	51,0%
Muy sensible (o++)	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	5,0%	7	50,0%	0	0,0%	8	7,7%
Sumamente sensible (o+++)	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	7	50,0%	0	0,0%	7	6,7%
Total	20	100%	20	100%	0 ²	100%	20	100%	14	100%	10	100%	104	100%

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

Tabla 23: Prueba chi-cuadrada de Pearson sustancias a las 24 horas

Pruebas de Chi-cuadrado			
	Valor	gl	Sig. asintótica (2 caras)
Chi-cuadrado de Pearson	126,27	15	0,000

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

Interpretación

En la prueba Chi cuadrado de Pearson el valor del nivel de significación (Sig. asintótica (2 caras) = 0,000) es inferior a 0,05, por tanto los porcentajes entre cada una de las concentraciones NO son similares con relación a los niveles de Sensibilidad.

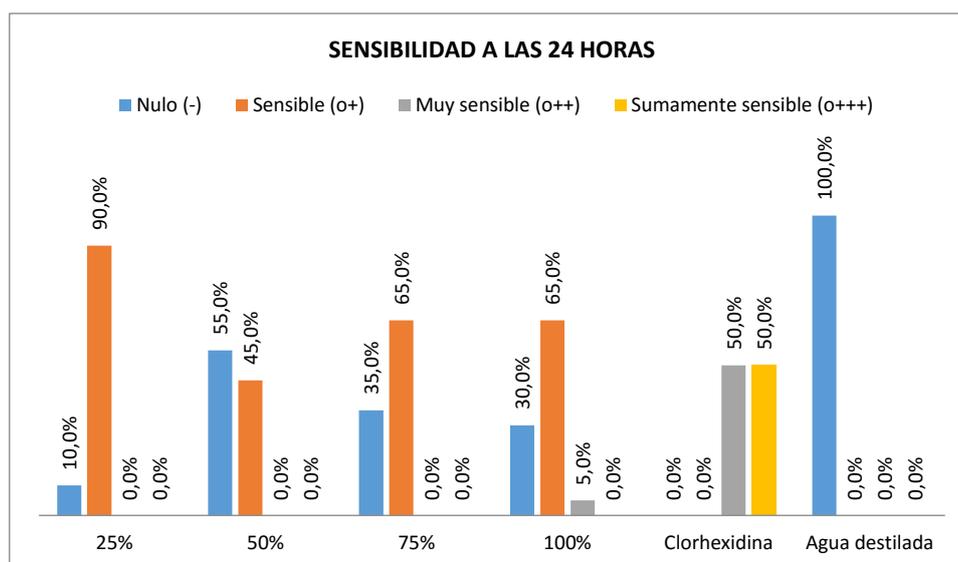


Gráfico Estadístico 4: Sensibilidad a las 24 horas

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

4.2 Prueba chi-cuadrada de Pearson de sustancias a las 48 horas

Tabla 24: Sensibilidad de las sustancias a las 48 horas

SENSIBILIDAD	Arándano azul								Clorhexidina al 0,12%	Agua destilada	Total			
	25%		50%		75%		100%							
	Cant	%	Cant	%	Cant	%	Cant	%						
Nulo (-)	20	100,0%	17	85,0%	8	40,0%	3	15,0%	0	0,0%	10	100,0%	58	55,8%

Sensible (o+)	0	0,0%	3	15,0%	12	60,0%	16	80,0%	0	0,0%	0	0,0%	31	29,8%
Muy sensible (o++)	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	5,0%	1	7,1%	0	0,0%	2	1,9%
Sumamente sensible (o+++)	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	13	92,9%	0	0,0%	13	12,5%
Total	20	100%	20	100%	20	100%	20	100%	14	100%	10	100%	104	100%

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

Tabla 25: Prueba chi-cuadrada de Pearson sustancias a las 48 horas

Pruebas de Chi-cuadrado			
	Valor	gl	Sig. asintótica (2 caras)
Chi-cuadrado de Pearson	153,74	15	0,000

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

Interpretación

En la prueba Chi cuadrado de Pearson el valor del nivel de significación (Sig. asintótica (2 caras) = 0,000) es inferior a 0,05, por tanto los porcentajes entre cada una de las concentraciones NO son similares con relación a los niveles de Sensibilidad.

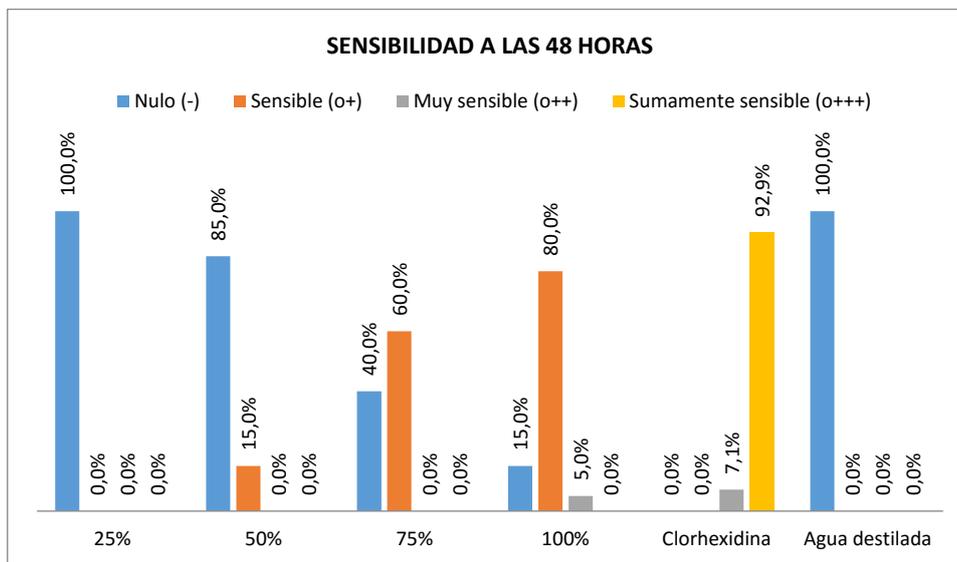


Gráfico Estadístico 5: Sensibilidad a las 48 horas

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

4.3 Prueba chi-cuadrada de Pearson de sustancias a las 72 horas

Tabla 26: Sensibilidad de las sustancias a las 72 horas

SENSIBILIDAD	Arándano azul								Clorhexidina al 0,12%		Agua destilada		Total	
	25%		50%		75%		100%		Cant	%	Cant	%	Cant	%
	Cant	%	Cant	%	Cant	%	Cant	%						
Nulo (-)	20	100,0%	19	95,0%	15	75,0%	6	30,0%	0	0,0%	10	100,0%	70	67,3%
Sensible (o+)	0	0,0%	1	5,0%	5	25,0%	12	60,0%	0	0,0%	0	0,0%	18	17,3%
Muy sensible (o++)	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	2	10,0%	0	0,0%	0	0,0%	2	1,9%
Sumamente sensible (o+++)	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	14	100,0%	0	0,0%	14	13,5%
Total	20	100%	20	100%	20	100%	20	100%	14	100%	10	100%	104	100%

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

Tabla 27: Prueba chi-cuadrada de Pearson sustancias a las 72 horas

Pruebas de Chi-cuadrado			
	Valor	gl	Sig. asintótica (2 caras)
Chi-cuadrado de Pearson	150,288	15	0,000

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

Interpretación

En la prueba Chi cuadrado de Pearson el valor del nivel de significación (Sig. asintótica (2 caras) = 0,000) es inferior a 0,05, por tanto los porcentajes entre cada una de las concentraciones NO son similares con relación a los niveles de Sensibilidad.

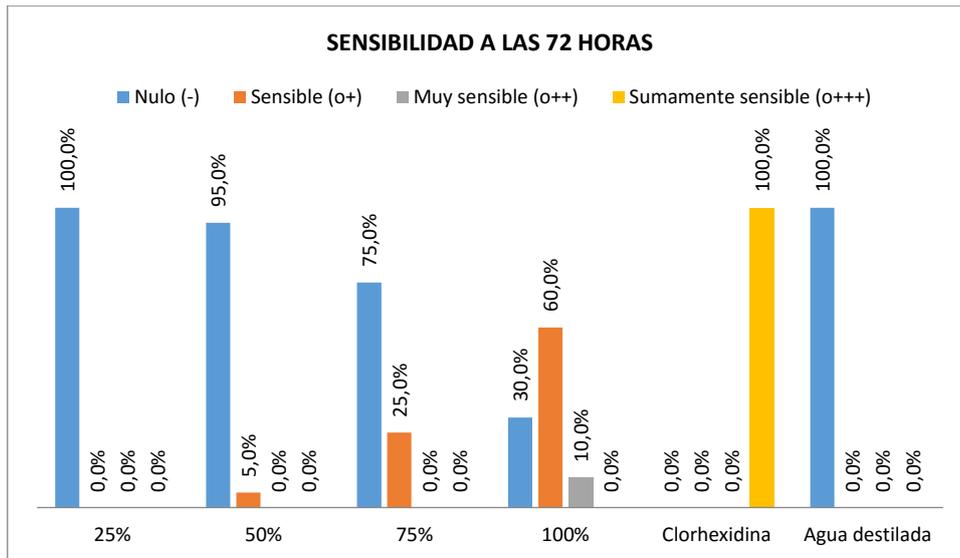


Gráfico Estadístico 6: Sensibilidad a las 72 horas

Fuente: Ing. Jaime Reinaldo Molina

Discusión

El consumo de arándano azul (*Vaccinium corymbosum*), es diario y rutinario de muchas personas en todo el planeta ya que es de fácil adquisición por ser el tipo de arándano más cultivado a nivel global y posee un exquisito sabor, es una fruta muy nutritiva y es alta fuente de compuestos fenólicos los cuales son reconocidos por varios estudios por tener un excelente efecto antioxidante, lo cual es beneficioso para la salud humana.

El arándano azul es conocido como la súper fruta del siglo XXI ya que tiene diferentes usos beneficiosos para la salud como por ejemplo para combatir la diabetes, como antibiótico y antiinflamatorio, también como antidiarreico, ayuda a los problemas de visión y su consumo está asociado como medio de prevención de ciertos tipos de cáncer (Basu, Rhone, & Lyons, 2010).

Existe escases significativa de estudios investigativos sobre los efectos beneficiosos del arándano azul en el campo de la odontología, por este motivo junto con el previo conocimiento de todas sus propiedades beneficiosas para la salud específicamente con las propiedades antibiótica y antiinflamatoria, se procedió a realizar el trabajo investigativo in vitro con el fin de determinar la propiedad inhibitoria del extracto hidroalcohólico de arándano azul (*Vaccinium corymbosum*) a diferentes concentraciones (25%, 50%, 75% y 100%) frente al periodontopatógeno *Fusobacterium nucleatum*, la misma que pudo ser demostrada en este estudio. Esta propiedad puede ser el resultado de la capacidad de los polifenoles de arándanos para quelar el hierro (Ben Lagha, Dudonné, Desjardins, & Greiner, 2015).

Se consigue el efecto inhibitorio cuando se forma un halo de inhibición claramente observable alrededor del papel filtro embebido en el extracto hidroalcohólico de arándano

azul el cual puede ser medido en su diámetro y va a variar en las diferentes concentraciones y tiempos preestablecidos.

La escases en estudios investigativos y experimentales similares a este es notable ya que es un tema de actualidad pero cabe recalcar que existen estudios asociados al tema, como el de Ben Lagha, Dudonné, Desjardins, y Greiner en 2015 el cual extracto de arandano azul muestra la capacidad antibacterial e inhibitora de la actividad del biofilm contra el periodontopatogeno *Fusobacterium nucleatum*, en adición, también se evidencia la disminución de citocinas proinflamatorias y metaloproteinasas estimuladas por la virulencia de *Fusobacterium nucleatum* (Ben Lagha, Dudonné, Desjardins, & Greiner, 2015).

Un estudio realizado por Lacombe, Wu, White, Tadepalli, y Enroe en 2012 reportó una actividad antimicrobiana del extracto de arándano azul, se identificaron los componentes fenólicos en el arándano azul como el principal componente antimicrobiano (Lacombe, Wu, White, Tadepalli, & Enroe, 2012).

La antocianina, considerada el flavonoide más abundante en los arándanos, Cassidy menciona en un estudio realizado en 2018 que el arándano azul (*Vaccinium corymbosum*) presenta una cantidad y diversidad significativamente mayor de antocianinas (Cassidy, 2018), también ha demostrado que un aumento en la ingesta dietética de antocianinas (de 3 a 24 mg / día) se asocia significativamente con una reducción del 12-32% en el riesgo de enfermedad coronaria. Cassidy y otros en otro estudio de 2016 demostraron que, por cada aumento de 15 mg en el consumo de antocianinas, el riesgo relativo de infarto de miocardio disminuye en un 17% (Cassidy, y otros, 2016).

Cerezo, y otros, en un estudio experimental in vitro mencionan que extractos de arándano azul fueron sorprendentemente efectivos contra la cepa de *P. aeruginosa*, mostrando un posible nuevo enfoque en el esfuerzo por buscar nuevas medidas para controlar algunas cepas de bacterias presentes en la infección del tracto urinario, resistentes a antibióticos. También se comprobó la capacidad antibacteriana de los arándanos azules contra *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia stuartii* y *Micrococcus spp*, cepas aisladas de infección del tracto urinario (Cerezo, y otros, 2020).

Conclusiones

El extracto hidroalcohólico de arándano azul (*Vaccinium corymbosum*) presenta un grado de inhibición en todas sus concentraciones: 25 %, 50 %, 75 % y 100 % frente al periodontopatógeno *Fusobacterium nucleatum ATCC® 25586™*.

El extracto hidroalcohólico de arándano azul (*Vaccinium corymbosum*) al 25% obtuvo el mejor resultado en cuanto a medida de inhibición de 9,45 mm a las 24 horas, seguido por el extracto al 100% con una media de inhibición de 9,25mm a las 48 horas frente al periodontopatógeno *Fusobacterium nucleatum ATCC® 25586™*.

El extracto hidroalcohólico de arándano azul (*Vaccinium corymbosum*) al 25% a las 24 horas fue el que mayor media de efecto inhibitorio obtuvo, mientras que a las 48 y 72 horas fue el que menos tuvo, con un efecto inhibitorio nulo.

El extracto hidroalcohólico de arándano azul (*Vaccinium corymbosum*) al 100% fue el que dio mejores resultados en cuanto a duración de su efecto inhibitorio frente al periodontopatógeno *Fusobacterium nucleatum ATCC® 25586™*, ya que a las 24 horas presento una media inicial de 7,5 mm, a las 48 horas alcanza su pico de 9,25 mm y a las 72 horas disminuye a 7,70 mm.

El extracto hidroalcohólico de arándano azul (*Vaccinium corymbosum*) al 75% tiene comportamiento decreciente en su efecto inhibitorio frente al periodontopatógeno *Fusobacterium nucleatum ATCC® 25586™*, presentando medias en halos de inhibición a las 24 horas de 6,90 mm, a las 48 horas de 6,30 mm y las 72 horas de 2,65 mm.

El extracto hidroalcohólico de arándano azul (*Vaccinium corymbosum*) al 50% tiene comportamiento decreciente en su efecto inhibitorio frente al periodontopatógeno *Fusobacterium nucleatum ATCC® 25586™*, presentando medias en halos de inhibición a las 24 horas de 4,61 mm, a las 48 horas de 1,75 mm y las 72 horas de 0,5 mm.

El extracto hidroalcohólico de arándano azul (*Vaccinium corymbosum*) en todas sus concentraciones 25 %, 50 %, 75 % y 100 %, según la escala de sensibilidad de Duraffourd es sensible, cabe mencionar que el extracto a concentración del 100% fue el único que presentó resultados de muy sensible según la escala de Duraffourd, sin superar a la clorhexidina al 0,12% que obtuvo resultados de sumamente sensible.

El control positivo realizado con clorhexidina al 0,12% presentó los mejores resultados de inhibición frente al periodontopatógeno *Fusobacterium nucleatum ATCC® 25586™*, obtuvo su media más alta de 21,57 mm a las 72 horas.

El control negativo realizado con agua estéril, presentó un grado de inhibición nulo en todos los tiempos establecidos y en el total de las muestras frente al periodontopatógeno *Fusobacterium nucleatum ATCC® 25586™*.

Recomendaciones

Hacer estudios sobre el efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico de arándano azul frente a otras especies de periodontopatógenos.

Incentivar el consumo de jugo de arándano azul en la dieta diaria y utilizarlo también como complemento al tratamiento para pacientes con enfermedad periodontal.

Hacer estudios sobre el efecto inhibitorio de otras especies de arándanos ya que poseen grandes cantidades de compuestos fenólicos que tienen gran capacidad antimicrobiana y antocianinas que tienen gran capacidad antioxidante.

Bibliografía

- Afra, K., Laupland, K., Leal, J., Lloyd, T., & Gregson, D. (2013). Incidence, risk factors, and outcomes of Fusobacterium species bacteremia. *BMC Infect Dis.*, 264.
- Ainamo, J., & Talari, A. (1976). The increase with age of the width of attached gingiva. *J Periodontal Res*, 182-188.
- Albandar, J. M., Susin, C., & Hughes, F. J. (2018). Manifestations of systemic diseases and conditions that affect the periodontal attachment apparatus: Case definitions and diagnostic considerations. *Journal of Clinical Periodontology*, S171-S189.
- Ardila Medina, C. M. (2009). Recesión gingival: una revisión de su etiología, patogénesis y tratamiento. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*, 35-43.
- Arias Herrera, S., Carbajo, G., & Bascones Martínez, A. (2016). Surgical treatment of furcation involvement lesions. *Av Periodon Implantol*, 89-95.
- Arias, F. G. (2012). *El proyecto de investigación: Introducción a la metodología científica*. Caracas: EPISTEME.
- Avello L, M., & Cisternas F, I. (2010). Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Revista Médica de Chile*, 1288-1293.
- Bascones Martínez, A., Mudarra Morante, S., & Perea Pérez, E. (2002). Antisépticos en el tratamiento de la enfermedad periodontal. *Av Periodon Implantol*, 101-114.
- Bascones, A., & Morante, S. (2006). Antisépticos orales. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*, 31-59.
- Basu, A., Masek, E., & Ebersole, J. L. (2018). Dietary Polyphenols and Periodontitis. *Molecules*.

- Basu, A., Rhone, M., & Lyons, T. J. (2010). Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutrition Reviews*® Vol. 68, 168-177.
- Ben Lagha, A., Dudonné, S., Desjardins, Y., & Greiner, D. (2015). Wild blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) polyphenols target *Fusobacterium nucleatum* and the host inflammatory response Potential innovate molecules for treating periodontal disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 6999-7008.
- Bolstad, A. I., Jensen, H. B., & Bakken, V. (1996). Taxonomy, Biology, and Periodontal Aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clinical Microbiology reviews*, 55-71.
- Botero, J., & Bedoya, E. (2010). Determinantes del Diagnóstico Periodontal. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil*, 94-99.
- Buzeta P, A. (1997). *Chile: berries para el 2000*. Santiago de Chile: Fundación Chile. Departamento Agroindustrial.
- Carvajal, P. (2016). Enfermedades periodontales como un problema de salud publica: el desafío del nivel primario de atención en salud. *Revista clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*.
- Cassidy, A. (2018). Berry anthocyanin intake and cardiovascular health. *Mol Aspects Med*, 76-82.
- Cassidy, A., Bertoia, M., Chiuve, S., Flint , A., Forman, J., & Rimm, E. B. (2016). Habitual intake of anthocyanins and flavanones and risk of cardiovascular disease in men. *Am. J. Clin. Nutr*, 587-594.
- Castro , Y., & Grados , S. (2014). Porcine collagen matrix for treating gingival recession. Randomized clinical trial. *J Oral Res*, 3, 23-28.

- Cerezo, A. B., Catunescu, G. M., Martínez, M., Hornedo Ortega, R., Pop, C. R., Rusu, C. C., . . . Troncoso, A. M. (2020). Anthocyanins in Blueberries Grown in Hot Climate Exert Strong Antioxidant Activity and may be Effective against Urinary Tract Bacteria. *MDPI*, 9,478.
- Chambrone, L., Sukekava, F., & Araujo, M. (2010). Root coverage procedures for treatment of localized recession type defects-A Cochrane systematic review. *Journal of Periodontology*, 452-478.
- Chapple I, L. C., Mealey, B. L., & van Dyke, T. E. (2018). Consensus report: Periodontal health and gingival diseases/conditions. *Journal of Clinical Periodontology*, S68-S77.
- China Meneses, E. M., de la Rosa Samper, H., & Morales Aguiar, D. R. (2006). Etiología y patogenia de las enfermedades periodontales agudas y crónicas. *Compendio de periodoncia*, 55-166.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*, 711-745.
- Cronquist, A. (1981). An Integrated system of clasification of flowering plants. *US, University Press*, 1262.
- Cugini, M. A., Haffajee, A. D., Smith , C., Kent Jr, R. L., & Socransky, S. S. (2000). The effect of scaling and root planing on the clinical and microbiological parameters in periodontal diseases:12-month results. *Journal of Clinical Periodontology*, 27:30-36.
- Dzink, J. L., Sheenan, M. T., & Socransky, S. S. (1990). Proposal of three subspecies of *Fusobacterium nucleatum* Knorr 1922: *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* subsp.; *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum* subsp. and *Fusobacterium nucleatum* subsp. *vincentii* subsp. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 40:74-78.

- Eley, B. M., Soory, M., & Manson, J. D. (2011). In *Periodoncia 6 ed.* © 2011 (pp. 9-15). Elsevier España, 2012.
- Escudero Castaño , N., Perea García , M. A., & Bascones Marínez, A. (2008). Revisión de la periodontitis crónica: Evolución y su aplicación clínica. *Avances en periodoncia*, 27-37.
- Finlay, B. B., & Cossart , P. (1997). Exploration of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* , 718-725.
- González Montalvo, M. A., & González González, G. M. (2019). Fimbrias bacterianas, nanoestructuras versátiles. *Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Autónoma de Nuevo León*.
- Greenstein, G. (2005). Current interpretations of periodontal probing evaluations: diagnostic and therapeutic implications. *Compend Contin Educ Dent.*, 381-390.
- Guilarte, C., & Perrone, M. (2005). Bacterias periodontopatógenas: bacilos anaerobios gram negativos como agentes etiológicos de la enfermedad periodontal. *Acta odontológica Venezolana*.
- Han, Y. W., Fardini, Y., Chen, C., Iacampo, K. G., Peraino, V. A., & Shamonki, J. M. (2010). Term Stillbirth Caused by Oral Fusobacterium nucleatum. *Obstet Gynecol*, 425-442.
- Han, Y. W., Shi, W., Huang, G. T., Kinders, H. S., Park, N. H., & Kuramitsu, H. (2000). Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells. *Infect Immun* , 3140-3146.
- Herrera, D., Figuero , E., Shapira, L., Jin, L., & Sanz, M. (2018). La nueva clasificación de las enfermedades periodontales y periimplantarias. *Revista científica de la Sociedad Española de Periodoncia*, 94-110.

- Herrera, D., Retamal-Valdes, B., Alonso, B., & Feres, M. (2018). Acute periodontal lesions (periodontal abscesses and necrotizing periodontal diseases) and endo-periodontal lesions. *Journal of Clinical Periodontology*, 78-94.
- Holmstrup, P., Plemons, J., & Meyle, J. (2018). Non-plaque induced gingival diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, S28-S43.
- Ikeda Artacho, M. C., & Mori Arambulo, G. (2010). Defectos de furcación. Etiología, diagnóstico y tratamiento. *Rev Estomatol Herediana*, 172-178.
- Jepsen, S., Caton, L., & Albandar, J. (2018). Consensus Report: Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions. *Journal of Clinical Periodontology*, 219-229.
- Lacombe, A., Wu, V. C., White, J., Tadepalli, S., & Enroe, A. (2012). Te antimicrobial properties of the lowbush blueberryfractional components against foodbornene pathogens and the conservation of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* . *Food Microbiology*, 30,124-131.
- Lang, N. P., & Bartold, P. M. (2018). Periodontal Health. *Journal of Periodontology*, S9-S16.
- Lang, N. P., Cumming, B. R., & Löe, H. (1973). Toothbrushing frequency as it relates to plaque development and gingival health. *Journal of Periodontology*, 44:396-405.
- Lang, N. P., Mombelli, A., & Attström, R. (2008). Oral biofilms and calculus. In *Clinical Periodontology and Implant Dentistry* (pp. 183-203). Oxford: Blackwell Munksgaard.
- Lang, N. P., Nyman , S., Senn, C., & Joss, A. (1991). Bleeding on probing as it relates to probing pressure and gingival health. *J Clin Periodontol*, 257-261.
- Loera Muro, A., Ramírez Castillo, F. Y., Avelar González, F. J., & Guerrero Barrera, A. L. (2012). Biopelículas multi-especie: asociarse para sobrevivir. *Invest Cienc*.

- Marsh, P. D. (1997). Physiological approaches to the control of oral biofilms. *Adv Dent Res*, 11:176-85.
- Martínez Martínez, A. C., Llerena, M. E., & Peñaherrera-Manosalva, M. S. (2017). Prevalencia de enfermedad periodontal y factores de riesgo asociados . *Dominio de las Ciencias*, 99-108.
- Meyer, D. H., Mintz, K. P., & Fives-Taylor, P. M. (1997). Models of invasion of enteric and periodontal pathogens into epithelial cells: a comparative analysis. *Crit Rev Oral Biol Med Off Publ Am Assoc Oral Biol*, 389-409.
- Moore, W. E., & Moore, L. V. (1994). The bacteria of periodontal diseases. *Periodontology* 2000, 66-77.
- Negróni, M. (2018). *Microbiología Estomatológica 3° Edición*. Buenos Aires: EDITORIAL MEDICA PANAMERICANA S.A.C.F.
- Newman, & Carranza. (2019). *Newman and Carranza's Clinical Periodontology, Thirteenth Edition*.
- Offenbacher, S. P., Barros, S. P., Singer, R. E., Moss, K., Williams, R. C., & Beck, J. D. (2007). Periodontal disease at the biofilm-gingival interface. *Journal Periodontology*, 1911-1925.
- Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., & Fine, D. H. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Clinical Periodontology*, S162-70.
- Paster, Boches, Galvin, Ericson, Lau, Levanos, . . . Dewhirst. (2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacterial*, 3770-3783.

- Prior, R. L., Cao, G. H., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., & O'Brien, C. (1998). Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity,. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, 2686-2693.
- Rodríguez Suárez, S., & González Ramos, R. M. (2013). La medicina natural y tradicional como alternativa de tratamiento en consulta urgencias estomatológicas. *Revista de Ciencias Médicas de La Habana*, 19.
- Rojas Ochoa, F. (2013). En defensa de una medicina natural y tradicional avalada. *Revista Cubana de Salud Pública*, 623-626.
- Romero Hurtado, S., & Iregui, C. A. (2010). El lipopolisacárido. *Rev. Med. Vet.*, 37-45.
- Salvi, G. E., Lindhe, J., & Lang, N. P. (2008). Clinical Periodontology. In J. Lindhe, N. P. Lang, & T. Karring, *Clinical Periodontology and Implant Dentistry* (pp. 573-586). Oxford UK: Blackwell-Munksgaard .
- Sánchez Puetate, J. C., de Carvalho, G. G., & Spin, J. R. (2018). Nueva Clasificación sobre las Enfermedades y Condiciones Periodontales y Peri-implantares: Una breve reseña. *Odontología Vol.20 (2)*, 69-90.
- Serrano Cuenca, V., & Noguerol Rodríguez, B. (2004). Prevención y mantenimiento en la patología periodontal y periimplantaria. *Av Periodon Implantol.*, 65-79.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., & Kent, R. L. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 25:134-144.
- Stone, S. J., Heasman, P. A., Staines, K. S., & McCracken, G. I. (2015). The impact of structured plaque control for patients with gingival manifestations of oral lichen planus: A randomized controlled study. *Journal of Clinical Periodontology*, 356-362.

- Suvan , J. (2005). Effectiveness of mechanical nonsurgical pocket therapy. *Periodontology* 2000, 48-71.
- Takahashi, N. (2015). Oral microbiome Metabolism: From “Who are They?” to “Who are They Doing?”. *J Dent Res.*, 1628-1637.
- Talari, A., & Ainamo, J. (1976). Orthopantomographic assessment of the width of attached gingiva. *J Periodontal Res*, 177-181.
- Tonetti, M. S., Greenwell, H., & Kornman, K. S. (2018). Periodontitis case definition: Framework for staging and grading the individual periodontitis case. *Journal of Clinical Periodontology*, S149-S161.
- Toto, P. D., & Gargiulo, A. W. (1970). Epithelial and connective tissue changes in periodontitis. *J Periodontol*, 587-590.
- Weinberg, M. A., & Eskow, R. N. (2003). Periodontal terminology revisited. *Journal of Periodontology*, 563-565.
- Zerón y Gutiérrez de Velasco, A., & Porrás Lira, D. (2016). Fusobacterium nucleatum ¿Un patógeno periodontal promotor de carcinogénesis colorrectal? *Revista ADM*, 280-285.

ANEXO 1: Certificado de adquisición de la fruta

Quito 16 de enero del 2019



CERTIFICADO

Se certifica que Ecuarándano es una empresa Ecuatoriana enfocada en la producción y comercialización de arándano fresco. Propagadas bajo cultivo in vitro y desarrolladas con la más alta calidad de manejo fitosanitario. Los estudiantes **ESTEBAN ALEJANDRO IZURIETA CABRERA** con número de cédula **1803181708** y **ANTONIO SEBASTIAN FLORES TAPIA** con número de cédula **1720037645** utilizarán los productos que produce y comercializa esta empresa para el trabajo de titulación para la obtención del título de Odontólogos.

Ing. Patricio Ñacato

Propietario

1708247323

Dirección: Calle Venezuela s/n y Vifedós. Sangolquí - Ecuador



ANEXO 2: Certificado de autenticidad de la bacteria *Fusobacterium nucleatum*



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum Catalog Number: 0328 Lot Number: 328-83** Reference Number: ATCC® 25586™* Purity: Pure Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2020/8/31 Release Information: Quality Control Technologist: Kieshia L. Negen Release Date: 2018/9/26
---	---

Performance	
Macroscopic Features: Small, white to gray, circular to slightly irregular, convex, granular to smooth	Medium: A/R SBAP
Microscopic Features: Gram negative rod having tapered to pointed ends and often with central swelling	Method: Gram Stain (1)

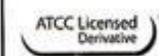
ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results Esculin (Agar) Hydrolysis: negative  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE
---	--

**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.



MEDIBAC-INCSA,
 Distribuidor para el Ecuador de
MICROBIOLOGICS
 Registro Sanitario AD-541-04-13

(*) 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.

ANEXO 3: Factura de adquisición de la cepa *Fusobacterium nucleatum* ATCC® 25586™



CLAVE DE ACCESO



2805201901099240149400120020020000014590000007212

MEDIBAC INC SA
 Dir Matriz: AV LAS AGUAS 1111 ENTRE JIGUAS Y LAURELES- UR
 Telf. 042881414
 Dir Sucursal: AA
 OBLIGADO A LLEVAR CONTABILIDAD SI

R.U.C.: 0992401494001
 FACTURA
 No. 002-002-000001459
 NÚMERO DE AUTORIZACIÓN
 2805201901099240149400120020020000014590000007212
 FECHA Y HORA DE AUTORIZACIÓN
 AMBIENTE: PRODUCCION
 EMISIÓN: NORMAL

Razón Social: FLORES TAPIA ANTONIO SEBASTIAN RUC / CI: 1720037645
 Fecha Emisión: 28/05/2019 Fecha Vencimiento: 29/05/2019

Cod. Principal	Cant	Descripción	Lotes	Precio Unitario	Precio Total
0328P	1	FUSOBACTERIUM NUCLEATUM SUBSP ATCC 25586		180,54	180,54

Información Adicional
 Dirección URB. TERRANOVA CALLE ORION, CASA # 9 Y SATURNO
 Email
 Teléfono 0989609932 Vendedor CARMITA PAZMIÑO
 Otros 1 OTROS Otros 2
 O/P 31635 Otros 3
 Usuario ANDREA AYALA Creación 28/05/2019 11:44:38

SUBTOTAL 12%	180,54
SUBTOTAL 0%	0,00
SUBTOTAL No sujeto de IVA	0,00
SUBTOTAL SIN IMPUESTOS	180,54
DESCUENTO %	0,00
ICE	0,00
IVA 12%	21,66
PROPINA	0,00
VALOR TOTAL	202,20

Forma Pago	monto
OTROS CON UTILIZACION DEL	202,20