

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA

FACULTAD DE ODONTOLOGIA



**“EFICACIA IN VITRO DEL EXTRACTO DE BLUEBERRY EN CEPAS
CERTIFICADAS DE PORPHYROMONAS GINGIVALIS EN LOS LABORATORIOS
CLINICOS DE LA UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA, AREQUIPA
2013”**

TESIS PRESENTADA POR:

La Bachiller FlordelizLideny Pastor Aguilar

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE

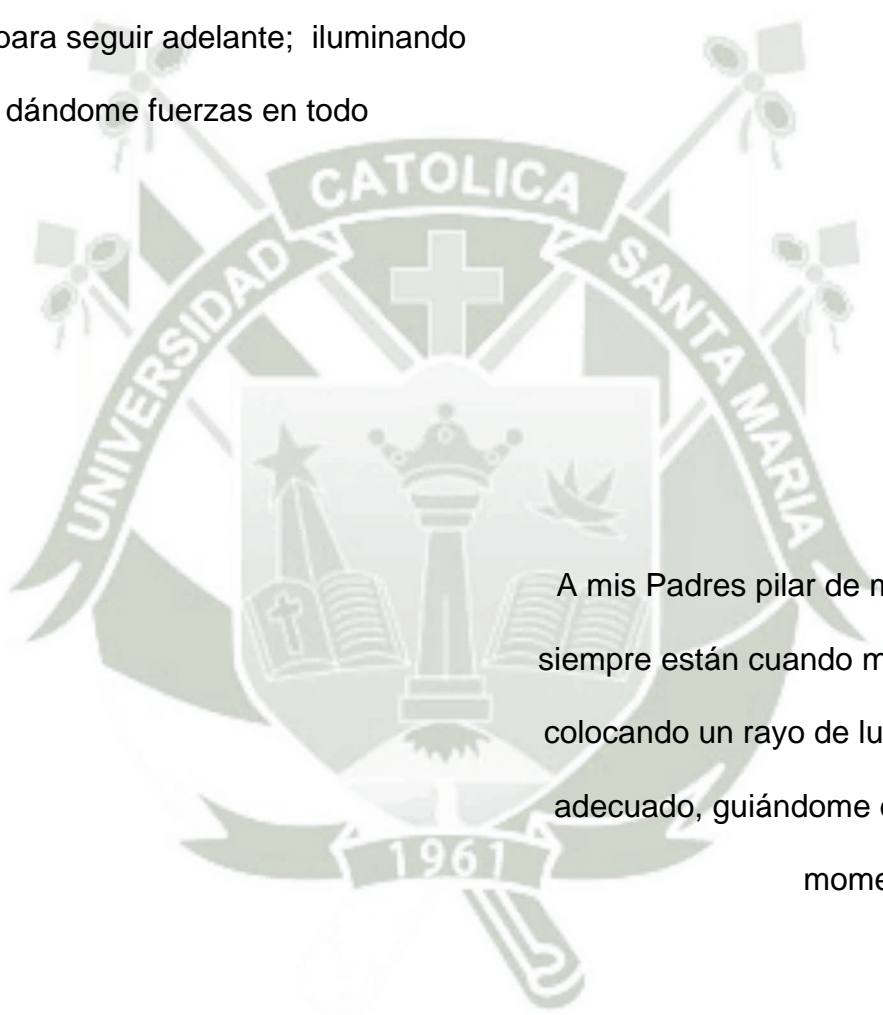
CIRUJANO DENTISTA

AREQUIPA PERU

2014

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de investigación a Dios,
ser supremo que me ayuda día a día en cada
paso que doy; abriendo los caminos
correctos para seguir adelante; iluminando
mis días y dándome fuerzas en todo
momento.



A mis Padres pilar de mi vida, quienes
siempre están cuando más los necesito
colocando un rayo de luz por el camino
adecuado, guiándome desde el primer
momento de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitir paso a paso la realización de este trabajo de investigación

A mis padres por su apoyo incondicional y su ayuda en este trabajo de investigación

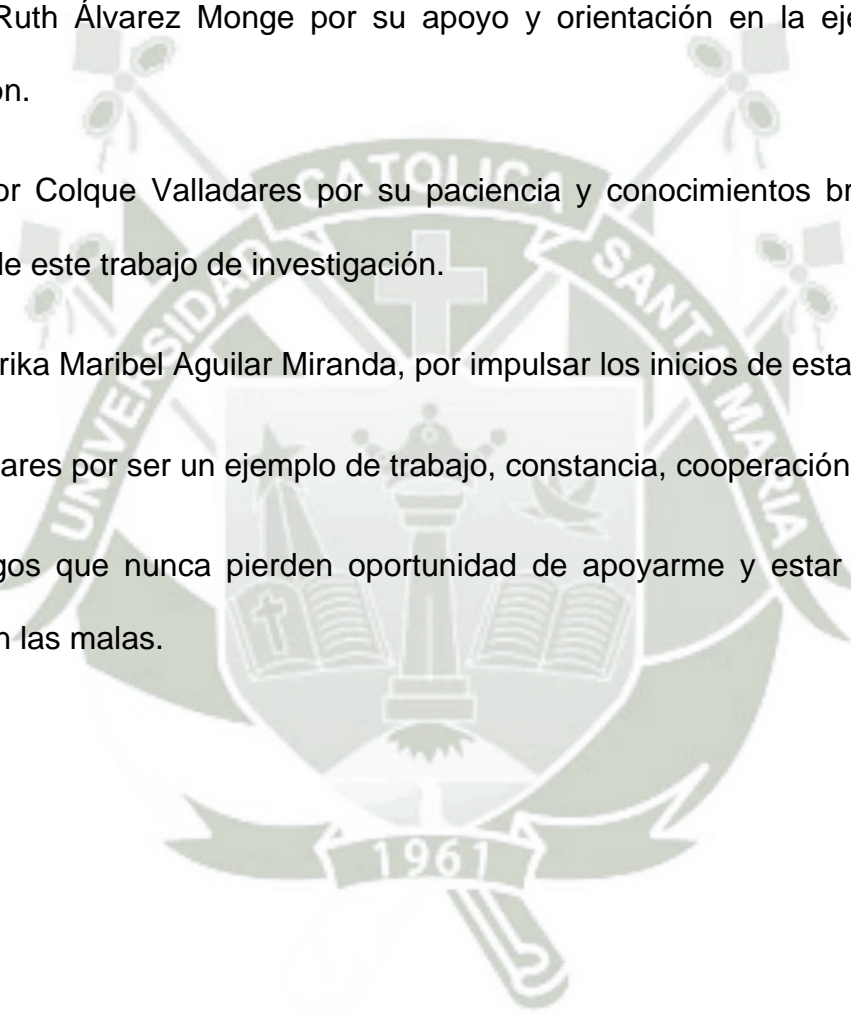
A la Dra. Ruth Álvarez Monge por su apoyo y orientación en la ejecución de esta investigación.

Al Dr. Víctor Colque Valladares por su paciencia y conocimientos brindados para el desarrollo de este trabajo de investigación.

A la Srta. Erika Maribel Aguilar Miranda, por impulsar los inicios de esta investigación.

A mis familiares por ser un ejemplo de trabajo, constancia, cooperación y aliento.

A mis amigos que nunca pierden oportunidad de apoyarme y estar conmigo en las buenas y en las malas.



"Toda la ciencia no es más
que un refinamiento del
pensamiento cotidiano"

Albert Einstein



INDICE GENERAL

RESUMEN Pág.7

ABSTRACT Pág.9

INTRODUCCIÓN Pág.11

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO TEÓRICO

1. Problema de investigación..... Pág. 14

2. Objetivos.....Pág. 19

3. Marco Teórico..... Pág.20

4. Hipótesis.....Pág.50

CAPITULO II: PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

1. Técnica, instrumentos y materiales de verificación.....Pág.52

2. Campo de verificación.....Pág.62

3. Estrategia de recolección..... Pág.66

4. Estrategia para manejar los resultados.....Pág.68

CAPITULO III: RESULTADOS

1. Sistematización y estudio de datos.....	Pág. 72
2. Discusión.....	Pág.83
CONCLUSIONES	Pág.85
RECOMENDACIONES	Pág.87
BIBLIOGRAFÍA	Pág. 88
ANEXOS	Pág.93



RESUMEN

El objetivo de esta investigación es determinar la eficacia in vitro del extracto de blueberry en cepas certificadas de *Porphyromonas Gingivalis* y la hipótesis sostiene que el Blueberry posee componentes como proantocianidinas, ácido clorogénico y flavonoides, responsables de propiedades antibacterianas; que la Concentración Mínima Bactericida es capaz de destruir microorganismos de una muestra inoculada en condiciones estandarizadas; que la Concentración Mínima Inhibitoria es la menor concentración que inhibe el crecimiento visible de un inóculo de bacterias estandarizadas y que la Clorhexidina al 2% es una sustancia antiséptica de acción bactericida y fungicida que altera la membrana de la célula microbiana: es probable que el Extracto de Blueberry a Concentración Mínima Bactericida sea más eficaz que el Extracto de Blueberry a Concentración Mínima Inhibitoria, la Clorhexidina al 2% y el Control Negativo en la inhibición de *Porphyromonas Gingivalis* in vitro.

Para el desarrollo de la investigación se utilizó la técnica de la observación y análisis sistemático, se trabajó con un extracto de blueberry por el método convencional previa desecación, homogenización y maceración durante 24 horas con etanol quedando como resultado final un extracto de blueberry al 50%.

Los resultados más importantes son:

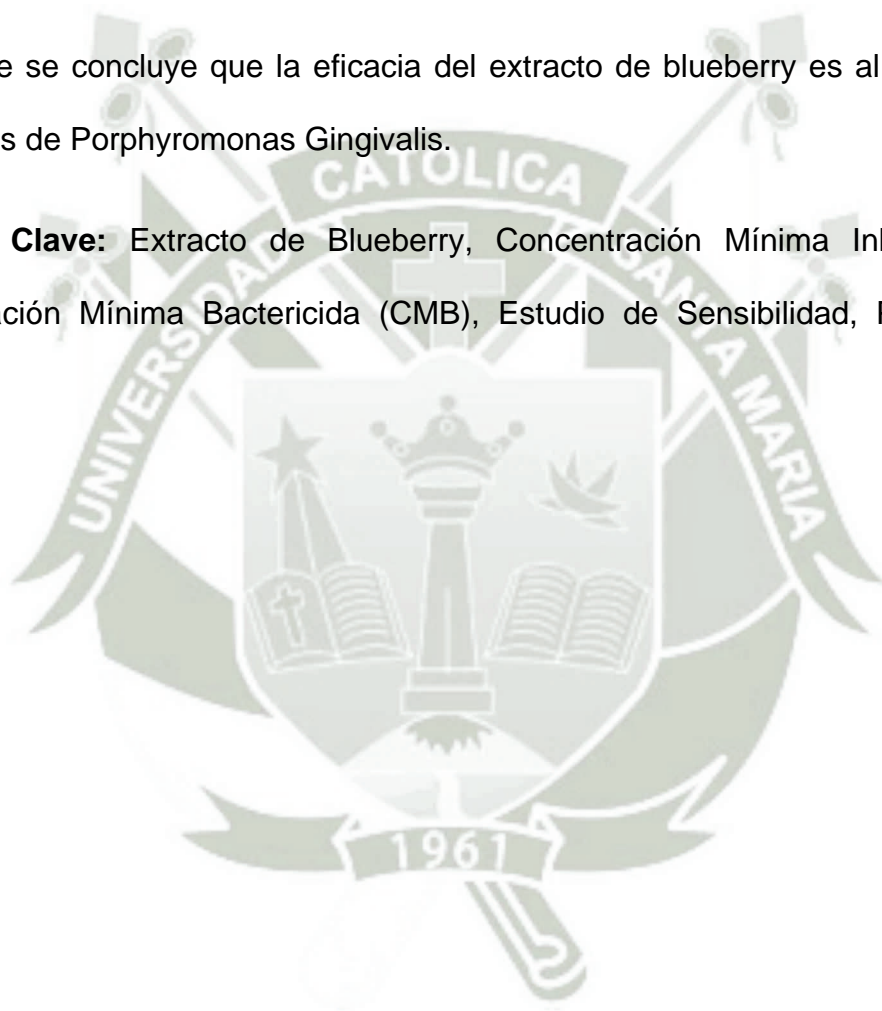
La cepa certificada de *Porphyromonas Gingivalis* ATCC 33277 obtenida de laboratorios Gen Lab, fue reactivada y sembrada en agar sangre, luego llevada a incubación en medio de anaerobiosis a 37°C por 48 horas.

Se determinó que la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) fue 20% y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) fue 25% del extracto de blueberry.

El estudio de sensibilidad bacteriana fue realizado por el método Kirby – Bauer, a una escala 0.5 de Mc Farland y se obtuvo el registro de los halos de inhibición; siendo 13.73 mm para el 20%, 18.91 mm para el 25%, 15.73 mm para la clorhexidina al 2% y 6 mm para el control negativo.

Finalmente se concluye que la eficacia del extracto de blueberry es al 25% en cepas certificadas de *Porphyromonas Gingivalis*.

Palabras Clave: Extracto de Blueberry, Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), Concentración Mínima Bactericida (CMB), Estudio de Sensibilidad, *Porphyromonas Gingivalis*.



ABSTRACT

The objective of this research is to determine the efficacy in vitro extract blueberry in certified strains of PorphyromonasGingivalis and the hypothesis holds that Blueberry has components as proanthocyanidins, chlorogenic acid and flavonoids responsible for antibacterial properties; Minimum Bactericidal Concentration that is capable of destroying microorganisms inoculated sample under standardized conditions; the minimum inhibitory concentration is the lowest concentration that inhibited visible growth of an inoculum of bacteria and standard 2% Chlorhexidine is an antiseptic and fungicide bactericidal altering the microbial cell membrane:is likely to Blueberry Extract Minimum Bactericidal Concentration is more effective than a Blueberry Extract minimum inhibitory concentration, 2% Chlorhexidine and Negative Control in the inhibition of Porphyromonasgingivalis in vitro.

For the development of the thesis the art of systematic observation was used, worked with a blueberry extract by the conventional method after drying, homogenization and maceration for 24 hours with ethanol being the end result of blueberry extract 50%.

The most important results are:

A certified strain of Porphyromonasgingivalis ATCC 33277 Lab Gen obtained from laboratories was reactivated and sown on blood agar, then carried through incubation in anaerobiosis at 37 ° C for 48 hours.

It was determined that the minimum inhibitory concentration (MIC) was 20% and Minimum Bactericidal Concentration (CMB) was 25% in the blueberry extract.

The study of bacterial sensitivity was performed by the method Kirby - Bauer, on a scale of 0.5 McFarland and registration of the zones of inhibition was obtained; being 13.73 mm for 20%, 18.91 mm for the 25%, 15.73 mm for 2% chlorhexidine and 6 mm for the negative control.

Finally it is concluded that the effectiveness of blueberry extract is certified 25% in strains of Porphyromonas gingivalis.

Keywords: Blueberry Extract, minimum inhibitory concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC), Sensitivity Study, Porphyromonas gingivalis.



INTRODUCCION

Desde tiempos inmemorables el hombre ha hecho uso de los productos naturales con fines terapéuticos, adquiridos empíricamente y transmitidos de padres a hijos de generación en generación; debido a que pueden devolver la salud, aliviando el dolor, controlando enfermedades y mejorando la calidad de vida del hombre. En el presente siglo, la fitoterapia (ciencia que estudia las propiedades medicinales de las plantas), sigue sorprendiéndonos por ser una alternativa de tratamiento natural, de fácil acceso y bajo costo para la población, el blueberry posee propiedades medicinales muy importantes como antiinflamatorias, antibacterianas, antioxidantes, astringentes, antisépticas y antidiarreicas, motivo por el cual se decidió realizar el presente trabajo de investigación, con la finalidad de comprobar la eficacia de la acción bactericida sobre *PorphyromonasGingivalis* in vitro.

La *PorphyromonasGingivalis* presenta gran importancia en enfermedades periodontales; considerándose un agente patógeno de la periodontitis por tener un alto potencial de destrucción tisular gracias a enzimas proteolíticas. Su inhibición permitiría la reducción significativa de enfermedades del periodonto.

Para su mejor organización esta investigación ha sido dividida en tres capítulos:

En el Primer Capítulo se desarrolla el Planteamiento Teórico que consiste en el problema, objetivos, marco teórico y la hipótesis del trabajo de investigación.

En el Segundo Capítulo se presenta el Planteamiento Operacional que incluye el tratamiento metodológico de la técnica instrumentos y materiales, el campo de verificación y las estrategias de recolección de datos y manejo de resultados.

En el Tercer Capítulo se dan los Resultados que comprenden la sistematización, análisis de datos, interpretaciones y gráficas, la discusión, conclusiones y recomendaciones.

Finalmente incluye la bibliografía, consulta informatizada y anexos pertinentes.



CAPITULO I

PLANTEAMIENTO TEORICO



I. PLANTEAMIENTO TEORICO

1. PROBLEMA DE INVESTIGACION

1.1. Determinación del problema

El problema de este trabajo de investigación se determina teniendo en cuenta la existencia de diversas bacterias que invaden el medio bucal dentro de ellas la PorphyromonasGingivalis y diversos estudios que demuestran que el blueberry posee propiedades antibacterianas por su contenido en proantocianidinas, ácido clorogénico y flavonoides; sumado a un interés especial por investigar posibles usos agregados que se le puede atribuir al blueberry y de los que aún no se conoce en su totalidad en la rama de la odontología.

Se busca conocer la eficacia producida por la aplicación de un producto natural como el blueberry sobre Porphyromonas Gingivalis, la principal responsable de la enfermedad periodontal; para ayudar a su disminución, se apela a la lectura de antecedentes investigativos sobre este producto y su actividad, que en la actualidad es investigada y día a día se descubren nuevos beneficios de este fruto que está siendo introducido al mercado peruano en los últimos años.

1.2. Enunciado

“EFICACIA IN VITRO DEL EXTRACTO DE BLUEBERRY EN CEPAS CERTIFICADAS DE PORPHYROMONAS GINGIVALIS EN LOS LABORATORIOS CLINICOS DE LA UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA, AREQUIPA 2013”

1.3. Descripción

1.3.1. Área de conocimiento

1.3.1.1. **Área General:** Ciencias de la Salud

1.3.1.2. **Área Especifica:** Odontología

1.3.1.3. **Especialidad:** Periodoncia

1.3.1.4. **Línea o Tópico:** Microbiología Oral

1.3.2. Operacionalización de variables

VARIABLES	INDICADOR	SUB INDICADOR
VARIABLE ESTIMULO extracto de blueberry	Concentración mínima inhibitoria (CMI)	
	Concentración mínima bactericida (CMB)	
VARIABLE RESPUESTA PorphyromonasGingivalis	Diámetro del halo de inhibición en mm	

1.3.3. Interrogantes básicas

1.3.3.1. ¿Cuál es la eficacia in vitro de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto de blueberry en cepas certificadas de *Porphyromonas Gingivalis*?

1.3.3.2. ¿Cuál es la eficacia in vitro de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del extracto de blueberry en cepas certificadas *Porphyromonas Gingivalis*?

1.3.3.3. ¿Cuál es la eficacia de la Clorhexidina al 2% como control positivo de crecimiento bacteriano en el diámetro del halo de inhibición de *Porphyromonas Gingivalis*?

1.3.3.4. ¿Cómo es el comportamiento del control negativo de crecimiento bacteriano en el diámetro del halo de inhibición de *Porphyromonas Gingivalis*?

1.3.3.5. ¿Qué estímulo anteriormente mencionado es el más eficaz en el diámetro del halo de Inhibición de *Porphyromonas Gingivalis*?

1.3.4. Taxonomía de la Investigación

ABORDAJE	TIPO DE ESTUDIO					DISEÑO	NIVEL
	Por la técnica de recolección	Por el tipo de dato	Por el número de medición de la variable respuesta	Por el número de grupos	Por el ámbito de recolección		
Cuantitativa	Experimental	Prospectiva	Transversal	Comparativa	Laboratorial	Cuasi Experimental	Explicativa

1.4. Justificación

1.4.1. Importancia

El presente trabajo tiene una importancia científica ya que aporta con un conocimiento aun no estudiado en su totalidad que nos brinda nuevas alternativas para solucionar problemas odontológicos además de aportar una nueva alternativa de solución ante las PorphyromonasGingivalis.

1.4.2. Originalidad

La investigación es auténtica, posee algo nuevo dentro de lo conocido que permite ampliar nuestra visión en el conocimiento acerca del blueberry orientado a odontología y sus propiedades no tan conocidas de antibacteriano y antiadherente.

1.4.3. Viabilidad

Realizar esta investigación es muy viable porque contamos con los recursos necesarios tales como el tiempo, los materiales y el financiamiento.

1.4.4. Actualidad

El trabajo tiene una connotación altamente actual, ya que es un producto cuyas propiedades están siendo estudiadas recientemente y en el ámbito de la odontología las investigaciones recién están comenzando; así como la introducción de este producto en el mercado peruano es reciente.

1.4.5. Utilidad

Esta investigación resulta útil por permitir demostrar el gran poder antibacteriano del blueberry permitiendo elaborar ciertas recomendaciones que permitan mejorar la calidad de vida de los demás e iniciar nuevas investigaciones que puedan explotar las maravillosas propiedades de este fruto.

2. OBJETIVOS

- 2.1.1. Determinar la eficacia in vitro de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto de blueberry en cepas certificadas de Porphyromonas Gingivalis.
- 2.1.2. Determinar la eficacia in vitro de la Concentración mínima Bactericida (CMB) del extracto de blueberry en cepas certificadas Porphyromonas Gingivalis.
- 2.1.3. Determinar es la eficacia de la Clorhexidina al 2% como control positivo de crecimiento bacteriano en el diámetro del halo de inhibición de Porphyromonas Gingivalis.
- 2.1.4. Establecer el comportamiento del control negativo de crecimiento bacteriano en el diámetro del halo de inhibición de Porphyromonas Gingivalis.
- 2.1.5. Identificar que estímulo anteriormente mencionado es el más eficaz en el diámetro del halo de Inhibición de Porphyromonas Gingivalis.

3. MARCO TEORICO

3.1. Marco Conceptual

3.1.1. Arándano

El arándano es un arbusto perteneciente a las familias ericáceas del género *Vaccinium*, recibe el nombre de anavia, ráspero o mirtillo. Son plantas sub-arbustivas que miden entre 20 y 60 cm de altura.¹

3.1.1.1. Generalidades y distribución geográfica

Es una planta importante desde el punto de vista ecológico, no sólo por sus frutos sino porque además protege el suelo de los bosques de la erosión y contribuye a la formación de humus, se distribuye en la mayor parte de Europa (Alpes, Apeninos centrales, Pirineos), Asia, América central, EE.UU. y Canadá, entre los bosques de coníferas y en los brezales. EE.UU. es el principal productor, consumidor, exportador e importador de arándanos del mundo y junto a Canadá abarcan el 90% del área productiva total, seguida de Chile (que fue el pionero del cultivo del arándano en el hemisferio sur), Argentina, Nueva Zelanda, Australia y Sudáfrica.²

Los principales países productores europeos son: Francia, Holanda, Alemania, Polonia y España³.

¹ <http://www.uclm.es/area/cta/cesia2012/cd/PDFs/4-BIO/BIO-P25T.pdf>

² <http://www.inforegion.pe/portada/141409/arandano-la-nueva-estrella-de-la-agro-exportacion-peruana/>

³ <http://www.uclm.es/area/cta/cesia2012/cd/PDFs/4-BIO/BIO-P25T.pdf>

Los países que demandan este tipo de frutos son: Japón, Italia, Inglaterra, Bélgica y Holanda. Canadá es el principal proveedor de arándanos congelados del mundo, pero a diferencia de EE.UU., la producción canadiense es mayoritariamente de tipo silvestre.⁴

Chile y Argentina ofertan en estado fresco a los principales mercados ubicados en el hemisferio norte (EE.UU., Canadá y algunos países europeos), cuando éstos se encuentran en su estación invernal y no pueden abastecerse con su producción local.⁴

3.1.1.2. Descripción Botánica

Se trata de un arbusto pequeño de 0.2-0.6 metros de altura, cuyo nombre científico es *Vaccinium*., perteneciente a la familia Ericaceae.⁵

Las raíces de los arándanos tienen un aspecto fibroso y se distribuyen superficialmente, lo que las vuelve dependientes de una provisión constante de humedad. En condiciones naturales las raíces están asociadas con hongos micorrizas específicos, con los cuales mantienen una relación de mutuo beneficio (simbiótica).

Entre las raíces y la parte aérea se encuentra la corona, que tiene la capacidad de emitir brotes.⁶

⁴ <http://www.agronegociosperu.org/tema/tem003.htm#.U1cS9IV5NLV>

⁵ <http://w4.siap.sagarpa.gob.mx/AppEstado/Monografias/Frutas/Blueberry.html>

⁶ <http://w4.siap.sagarpa.gob.mx/AppEstado/Monografias/Frutas/Blueberry.html>

La altura del arándano bajo no supera el medio (1/2) metro. En cambio, el arándano alto en condiciones de cultivo puede alcanzar alturas de hasta 2,5 m.⁷

Las yemas vegetativas, de las cuales se originan las hojas, y las yemas fructíferas, que producen las flores, se distribuyen en forma separada a lo largo de las ramas, a diferencia de otros frutales.⁸

Las hojas son simples, de forma ovada a lanceolada, y caducas, es decir, las hojas se pierden durante el receso invernal, adquiriendo una tonalidad rojiza en el otoño.⁸

Las flores poseen corola blanca o rosada, reuniéndose en racimos, son péndulas y se abren solitarias en la axila de las hojas. El cáliz, poco marcado, tiene 4 o 5 dientes obtusos. La corola esférica verde pálido deja sobresalir el estigma.⁸

El fruto es una baya casi esférica, que dependiendo de la especie y cultivar, puede variar en tamaño de 0,7 a 1,5 cm de diámetro, y en color desde azul claro hasta negro. La epidermis del fruto está cubierta por secreciones cerosas, que le dan una terminación muy atractiva, como en el caso de las ciruelas.⁸

⁷ <http://www.sierraexportadora.gob.pe/productos/catalogo-de-productos/arandano/>

⁸ <http://www.botanical-online.com/medicinalsarandano.htm>

3.1.1.3. Etimología

Vaccinium: nombre genérico que se utilizó en latín clásico para un tipo de baya (probablemente el arándano *Vaccinium myrtillus*), pero su última derivación es oscura.⁹

3.1.1.4. Variedades

Existen dos subgéneros:¹⁰

<i>Oxycoccus</i>	<i>Vaccinium</i>
<p>Subgénero (los arándanos rojos o cranberries): con vástagos no leñosos, delgados y rastreros y flores con pétalos fuertemente inclinados.</p> <p>Algunos botánicos consideran este subgénero como un género aparte.</p>	<p>Todas las otras especies, con vástagos leñosos, más gruesos y erguidos y flores acampanadas.</p>
<ul style="list-style-type: none"> • <i>V. erythrocarpum</i> • <i>V. macrocarpon</i> • <i>V. microcarpum</i> • <i>V. oxycoccus</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>V. acosta</i> Raeusch. • <i>V. angustifolium</i> (Aiton) Benth. • <i>V. arboreum</i> Lesch. ex Dunal • <i>V. ashei</i> J.M.Reade

⁹ <http://climafrutal.wordpress.com/el-arandano/>

¹⁰ <http://vidaok.com/el-arandano-variedades-propiedades-del-arandano/>

- *V. atrococcum* (A.Gray) A.Heller
- *V. caesium* Greene
- *V. consanguineum*
- *V. CORYMBOSUM*
- *V. melanocarpum*
- *V. meridionale*
- *V. myrsinites*
- *V. myrtilloides*
- *V. myrtillus*
- *V. occidentalis*
- *V. ovatum*
- *V. pallidum*
- *V. parvifolium*
- *V. uliginosum*
- *V. vitis-idaea*
- *V. vitis-idaea* var. *minus*

3.1.1.1. Blueberry

Llamado arándano azul o mora azul, es el fruto del arándano, una baya pequeña, de color azul, de ahí la denominación de "*blueberry*".¹¹ Frutal de aspecto arbustivo, perteneciente a la familia botánica de las Ericáceas. Existen distintas especies de arándanos. La mayor extensión cubierta por este frutal corresponde al arándano bajo, que crece silvestre en regiones frías de Norteamérica, de donde es originario. El arándano alto y el arándano ojo de conejo son cultivados comercialmente.

El arándano azul silvestre posee un sabor y textura superiores a pesar de ser de menor tamaño que los ofrecidos comercialmente.

3.1.1.1.1. Componentes del blueberry

Contenido por 100 gramos de sustancia comestible (valores aproximados pueden existir ligeras variaciones en función del origen y variedad analizada).¹²

- Agua (g) 87.4
- Proteínas (g) 0.3
- Fibras (g) 1.7
- Calorías (kcal) 42
- Vitamina A (UI) 30
- Vitamina B1 (mg) 0.014

¹¹ <http://respuestanatural.net/tag/arandano-azul/>

¹² <http://www.enbuenasmanos.com/articulos/muestra.asp?art=2378>

- Vitamina B2 (mg) 0.0024
- Vitamina B6 (mg) 0.012
- Vitamina C (mg) 12
- Cobre (mg) 0.26
- Fósforo (mg) 10
- Cloro (mg) 4
- Hierro (mg) 0.5
- Calcio (mg) 14
- Taninos: catequicos (5 – 12%) y proantocianidinas oligoméricas
- Flavonoides: astragalina, hiperosido, quercitina e isoquercitina
- Antocianos : (0.1-0.5 %): malvidina, cianidina, petunidina y heterosidos de delphinidina con distintos azúcares.
- Ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico: ácidos cafeico y clorogénico
- Triterpenos: ácido ursólico
- Iridoides : asperulosido y onotropeína
- Ácidos orgánicos (1 %): ácido quínico, málico y cítrico
- Pectina (3-7%)
- Ácido nicotínico (mg) 0.2
- Ácido pantotónico (mg) 12
- Sodio (mg) 2
- Potasio (mg) 72
- Magnesio (mg) 6
- Manganeso (mg) 0.5

3.1.1.1.2. Propiedades Antibacterianas y Antiadherentes del Blueberry

Las propiedades antibacterianas y antiadherentes bacterianas que posee el blueberry se deben a las proantocianidinas oligoméricas, ácido clorogénico y flavonoides.

Cada uno de ellos tiene un modo de acción diferente en contra de bacterias y consta de antecedentes importantes que se deben tener en cuenta:

3.1.1.1.2.1. Proantocianidinas Oligoméricas

Son polímeros de flavanoles-3, también conocidas como "taninos condensados", poseen propiedades antibacterianas así como la propiedad de inhibir la adhesión de las bacterias.

La actividad anti-adherencia de proantocianidinas en los productos de arándano ha sido bien establecida, pero no está claro en qué medida se traduce esta actividad anti-adherencia en la prevención de las infecciones urinarias. Una Colaboración Cochrane Review del cuerpo de la literatura clínica concluyó que "hay una cierta evidencia para recomendar el jugo de arándano para la prevención de las infecciones urinarias en mujeres con IU sintomáticas. Otra revisión de arándano y la prevención de la IU tienen una visión más escéptica. La revisión apoya la lucha contra la adherencia de la

actividad de un tipo proantocianidinas: "La evidencia sugiere que los restos proantocianidinas son compuestos antiadherentes potentes"¹³

Los flavonoides y los polifenoles asociados, y en particular las PACs, provocan un efecto inhibitor sobre el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). El posible mecanismo de acción puede ser porque inhiben la expresión de los genes que regulan la unión del virus a receptores celulares en los linfocitos normales, lo que previene la infección.¹⁴

Las proantocianidinas tienen capacidad de inhibir la adherencia de la E. Coli a las células del tejido urinario de la siguiente manera:

- Previniendo la entrada de la E. Coli por medio de una barrera energética. Previniendo la entrada de la E. Coli por medio de una barrera energética. Las proantocianidinas evitan la adhesión
- Cambiando la forma de la E. Coli de bastón a esférica, para evitar su adherencia.
- Inhibiendo la capacidad secretora de la E. Coli, evitando la colonización que genera la infección ("sensing quorum").¹⁵

3.1.1.1.2.2. Acido clorogénico

Los ácidos clorogénicos son compuestos fenólicos que se clasifican dentro de los fenólicos simples o no flavonoides.¹⁶

¹³http://centrodeartigos.com/articulos-enciclopedicos/article_82877.html

¹⁴<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:DTHuQRzfCQJ:www.naturlet.com/naturlet/libros/PACs.pdf+&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=pe>

¹⁵<http://www.sexovida.com/colegas/arandanos.htm>

Los estudios han demostrado que el ácido clorogénico es eficaz contra varias bacterias patógenas incluyendo E. coli.¹⁷

Existen investigaciones en las cuales se comprueban la acción antibacteriana del acidoclorogénico por ejemplo: J. Dueñas, B. Naranjo & P. Araujo (Departamento de Ciencias de la vida, Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador.) realizó una investigación sobre la Extracción y caracterización de principios activos de estructura fenólica con propiedades antioxidantes y antibacterianas, a partir de residuos del procesamiento de alcachofas.; donde demostró la propiedad antibacteriana en cultivos de Staphylococcus aureus y Salmonella spp.¹⁸

3.1.1.1.2.3. Flavonoides

Es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas, son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo de los daños producidos por sustancias o elementos oxidantes.¹⁹

Actúan como anti fúngicos y bactericidas, existen reportes sobre la planta Scutellaria Baicalenis (Huang-Chin) que registran actividades bacteriostáticas cuando se utilizan en concentraciones de 2% y bactericidas en concentraciones del 3.13%; estos estudios datan desde 1982 donde

¹⁶<http://nutraceuticos2012.blogspot.com/2012/10/acido-clorogenico.html>

¹⁷<https://diabetesstop.wordpress.com/2007/11/25/arandano-azul/>

¹⁸http://www.espe.edu.ec/portal/files/sitio_congreso_2011/papers/V4.pdf

¹⁹<http://www.lineaysalud.com/ique-es/413-los-flavonoides.html>

Investigadores del Hospital de la Administración de Veteranos de Wadsworth en conjunto con Investigadores de la Universidad de California, estudiaron el efecto de agentes antimicrobianos; reportando que gracias al contenido de flavonoides en esta planta se obtuvo propiedades bacteriostáticas y bactericidas.

Por otra parte Investigadores de la Universidad de Yonsei en Corea, estudiaron a un extracto parcialmente purificado de la corteza de la planta UlmiHanse (olmo) y sus ingredientes activos consistentes en flavonoides, demostraron que en enfermedad periodontal los tejidos liberan proMMP – 2 y la forma activa de MMP-2, cuando se trata de periodonto patógeno como Treponema Lecithinolyticum. Asimismo las proteasas se obtienen de PorphyromonasGingivalis y Treponema Denticola; las cuales fueron inhibidas gracias a estos componentes.

Otras investigaciones señalan que compuestos fenólicos aislados del te verde (CamelliaSinesis) contrarrestan los efectos tóxicos de metabolitos liberados por PorphyromonasGingivalis.²⁰

3.1.1.1.3. Usos Medicinales

3.1.1.1.3.1. Enfermedades de las vías urinarias:

El arándano tiene capacidad para luchar contra problemas renales por poseer propiedades depurativas y desintoxicantes, se ha demostrado que el jugo de arándano posee propiedades antibacterianas que ayudan en la prevención de

²⁰<http://aapaunam.mx/Revista/REV-A4-VOL4-OctDic/LosFlavonoidesTratamientoInfecciones.pdf>

cistitis, además de prevenir la inflamación de la vejiga y las infecciones de riñones, próstata, uretra y todo el tracto urinario en general.

El jugo de arándano también es útil para la prevención de cálculos del riñón al acidificar la orina ayudando a expulsar los oxalatos de calcio evitando la formación de piedras en el riñón y así mismo la disolución de arenilla.²¹

3.1.1.1.3.2. Trastornos del aparato digestivo:

Gracias a sus propiedades astringentes, anti vomitivas, antiespasmódicas, antiinflamatorias y bacteriostáticas detienen el crecimiento de bacterias en el tracto digestivo además de utilizarse para tratamiento de diarreas, vómitos, inflamaciones intestinales o gastroenteritis.²²

3.1.1.1.3.3. Tratamiento de heridas y úlceras:

Los preparados de arándano usados externamente son muy eficaces para enfermedades de la piel como úlceras de la boca, eczemas o acné; gracias a sus propiedades antiinflamatorias.²³

3.1.1.1.3.4. Anemia:

La vitamina C fortalece el sistema inmunológico y favorece la absorción de hierro por parte de nuestro organismo además de su acción antioxidante; por lo que es de gran ayuda para prevenir cosas de anemia.¹⁵

²¹http://www.larioja.org/npRioja/cache/documents/558132_PROPIEDADES_MEDICINALES_DEL_ARANDANO_web.pdf;jsessionid=A393464393ADAFD0F63F86C8BD687B92.jvm3

²² <http://respuestanatural.net/tag/arandano-azul/>

²³http://www.larioja.org/npRioja/cache/documents/558132_PROPIEDADES_MEDICINALES_DEL_ARANDANO_web.pdf;jsessionid=A393464393ADAFD0F63F86C8BD687B92.jvm3

3.1.1.1.3.5. Afecções oculares:

Existen numerosos estudios que demuestran la importancia de estos frutos en la conservación de la vista y en la prevención de enfermedades oculares gracias a su alto contenido de flavonoides antocianinas; de esta manera ayudan en casos de ceguera nocturna, glaucoma, desprendimiento de retina, astigmatismo o cataratas.²⁴

3.1.1.1.3.6. Enfermedades degenerativas:

Siendo una fruta con alto contenido de vitamina C y antioxidantes ayuda a reducir el riesgo de sufrir enfermedades degenerativas como Alzheimer, pérdida de memoria o los efectos de envejecimiento al reducir los radicales libres.¹⁶

3.1.1.1.3.7. Enfermedad Periodontal

Debido a su contenido en flavonoides y compuestos fenólicos muestran un efecto inhibitorio sobre las metaloproteinasas liberadas por el fluido crevicular y las proteasas de *T. denticola* y *P. Gingivalis*.

Científicos israelíes ya demostraron las ventajas del arándano americano en la prevención de la enfermedad periodontal incluso utilizándolo como enjuague bucal.¹⁸ Estudio realizado tanto in vivo como in vitro, señalando que

²⁴http://www.larioja.org/npRioja/cache/documents/558132_PROPIEDADES_MEDICINALES_DEL_ARANDANO_web.pdf?jsessionid=A393464393ADAFD0F63F86C8BD687B92.jvm3

reduce la presencia de bacterias orales.²⁵ También la utilización de fracciones de alto peso molecular extraídas de arándano americano inhibiría enzimas proteolíticas causantes de la enfermedad periodontal.²⁶

3.1.1.1.4. Producción de Blueberry en el Perú

El blueberry es muy rentable en el mundo en cuestión de economía, poseen altas perspectivas de crecimiento en el mercado internacional por sus características nutricionales, en el Perú en el año 2007 fue introducido el blueberry y en la actualidad hay sembradas 300 has; pero se puede asegurar que en los próximos años aumente la cantidad de cultivos debido a los resultados técnicos y comerciales de los pioneros en producción de blueberries; la competencia de producción y exportación es muy dinámica pero el Perú cuenta con una ventana comercial (agosto – septiembre) donde en otros países productores de blueberries la producción baja por condiciones climatológicas; siendo equivalente la producción de 5,000 has y a 700 millones de dólares en exportaciones. De acuerdo a las proyecciones de siembra, esta superficie será instalada en 5 años, convirtiéndose en un exportados líder de berries(**arándanos**, frambuesas, fresas) y cherries (cerezas) en el Hemisferio Sur.²⁷

²⁵http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pident_articulo=13154072&pident_usuario=0&pcontactid=&pident_revista=4&ty=68&accion=L&origen=zonadelectura&web=http://zl.elsevier.es&lan=es&fichero=4v29n04a13154072pdf001.pdf

²⁶ CAÑIGUERAL, Salvador, revista de fitoterapia "Arándano Americano (*vacciniummacrocarpon*): conclusiones de la investigación y de la evidencia clínica" pág. 18.

²⁷ <http://www.inforegion.pe/portada/141409/arandano-la-nueva-estrella-de-la-agro-exportacion-peruana/>

Esta afirmación se hace en base al comportamiento de los mercados y la dinámica de los competidores, así como los resultados que se vienen obteniendo en las diferentes operaciones privadas, desarrolladas los últimos años en las regiones de Arequipa, Ica, Lima, Cajamarca, Ancash, La Libertad, Lambayeque y Piura.¹⁹

Las primeras cosechas de arándanos obtenidas en el país, demostraron que las plantaciones se desarrollan con altos niveles de productividad, calidad y costos competitivos; y que además se obtienen en la ventana comercial de mayor interés a nivel mundial (septiembre y octubre).²⁸

Por otro lado, los resultados también demuestran que los “berries” y “cherries” prosperan de mejor manera en la sierra que en otras regiones del país; dado que las condiciones de suelo y clima de las zonas alto andinas son ideales para el desarrollo de este tipo de frutales que requieren elevados niveles de frío, amplio rango térmico y suelos ácidos.²⁹



²⁸ <http://agraria.pe/noticias/arandanos-azules-peruanos-tienen-potencial-en-eeuu>

²⁹ <http://www.agronegociosperu.org/tema/tem003.htm#.U1cS9IV5NLV>

Fruto Blueberry²¹

3.1.2. Porphyromonas

Este género pertenece a la familia Bacteroidaceae y constituyen un grupo de pigmentación negra (BPN) son gramnegativas anaerobias estrictas³⁰, suelen presentarse en forma de bacilo o cocobacilo; comprende bacterias asacarolíticas (no metabolizan hidratos de carbono), usan como fuente de energía compuestos nitrogenados, las especies de este género relacionada con la patología humana son: *P. asacharolytica* (patología extraoral forma parte de la microbiota normal del colon y la vagina), *P. gingivalis*, *P.*

³⁰GRANADOS PEREZ, Raquel; VILLAVARDE, Carmen; *Microbiología Bacteriología Características y Clasificación Bacteriana Virología Características y Técnicas Bioquímicas* pág. 58.

endodontalis y *P. catoniae*, cuyo hábitat natural es la cavidad oral y excepcionalmente producen procesos patológicos fuera de ella.³¹

3.1.2.1. PorphyromonasGingivalis

Es una bacteria periodonto patógena que se aísla en el surco gingival cuando hay lesiones periodontales avanzadas, raramente se puede detectar en el dorso de la lengua, amígdalas y saliva³²; no se le considera parte de la microbiota normal por el contrario como patógeno exógeno se le relaciona con gingivitis, pulpitis, abscesos periodontales y periapicales.³³

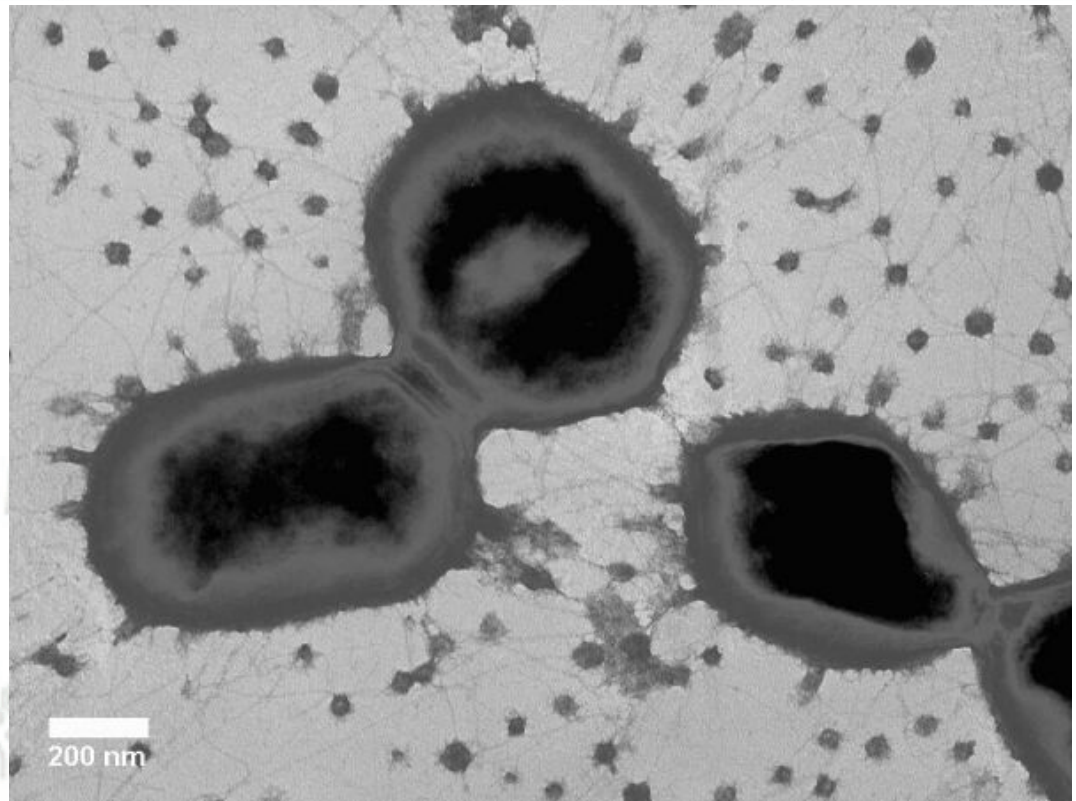
Para su aislamiento los medios de cultivo deben incluir vitamina k y hemina o sangre por su dependencia de hierro; las colonias claramente diferenciadas aparecen tras una incubación de al menos 48 horas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, poseen una pigmentación marrón oscura o negra y no fluorescente bajo la luz ultravioleta.³⁴

³¹LIEBANA UREÑA, José; *Microbiología Oral* pág. 374.

³²MOUTON, Christian. CLAUDE, Jean Robert; *Bacteriología Bucodental* pág. 55.

³³LIEBANA UREÑA, José; *Microbiología Oral* pág. 376.

³⁴ http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/odontologia/2011_n1/pdf/a11.pdf



Micrografía electrónica muestra las vesículas y fimbrias
Autor: TsuteChen
Fuente: <http://en.citizendium.org/wiki/File:P.gingivalis.jpg>

3.1.2.1.1. Morfología y estructura

Las células se presentan bajo la forma de cocobacilo de 0.5 μm por 1.2 μm , anaerobio estricto gramnegativo e inmóviles, considerado un comensal en la cavidad oral.³⁵ Su pared celular presenta a nivel de la membrana externa las endotoxinas, son capsulados, no esporulados, sin flagelos y abundantes fimbrias. A nivel superficial presenta vesículas que contienen una variedad de enzimas que juegan un rol importante en su virulencia. Así también produce múltiples enzimas con capacidad de degradar compuestos proteicos.³⁶

³⁵MOUTON, Christian. CLAUDE, Jean Robert; *Bacteriología Bucodental* pág. 58

³⁶ http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/odontologia/2011_n1/pdf/a11.pdf

3.1.2.1.2. Factores de virulencia

3.1.2.1.2.1. Cápsula

De naturaleza polisacárida que permite la subdivisión de la especie en seis serotipos, tiene una acción antifagocitaria.²⁸

3.1.2.1.2.2. Membrana externa

Poseen proteínas que se comportan como adhesinas que participan en fenómenos de adhesión y coagregación bacteriana y por tanto en la colonización de células epiteliales y fibroblastos y en la formación y mantenimiento de la placa subgingival.²⁸

3.1.2.1.2.3. Fimbrias

Como las proteínas de la membrana externa y con sus mismas consecuencias se comportan como adhesinas³⁷ e intervienen en fenómenos de coagregación y adhesión a superficies epiteliales y dentales en este último caso con mediación de saliva.²⁸

3.1.2.1.2.4. Proteasas

Produce una amplia gama de enzimas proteolíticas, algunas se asocian a la membrana externa y otras se liberan al exterior o son transportadas a distancia por las vesículas superficiales³⁸, gracias a ellas se obtiene nutrientes

³⁷BROOKS, Geo; *Microbiología Médica* pág.37

³⁸RIVERA RIVERA, Cayetano; *Genética Bacteriana* Universidad Católica de Santa María pág. 30

a partir de tejidos del hospedador provocando importantes daños tisulares, favoreciendo a su multiplicación. Penetración y diseminación.²⁸

Se comprende que estas proteasas al comportarse como agresinas e impedinas, desempeñan un papel fundamental en el surco gingival para producir periodontitis.³⁹

3.1.2.1.2.5. Otros compuestos proteicos

La superoxidodismutasa permite que las *Porphyromonas Gingivalis* resistan la acción oxidante de los radicales superóxido generados en el interior de los leucocitos polimorfonucleares.

Las exoenzimas que también contribuyen al daño tisular como hialuronidasa, fosfatasa alcalina relacionada con la reabsorción del hueso alveolar.

La exotoxina del tipo epiteliotoxina de gran importancia en el proceso penetrante de los tejidos.³¹

3.1.2.1.3. Fisiopatología

Es considerado un colonizador secundario, comensal del surco gingival que llega por contagio o transmisión por individuos infectados por medio de la saliva principalmente; su capacidad de adherirse principalmente por sus fimbrias peritricas tipo Ib, II así como por sus vesículas de membrana, hemaglutininas, capsula, le permiten dar el primer paso en la colonización del surco, poder adaptarse e invadir las células epiteliales en un periodo aproximado de 20 minutos, pudiendo replicarse dentro de ellas y diseminarse

³⁹LIEBANA UREÑA, José; *Microbiología Oral* pág. 377-378

a las células de alrededor. Esta característica de invadir las defensas del huésped. Así también su capacidad de degradar diversas proteínas, componentes del surco gingival, ligamento periodontal y hueso alveolar, además de alterar la respuesta innata y específica del anfitrión. A todo esto se suma un factor huésped, que ante la presencia de esta bacteria, activa una diversidad de respuestas que pueden incrementar el proceso inflamatorio, presente en el surco, haciendo crónico el proceso de destrucción del periodonto.⁴⁰

3.1.2.1.4. Aislamiento Bacteriano

P. gingivalis es un microorganismo anaerobio estricto que esta predominantemente en las bolsas periodontales, específicamente en el biofilmsubgingival y es por eso que la muestra para su aislamiento es a partir del biofilmsubgingival, que se toma con diferentes instrumentos como curetas, cintas, conos de papel.⁴¹ Siendo el más utilizado el cono de papel número 30 o 40, que se coloca dentro del surco o bolsa periodontal por un periodo de 20 a 60 seg, para luego ser llevado a un medio de transporte como VMGA-III, BHI, Tioglicolato y luego ser sembrado en medios enriquecidos como agar sangre suplementado o el medio selectivo agar Columbia antibiótico e incubar a 37°C por 7 a 14 días, en condiciones de anaerobiosis que puede ser jarra, cámara o sobres de anaerobiosis.⁴²

⁴⁰ http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/odontologia/2011_n1/pdf/a11.pdf

⁴¹ http://www.tesis.uchile.cl/tesis/uchile/2006/delrio_p/sources/delrio_p.pdf

⁴² MOUTON, Christian. CLAUDE, Jean Robert; *Bacteriología Bucodental* pág. 56

Pasado este tiempo la lectura de las colonias debe reconocer características como tamaño de 1-2 mm, forma redonda, convexa y ser pigmentados de un color marrón a negro. La coloración gram debe evidenciar una morfología cocobacilar de 0.5 x 1-2 μm y ser negativa.⁴³

3.1.2.1.5. Nutrición

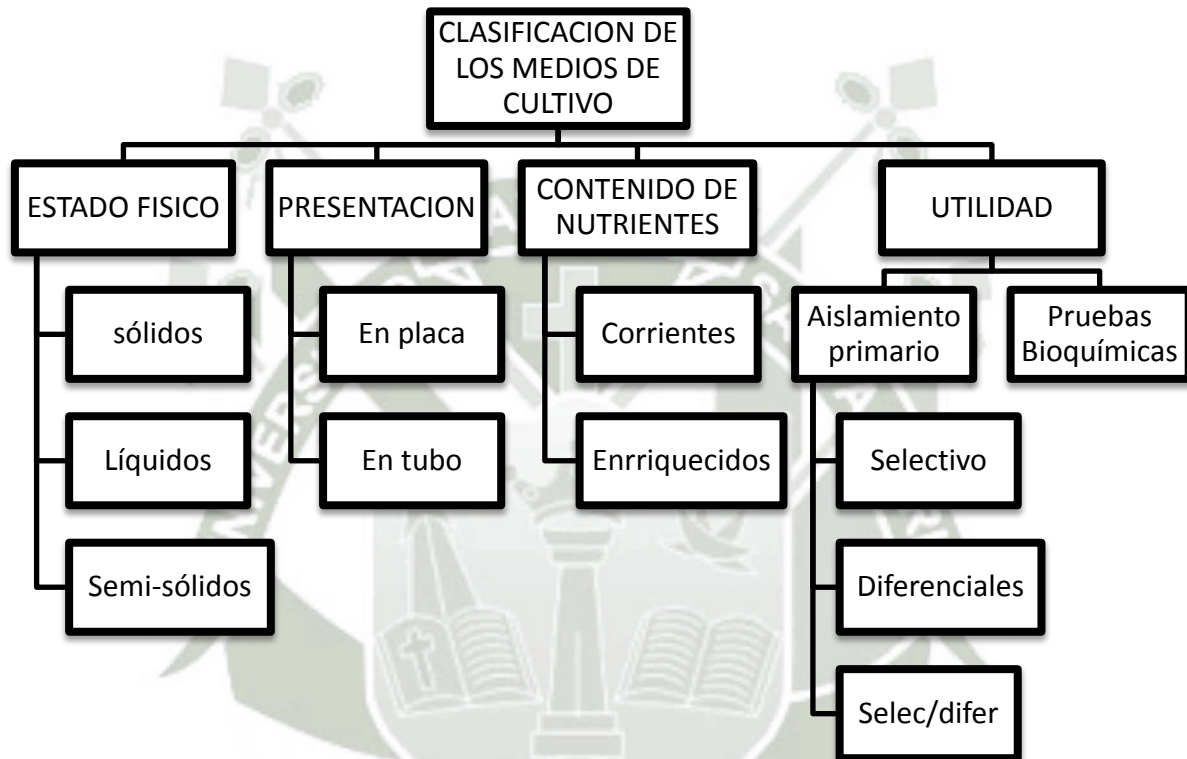
PorphyromonasGingivalis es una especie proteolítica, asacarolítica, anaerobia estricta, por lo que coloniza sitios en donde la tensión de oxígeno es baja, pero en los cuales hay substratos abundantes en nitrógeno. El ecosistema subgingival proporciona un medioambiente ideal para esta especie, ya que, el potencial rédox es bajo (y más bajo aún en sacos periodontales), y posee nutrientes endógenos ricos en péptidos y aminoácidos; tiene un requerimiento obligado de hierro para crecer. Sin embargo, cuando ocurre una falta de hierro en el sistema de poros de la bacteria (sideporos, los cuales quelanhemina) utiliza hemina (hierro protoporfirina IX). Los niveles de hemina en boca son variables y el sangramiento, como resultado de la inflamación gingival, elevaría su concentración subgingival, de modo que este puede ser un factor que predispone a la acumulación de esta bacteria. La hemina que se acumula en la membrana extracelular actúa como "basurero" de oxígeno ayudando a mantener un microambiente anaerobio.⁴⁴

⁴³ABARCA Katia, GARCIA Patricia, VIAL Pablo; *Microbiología clínica* pág. 173

⁴⁴ http://www.tesis.uchile.cl/tesis/uchile/2006/delrio_p/sources/delrio_p.pdf

3.1.3. Medios de Cultivo

Los medios de cultivo son mezclas de elementos nutrientes de distinta naturaleza que usan los microorganismos para su crecimiento⁴⁵ y se clasifican según⁴⁶:



⁴⁵COLLINS, C.H.; LYNE, Patricia; *Métodos Microbiológico*. pag.93

⁴⁶GRANADOS PEREZ, Raquel; VILLAVERDE, Carmen; *Microbiología Bacteriología Características y Clasificación Bacteriana Virología Características y Técnicas Bioquímicas* pág. 15-19.

El mediodo cultivo utilizado para *PorphyromonasGingivalis* es el agar sangre, un medio enriquecido denominado de esta manera por ser un medio corriente al que se le adiciona algún nutriente como sangre con o sin calentamiento, hidratos de carbono, extracto de levadura u otros factores de enriquecimiento específicos.⁴⁷

3.1.4. Pruebas de Sensibilidad o Susceptibilidad a los Antimicrobianos

Las pruebas de susceptibilidad nos permiten determinar la resistencia o el grado de sensibilidad de los microorganismos frente a los diferentes antimicrobianos.

3.1.4.1. Concentraciónmínima inhibitoria (CMI)

Se define como la menor concentración de antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un inóculo de bacterias estandarizado.⁴⁸

3.1.4.2. Concentraciónmínima Bactericida (CMB)

Se define como la mínima concentración de antibiótico que destruye el 99.9% del inóculo de bacterias estandarizadas⁴⁰

⁴⁷DELGADO IRRIBAREN, Alberto; *Laboratorio de Microbiología* pag.82

⁴⁸KONEMAN, Elmer; ALLEN, Stephen; *Diagnostico Microbiológico Texto y Atlas a Color* pag. 567-568

3.1.4.3. Tipos de Métodos

Hay varios tipos de métodos, los más importantes son:

- Dilución
- Difusión
- Pruebas Especiales

3.1.4.3.1. Método de Dilución

3.1.4.3.1.1. Dilución en Agar

Considerado un método de referencia se inocula placas que contienen una determinada cantidad de antibiótico con el microorganismo en estudio y luego se incuban, luego se observa si el microorganismo crece o no.⁴⁹

Determina la CMI en un medio sólido que contiene concentraciones crecientes del antibiótico.⁵⁰

3.1.4.3.1.2. Dilución en caldo

Se realiza en una serie de tubos (macrodilución) o microplacas (microdilución) contienen concentraciones crecientes de un determinado antibiótico.⁵¹

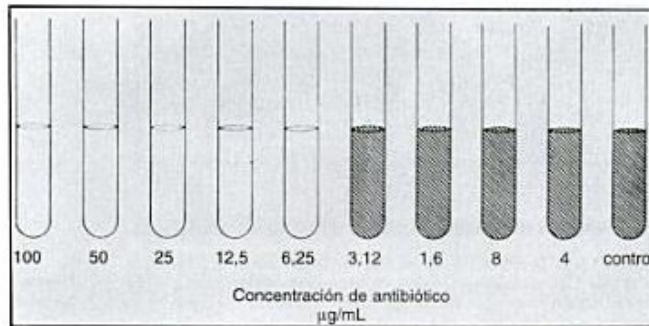
⁴⁹DELGADO IRRIBAREN, Alberto; *Laboratorio de Microbiología* pág. 155

⁵⁰KONEMAN, Elmer; ALLEN, Stephen; *Diagnostico Microbiológico* pág. 577

⁵¹ http://campus.usal.es/~micromed/Practicas_odontologia/unidades/labv/LabMicro/Antibiograma

3.1.4.3.1.2.1. Macro dilución en Caldo

Se determina la CMI y la CMB; realizando diluciones seriadas del agente antimicrobiano, después se agrega la suspensión bacteriana estandarizada.



Prueba de Suceptibilidad: Método Dilución en Caldo
KONEMAN, Elmer "Diagnóstico Microbiológico" Pag. 581

El último tubo no recibe antibiótico y sirve de control de crecimiento. Se incuba a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante 18 horas.⁵² Luego son observados a simple vista a fin de observar la turbidez, en aquellos tubos donde la bacteria se desarrolla y multiplica se observara turbio y cuando el antibiótico inhibe el crecimiento habrá una aclaración de toda la masa liquida del tubo; se observa cual es el último tubo que presenta turbidez. La concentración de sustancia antimicrobiana siguiente a esta, es la que corresponde a la CMI⁵³. La CMB se detecta subcultivando el caldo de los tubos en placas con el medio de cultivo y observando el desarrollo o no de colonias, después de incubar 18 horas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$.⁵⁴

⁵²KONEMAN, Elmer; ALLEN, Stephen; *Diagnostico Microbiológico Texto y Atlas a Color* pág. 795 - 801

⁵³ DELGADO, Alberto "LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA" pág. 156.

⁵⁴KONEMAN, Elmer; ALLEN, Stephen; *Diagnostico Microbiológico* pág. 583

3.1.4.3.1.2.2. Micro dilución en Caldo

Se puede evaluar múltiples antibióticos en una misma micro placa y la posibilidad de automatización es realizada en micro placas de plástico.⁴⁶

3.1.4.3.2. Método por Difusión (kirby-bauer)

En este caso el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar y luego se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antimicrobiano⁵⁵, puede realizarse por medios cuantitativos clasificando a los microorganismos en sensible, intermedio y resistente a la sustancia a evaluar de acuerdo al Committee for Clinical Laboratories Standards (NCCLS).⁵⁶ Las placas serán incubadas por 16 – 18 horas a 36°C + 1, durante la incubación el antimicrobiano difunde radialmente desde el disco y su concentración a medida que se aleja ira disminuyendo a medida que se aleja del disco, de tal forma que llegara un momento en el que el antimicrobiano será incapaz de inhibir al microorganismo y se producirá una zona de inhibición.⁵⁷

⁵⁵ <http://escuela.med.puc.cl/publ/boletin/laboratorio/Interpretacion.html>

⁵⁶ KONEMAN, Elmer; ALLEN, Stephen; *Diagnostico Microbiológico* Texto y Atlas a Color, Editorial Panamericana. Bogotá 1999 pág. 797

⁵⁷ ABARCA Katia, GARCIA Patricia, VIAL Pablo; *Microbiología clínica*; Universidad Católica de Chile. Chile. 2001 pág. 187

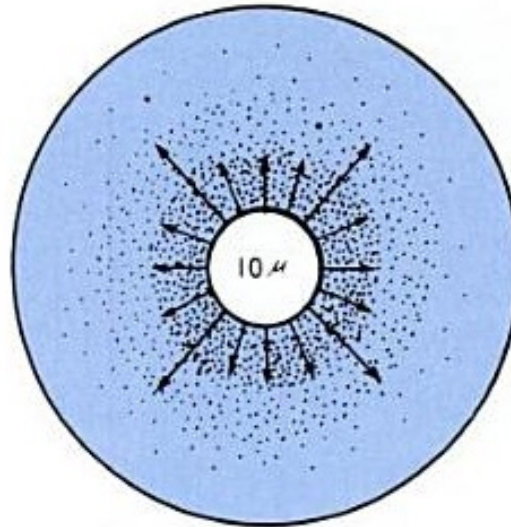


Figura 17-15 Principio de la difusión del antibiótico en el agar. La concentración del antibiótico disminuye a medida que aumenta la distancia desde el disco.

KONEMAM, Elmer "Diagnóstico Microbiológico"
Pág. 583

3.2. Antecedentes Investigativos

3.2.1. "Una revisión sistemática de la evidencia de los arándanos y los arándanos en la prevención de infección urinaria", Jepson RG , Craig JC.

La Biblioteca Cochrane Plus, número 3, 2008. Oxford, Update Software Ltd.

En esta revisión se evalúa la eficacia de los productos de arándano y arándanos en la prevención de infecciones sintomáticas del tracto urinario (ITU). Los criterios de selección fueron aleatorizados o cuasi-aleatorizados controlados de arándano o jugo de arándano / productos para la prevención de las infecciones urinarias sintomáticas. Una búsqueda exhaustiva se realizó en noviembre de 2006 después de lo cual dos revisores evaluaron de forma

independiente y extrajeron los datos. La calidad se evaluó mediante los criterios Cochrane. Los riesgos relativos (RR) se calcularon en su caso, de lo contrario una síntesis narrativa se llevó a cabo. No se identificaron ensayos pertinentes de los productos de arándano fueron identificados. Nueve ensayos de productos de arándano cumplieron los criterios de inclusión. En cuatro de buena calidad ensayos controlados aleatorios (ECA), los productos de arándano redujeron significativamente la incidencia de infecciones urinarias sintomáticas en 12 meses (RR general 0,65, IC 95%: 0,46-0,90) en comparación con placebo/ control. Cinco ensayos no se incluyeron en los metanálisis debido a la falta de datos adecuados. Sin embargo, sólo uno informó un resultado significativo. Los efectos secundarios fueron comunes, y las pérdidas de seguimiento / retiro de varios de los ensayos fueron altas (> 40%). Hay algunas pruebas de cuatro ECA de buena calidad que el jugo de arándano puede reducir el número de IU sintomáticas durante un período de 12 meses, sobre todo en mujeres con IU recurrentes. No se sabe si es eficaz en otros grupos susceptibles.

3.2.2. “Comparación simultánea de arándano (*vacciniummyrtillus* L.) y arándano (*vacciniumcorymbosum* L) los frutos de su composición de antocianinas, actividad antimicrobiana y antioxidante” ,Burdulis D , A Sarkinas , Jasutiené I , Stackevicené E , Nikolajevas L , V Janulis.

Journal Article, Research Support, Non-U.S. Gov't, Comparative Study. ActaPoloniaePharmaceutica2009.

El objetivo de este estudio fue investigar y comparar la composición de antocianinas, antimicrobianos y la actividad antioxidante en frutos de arándano y el arándano y sus pieles. Las investigaciones revelaron que la mayor cantidad de antocianinas totales se observó en las pieles de las frutas de las variedades de arándanos. Los resultados, obtenidos mediante análisis cromatográfico, se indica que la cianidina es una antocianidina dominante en el arándano y malvidina en muestras de arándanos. Extractos de "Herbert", "Coville", "Toro" cultivares de arándanos y frutos de arándano revelado propiedades antimicrobianas. *Citrobacterfreundii* (ATCC 8090) y *Enterococcusfaecalis* (ATCC29212) fueron los más sensibles entre ocho bacterias Gram-negativas probadas y Gram-positivas. Las diferencias significativas entre las bayas y extractos de piel no fueron establecidas. Los estudios con frutos mostraron que la actividad antioxidante más potente posee cultivar arándano "Berkeley" (82,13 + / - 0,51%). Mientras tanto, la cantidad de enfriamiento rápido radicales libres en muestras de arándano fue 63,72 + / - 1,11%, respectivamente. La actividad antioxidante más bajo se estimó en cultivar arándanos "Coville". En consecuencia, las fuertes propiedades antirradicales se estima en arándanos cultivar piel de las frutas "ama". Muestras de piel de fruta de arándano poseen actividad antirradical fuerte también (82,69 + / - 0,37%).

4. HIPOTESIS

Dado que el blueberry posee componentes como proantocianidinas, ácido clorogénico y flavonoides, responsables de propiedades antibacterianas; que la concentración mínima bactericida es capaz de destruir microorganismos de una muestra inoculada en condiciones estandarizadas; que la concentración mínima inhibitoria es la menor concentración de antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un inóculo de bacterias estandarizadas y que la clorhexidina al 2% es una sustancia antiséptica de acción bactericida y fungicida que altera la membrana de la célula microbiana:

Es probable que el extracto de blueberry a Concentración Mínima Bactericida sea más eficaz que el extracto de Blueberry a Concentración Mínima Inhibitoria, que la Clorhexidina al 2% y que el Control Negativo en la de inhibición de *PorphyromonaGingivalis* in vitro.



CAPITULO II

PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

II PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

1. TECNICA, INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACION

1.1 Técnica

1.1.1 Precisión de la técnica

En este trabajo de investigación se optó por usar la técnica de observación microbiológica laboratorial.

1.1.2 Esquematización de la técnica

TABLA DE TECNICAS			
VARIABLES	INDICADORES	TECNICA	PROCEDIMIENTO
PorphyromonasGingivalis	Diámetro del halo de inhibición	Observación microbiológica	Medición

1.1.3 Descripción de la técnica

La técnica que se usó en este trabajo de investigación es la observación microbiológica de los Discos de Sensibilidad de las Placas Petri para determinar la Concentración mínima inhibitoria (CMI) y la Concentración mínima bactericida (CMB) previa identificación de estas concentraciones en tubos con

Porphyromonas Gingivalis a las que se les aplicara concentraciones de Extracto de Blueberry para luego realizar la medición de estos en discos de Sensibilidad en las placas Petri, logrando identificar que concentración es la más eficaz; teniendo en consideración los grupos controles positivo y negativo de crecimiento bacteriano.

Método de Obtención del Extracto de Blueberry

Primero se obtuvo la materia prima de blueberry procedentes del mercado san camilo.

Se realizó el lavado con agua potable, la desinfección fue con alcohol de 70°; seguidamente se llevó al horno a temperatura constante de 70°C durante dos días hasta lograr la desecación completa de todos los blueberries; luego se homogenizo y peso quedando 92 gr de 500 gr de materia prima de blueberry, los que se maceraron durante 24horas con etanol; para luego llevarlos al rotavapor, donde se eliminó el etanol y finalmente a la estufa esterilizadora para terminar la eliminación de etanol y desinfección final del producto: extracto de blueberry al 50%.

Determinación del Efecto Antibacteriano del Extracto de Blueberry sobre Porphyromonas Gingivalis

La cepa certificada de Porphyromonas Gingivalis fue reactivada en caldo tioglicolato y luego sembrada en agar sangre para ser llevada por 48 horas a la cámara de anaerobiosis al 10% de CO_2 .

1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Método: Dilución en Tubos (Tioglicolato)

Fundamento:

Se basa en la sensibilidad del microorganismo y la exposición de diluciones con diferentes concentraciones del bactericida, luego se determina la concentración de la droga, que inhibe el crecimiento bacteriano mediante inspección visual. (no presenta turbidez).

Preparación del Inoculo:

Con una asa de kohle estéril se recogen de 4 a 5 colonias, que han sido aisladas, se sumergió el asa de kohle en 10 ml de caldo Tioglicolato descargándose todo el material bacteriano y retirar el asa.

El resultado de la turbidez del medio debe ser semejante a 0.5 de la Escala de Mc. Farland. La cual equivale a una concentración de 10^8 UFC/ml.

Se realizaron concentraciones decrecientes de la suspensión bactericida en diluciones de de 1000 μ l, 800 μ l, 600 μ l, 400 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 50 μ l, 25 μ l; en 8 tubos de ensayo conteniendo 1000 μ l de caldo tioglicolato e inóculo de Porphyromonas Gingivalis con una micro pipeta a cada tubo de ensayo.

Se incubó a 37°C por 24 horas.

Se observó la turbidez de los tubos para hallar el punto de ruptura o quiebre, tubo N° 4.

2. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Método: Dilución en Agar Sangre

Fundamento:

Determinar la concentración más baja de la sustancia en investigación que produce la muerte del 99.9% de bacterias.

Procedimiento

Se sembró en placas Petri con agar sangre el contenido de los tubos con las diferentes concentraciones del extracto de blueberry y el inóculo, incubándolas a 37°C por 24 horas en anaerobiosis; luego se observó el crecimiento bacteriano en las placas Petri

determinando que no se observó crecimiento en la placa Petri que contenía al tubo N° 3.

Determinación de la Sensibilidad Antimicrobiana por medio de los Halos de Inhibición

Método: Susceptibilidad de Difusión en Discos (Kirby-Bauer).

Fundamento:

Impregnar un disco en la suspensión bactericida, luego tomar contacto con el medio sólido, previamente sembrado. La actividad de la suspensión bactericida se evalúa midiendo en mm. El diámetro del halo formado.

Los agentes antimicrobianos se difunden en el medio sólido en forma radial alrededor del disco e inhiben el desarrollo de microorganismos en la zona donde su concentración es óptima.

Procedimiento:

Se saturo en un hisopo la suspensión bacteriana, luego estriar en la placa Petri con agar sangre (rotando la placa 60°), logrando un inóculo uniforme en toda la superficie de la placa Petri.

Colocar los discos de papel filtro impregnados de la CMI, (extracto de blueberry al 20%), CMB (extracto de blueberry al 25 %), clorhexidina al 2% (control positivo+) y disco de papel filtro (control negativo-)

Incubar a 37°C en anaerobiosis, medir los halos.

1.1.4 Diseño investigativo

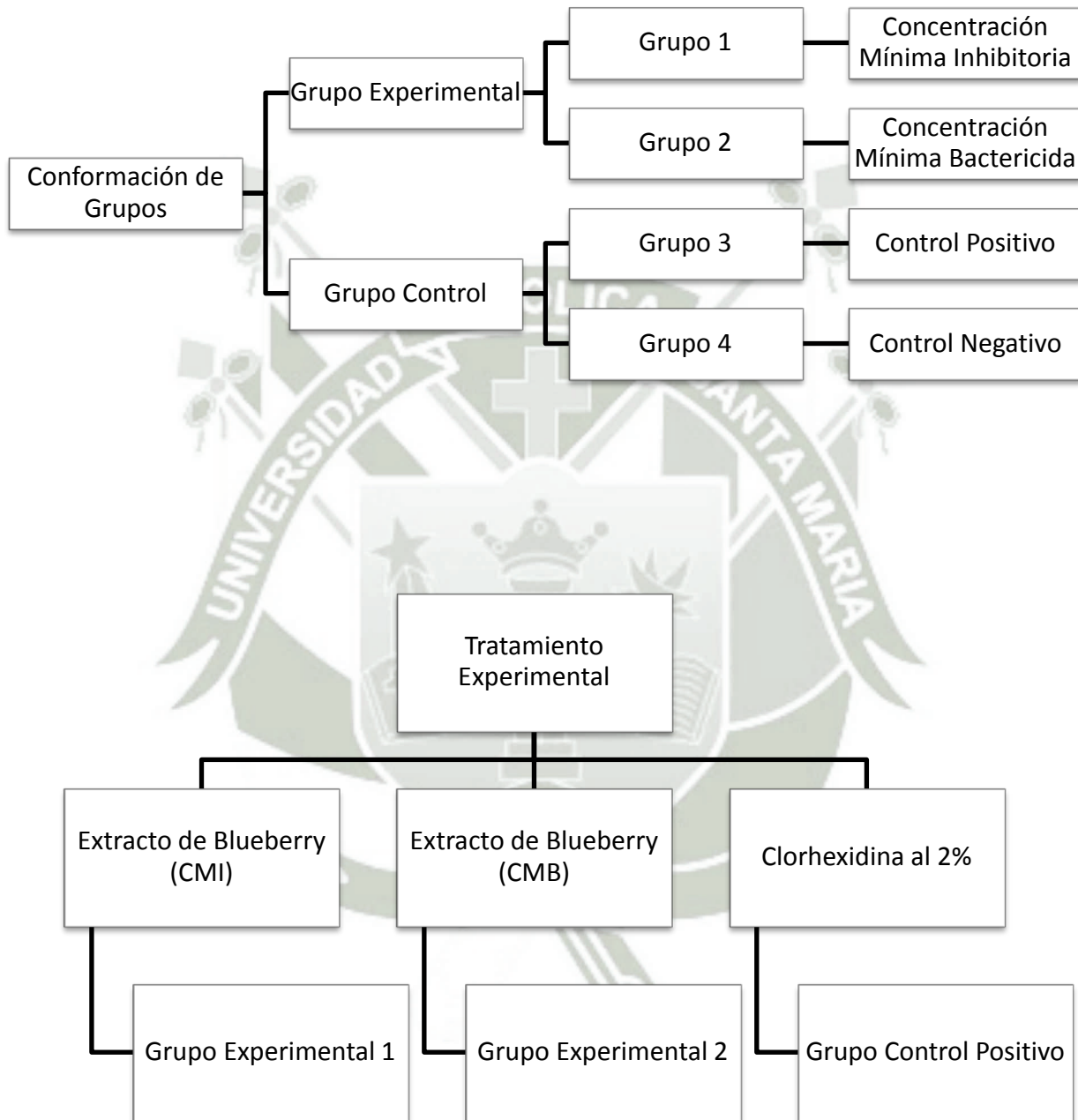
1.1.4.1 Tipo

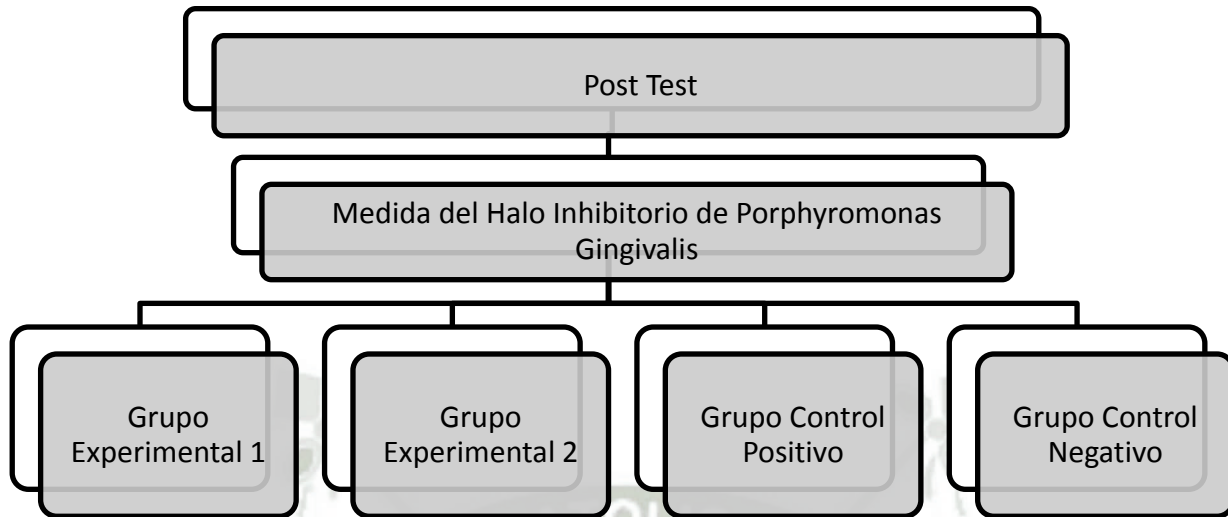
Esta investigación tiene un diseño Cuasi experimental, sin Pre test y con Post test único.

1.1.4.2. Esquema Básico

GE ₁		Extracto de Blueberry (CMI)	O ₂
GE ₂		Extracto de Blueberry (CMB)	O ₂
GC ₊		Clorhexidina al 2%	O ₂
GC ₋		-----	O ₂

1.1.4.3. Diagramación Operativa





COMPARACION				
FASES	GRUPO EXPERIMENTAL 1	GRUPO EXPERIMENTAL 2	GRUPO CONTROL POSITIVO	GRUPO CONTROL NEGATIVO
POST TEST	↔		↔	
	↔			
	↔			
	↔		↔	

1.2. Instrumentos

1.2.1. Instrumento documental

1.2.1.1. Precisión

Ficha de observación microbiológica.

1.2.1.2. Estructura del Instrumento

VARIABLES	ITEMS	INDICADORES	SUBITEMS
Extracto de Blueberry	1	Concentración mínima Inhibitoria (CMI)	1.1
		Concentración mínima Bactericida (CMB)	1.2
PorphyromonasGingivalis	2	Diámetro del halo de inhibición en mm	2.1

1.2.2. Instrumentos Mecánicos

- Estufa
- Mechero de bunsen
- Autoclave
- Cocina eléctrica
- Micropipetas 10, 50, 100 ul
- Rotavapor
- Cámara de anaerobiosis

1.2.3. Materiales

1.2.3.1. Materiales de Laboratorio

- Placas Petri
- Tubos de ensayo
- Matraz
- Bagaeta
- Asa de kolle
- Hisopos estériles
- Gradilla para tubos de ensayo

1.2.3.2. Materiales biológicos

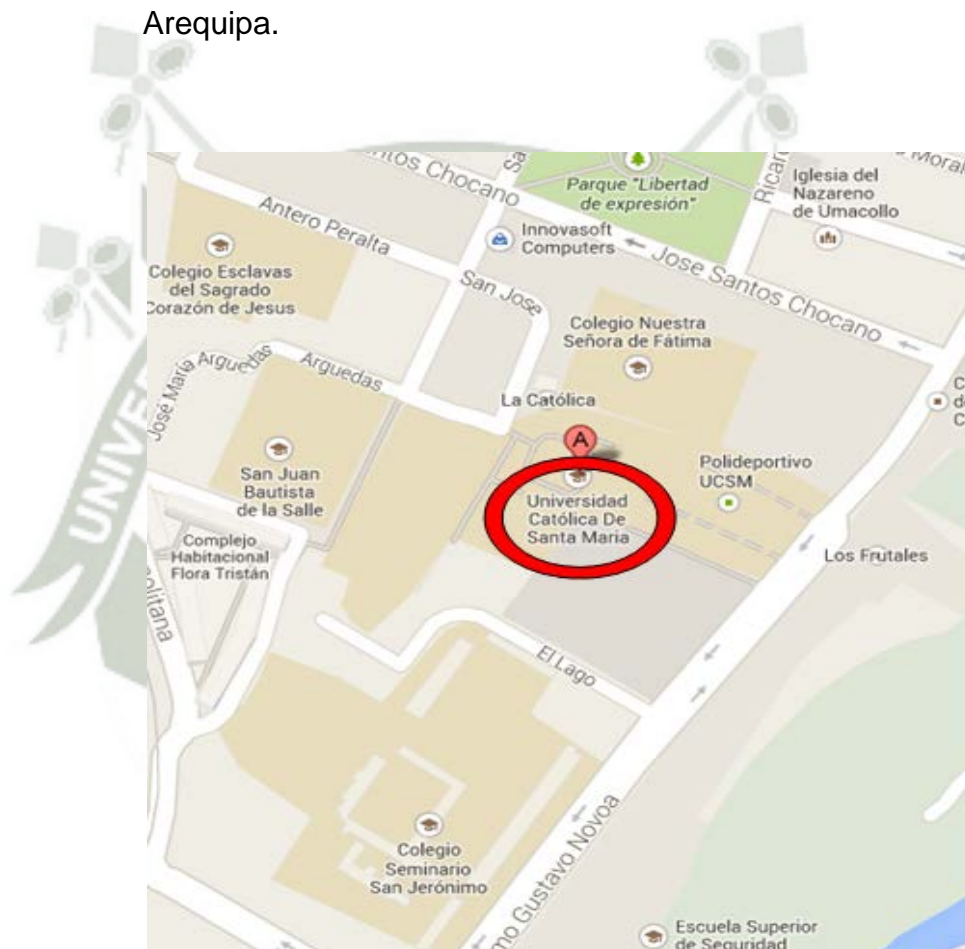
- cepa certificada de PorphyromonasGingivalis
- Blueberry
- Agar sangre
- Caldo Tioglicolato

2. CAMPO DE VERIFICACION

2.2. Ámbito espacial

2.2.1. Ámbito General de la investigación

La investigación se realizó en el departamento de Arequipa, provincia de Arequipa, en las instalaciones de la Universidad Católica de Santa María; ubicada en Urb. San José s/n, distrito de Arequipa.



2.2.2. **Ámbito Específico de la Investigación**

La investigación tiene por ubicación específica los laboratorios de la Universidad Católica de Santa María en el pabellón H – 403.

2.3. **Temporalidad**

La investigación fue realizada en los meses de diciembre 2013 a febrero 2014.

2.4. **Unidades de estudio**

2.4.1. **Opción**

Grupos

2.4.2. **Unidades de análisis**

Discos de Sensibilidad

2.4.3. **Identificación de los grupos**

Grupo 1: Este grupo está representado por Discos de Sensibilidad colocados en Placas Petri sembradas con *Porphyromonas Gingivalis* bajo la influencia del extracto de blueberry de las cuales se destacara la Concentración determinada como CMI.

Grupo 2: Este grupo está representado Discos de Sensibilidad colocados en Placas Petri sembradas con *Porphyromonas*

Gingivalis bajo la influencia de blueberry de las cuales se destacara la concentración determinada como CMB.

Grupo 3: Este grupo está representado por Discos de Sensibilidad colocados en Placas Petri sembradas con Porphyromonas Gingivalis bajo la influencia de Clorhexidina al 2% usado como Control Positivo de crecimiento bacteriano determinado como Control +.

Grupo 4: Este grupo está representado por Discos de Sensibilidad colocados en Placas Petri sembradas con Porphyromonas Gingivalis usado como Control Negativo de crecimiento bacteriano determinado como Control - .

2.4.4. Control de los grupos

2.4.4.1. Criterios de inclusión

- Naturaleza de la cepa: Porphyromonas Gingivalis
- Ambiente adecuado para el crecimiento y desarrollo de la cepa

2.4.4.2. Criterios de exclusión

- Otras cepas
- Contaminación del ambiente para el crecimiento y desarrollo de la cepa

2.4.5. Número de réplicas

Se asigna las unidades de estudio a cada grupo de manera aleatoria y para la conformación del tamaño de grupo se la siguiente formula: para poblaciones infinitas y tamaño desconocido:

$$n = \frac{Z\alpha^2 \cdot p \cdot q}{E^2}$$

$Z\alpha = 1.96$ cuando el error $\alpha = 0.05$

$p =$ Probabilidad de que ocurra el evento (99%).

$q = 100 - p.$

$E =$ Error muestral 6% (1 a 10%).

Aplicando la formula se obtiene: 10.6 por lo que se redondea a 11

$n = 11$ Discos de Sensibilidad.

2.4.6. Formalización de los grupos

GRUPOS	NUMERO
Grupo 1	11 Discos de Sensibilidad
Grupo 2	11 Discos de Sensibilidad
Grupo 3	11 Discos de Sensibilidad
Grupo 4	11 Discos de Sensibilidad

3. ESTRATEGIA DE RECOLECCION

3.2. Organización

- Presentación de la solicitud de autorización al Coordinador de Laboratorios y Gabinetes para uso de los laboratorios pertinentes para el desarrollo de la investigación
- Compra de cepas de microorganismo en estudio (*Porphyromonas Gingivalis*)
- Elaboración del extracto de blueberry por el método convencional
- Formalización de los grupos
- Ejecución del estudio laboratorial
- Recolección de datos

3.3. Recursos

3.3.1. Recursos Humanos

- Investigador : FlordelizLideny Pastor Aguilar
- Asesor: Dr. Víctor Colque Valladares

3.3.2. Recursos Físicos

Representado por las disponibilidades infraestructurales de:

- Laboratorios clínicos de la Universidad Católica de santa María
- Biblioteca de la Universidad Católica de santa María
- Internet

3.3.3. Recursos Económicos

El presente trabajo de investigación fue autofinanciado por la investigadora tanto para la recolección de datos y otras acciones investigativas.

3.3.4. Recursos Institucionales

Laboratorio clínico de la Universidad Católica de Santa María

3.4. Prueba Piloto

La Prueba Piloto fue de tipo incluyente, validada con dos unidades de análisis, que representan el 5% del total de unidades; se procedió a sembrar *Porphyromonas Gingivalis* en dos placas Petri con agar sangre a las que se les agrego el extracto de blueberry impregnado en dos discos de sensibilidad, uno para cada Placa Petri; luego fueron incubados a 37°C en anaerobiosis.

El resultado obtenido de esta prueba piloto fue un halo de Inhibición de 25 mm.

De esta manera se garantiza la validez y confiabilidad del instrumento así como de los datos que se recogieron.

4. ESTRATEGIA PARA MANEJAR LOS RESULTADOS

4.2. Plan de sistematización

El procesamiento se realizó en cuadros estadísticos y computarizados de acuerdo a las siguientes operaciones:

4.2.1. Clasificación

Una vez obtenida la muestra, los datos fueron ordenados en una matriz de registro y control

4.2.2. Recuento

Los datos clasificados se contabilizaron manualmente empleando matrices de conteo

4.2.3. Graficación

A fin de que las gráficas expresen claramente toda la información contenida en los cuadros el tipo de grafico que más parece adecuarse es “diagrama de barra simple”.

4.2.4. Plan de Tabulación

Se utilizó tablas de doble entrada para la tabulación de datos

4.3. Plan de Estudio de los Datos

4.3.1. Metodología de la Interpretación

Se apeló a la jerarquización de datos y apreciación crítica.

4.3.2. Análisis de Datos

Se empleó un análisis cuantitativo, cuyo tratamiento estadístico se sintetiza en el siguiente cuadro:

VARIABLE INVESTIGATIVA	CARÁCTER ESTADISTICO	ESCALA DE MEDICION	ESTADISTICA DESCRIPTIVA	PRUEBA
Cepas Certificadas de Porphyromonas Gingivalis.	Cuantitativa	De Razón	Medida de tendencia central: Moda Desviación típica o estándar Rango	ANOVA TUKEY

4.3.3. Modalidades Interpretativas

Se optó por una interpretación subsiguiente a cada cuadro y una discusión global de los datos.

4.3.4. Operaciones para la Interpretación de Cuadros

Fueron formuladas en respuestas a interrogantes básicas, objetivos e hipótesis del plan de investigación.

4.3.5. Niveles de Interpretación

Interpretación general y analógica.

4.4. Plan de Conclusiones

Las conclusiones fueron formuladas por indicadores respondiendo a las interrogantes, objetivos e hipótesis del plan de investigación.

4.5. Plan de Recomendaciones

Estas asumieron la forma de simples sugerencias las cuales fueron orientadas básicamente al ejercicio de la profesión y a enriquecer la línea investigativa.



SISTEMATIZACION Y ESTUDIO DE LOS DATOS

TABLA Nº. 1

EFICACIA IN VITRO DE LA CONTENRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI) DEL
EXTRACTO DE BLUEBERRY AL 20% EN EL DIAMETRO DEL HALO INHIBITORIO
DE CEPAS CERTIFICADAS DE PORPHYROMONAS GINGIVALIS

EXTRACTO DE BLUEBERRY AL 20% (CMI)	DIAMETRO DEL HALO INHIBITORIO				
	\bar{x} /mm	S	$X_{\text{máx.}} - X_{\text{min.}}$	R	Nº
	13.73	1.19	15 - 11	4	11

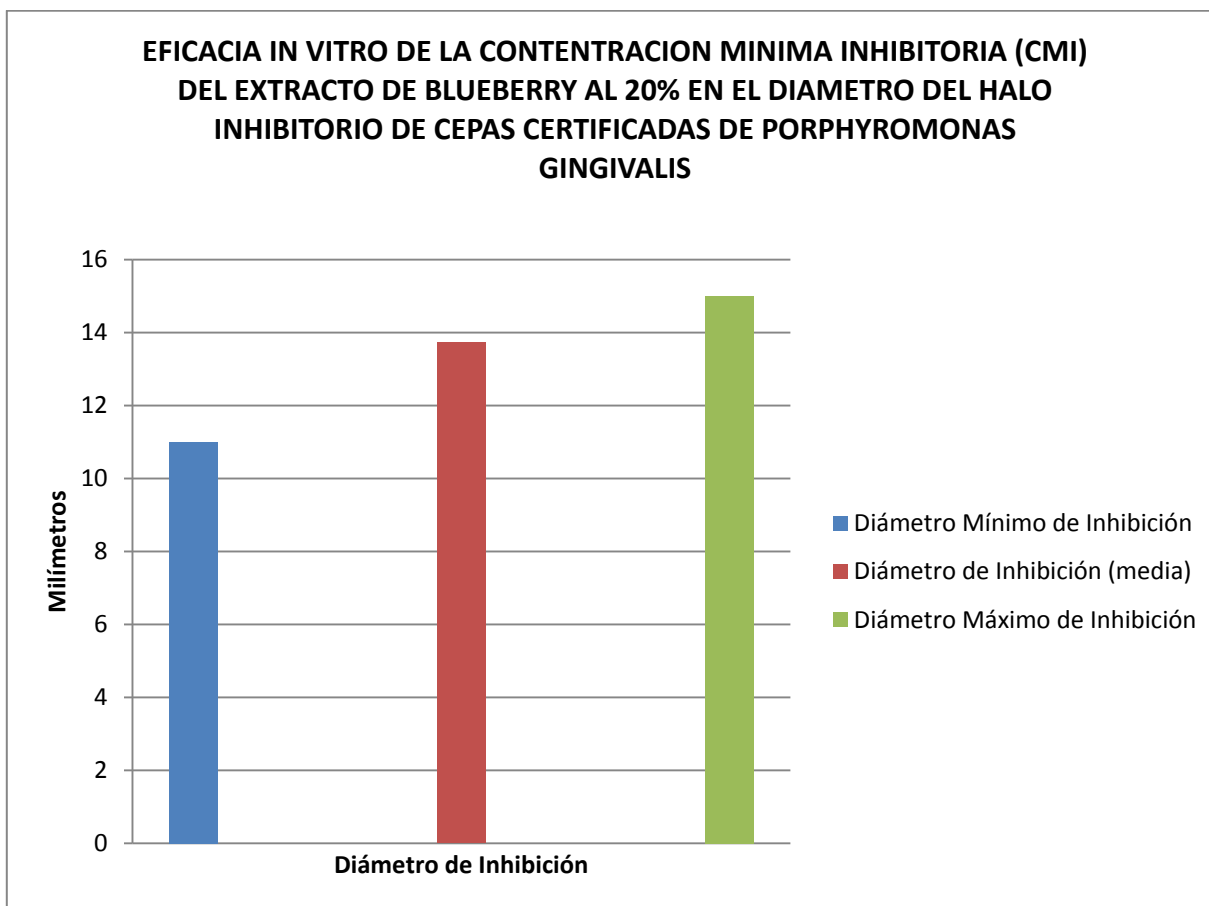
FUENTE: Elaboración Personal

LEYENDA:

- \bar{x} = Media
- S = Desviación Estándar
- $X_{\text{máx}}$ = Valor Máximo
- $X_{\text{min.}}$ = Valor Mínimo
- R = Rango
- Nº = Numero de muestra

La tabla Nº. 1, muestra que el diámetro de inhibición bacteriana del extracto de blueberry al 20% fue de 13.73 mm y se obtuvo un diámetro mínimo de 11.00 mm y un diámetro máximo de 15.00 mm.

GRAFICO N°1



FUENTE: Elaboración Personal

TABLA Nº. 2

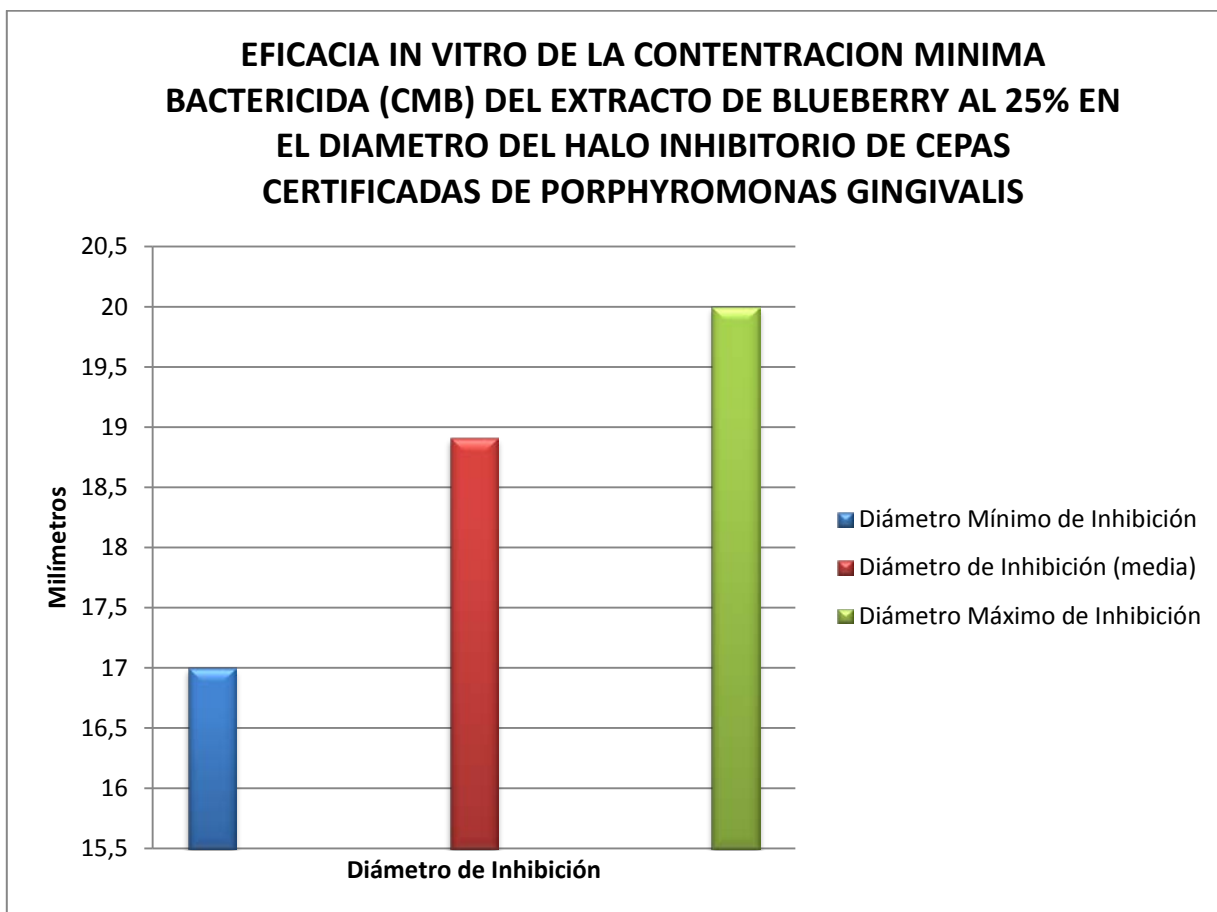
EFICACIA IN VITRO DE LA CONTENCIÓN MINIMA BACTERICIDA (CMB) DEL
EXTRACTO DE BLUEBERRY AL 25% EN EL DIAMETRO DEL HALO INHIBITORIO
DE CEPAS CERTIFICADAS DE PORPHYROMONAS GINGIVALIS

EXTRACTO DE BLUEBERRY	DIAMETRO DEL HALO INHIBITORIO				N°
	\bar{x}/mm	S	X máx. - X mín.	R	
AL 25% (CMB)	18.91	0.83	20 - 17	3	11

FUENTE: Elaboración Personal

La tabla Nº. 2, muestra que el diámetro de inhibición bacteriana del extracto de blueberry al 25% fue de 18.91 mm y se obtuvo un diámetro mínimo de 17.00 mm y un diámetro máximo de 20.00 mm.

GRAFICO N°2



FUENTE: Elaboración Personal

TABLA N° 3

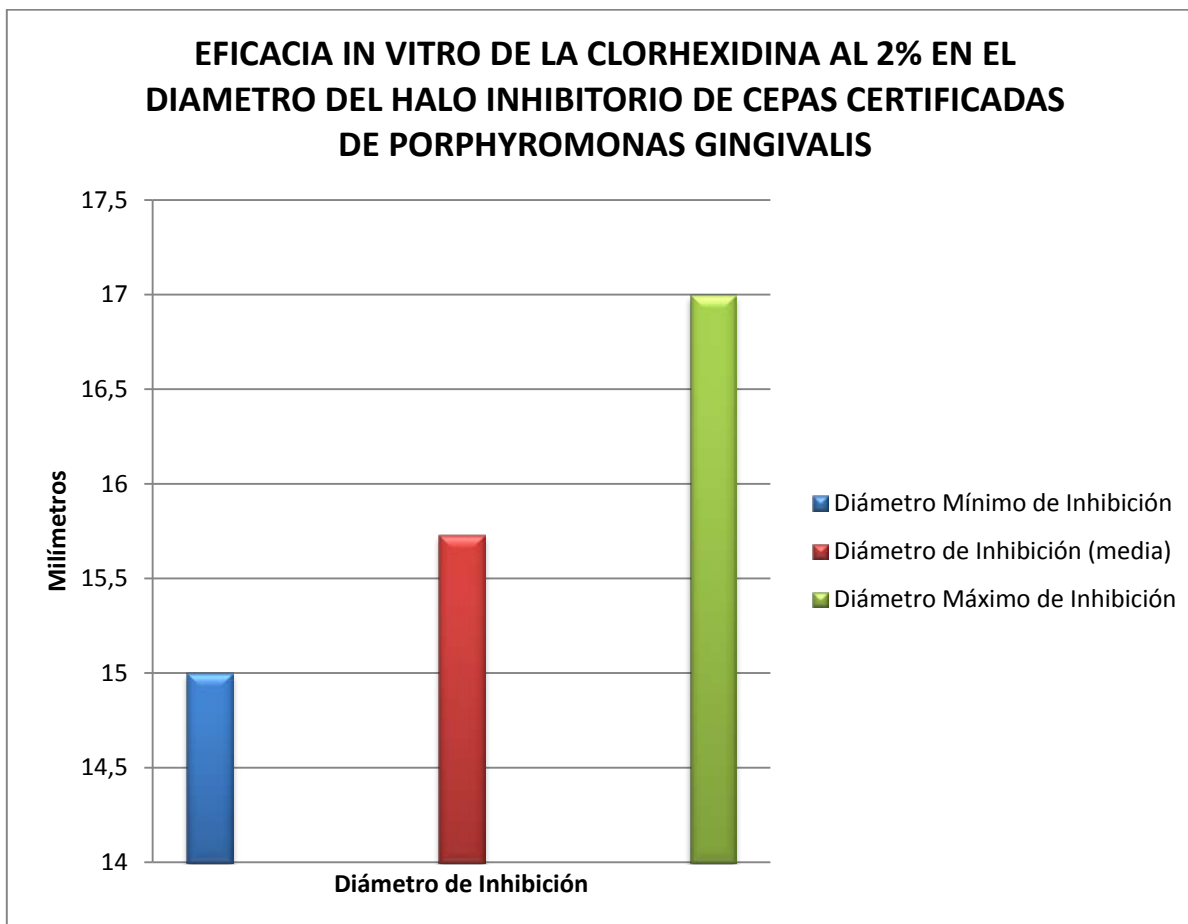
EFICACIA IN VITRO DE LA CLORHEXIDINA AL 2% EN EL DIAMETRO DEL HALO INHIBITORIO DE CEPAS CERTIFICADAS DE PORPHYROMONAS GINGIVALIS

CLORHEXIDINA AL 2%	DIAMETRO DEL HALO INHIBITORIO				
	\bar{x}/mm	S	$X_{\text{máx.}} - X_{\text{min.}}$	R	N°
	15.73	1.01	17 - 15	2	11

FUENTE: Elaboración Personal

La tabla N°. 3, muestra que el diámetro de inhibición bacteriana del grupo control positivo (clorhexidina al 2%) fue de 15.73 mm y se obtuvo un diámetro mínimo de 15.00 mm y un diámetro máximo de 17.00 mm.

GRAFICO N°3



FUENTE: Elaboración Personal

TABLA Nº. 4

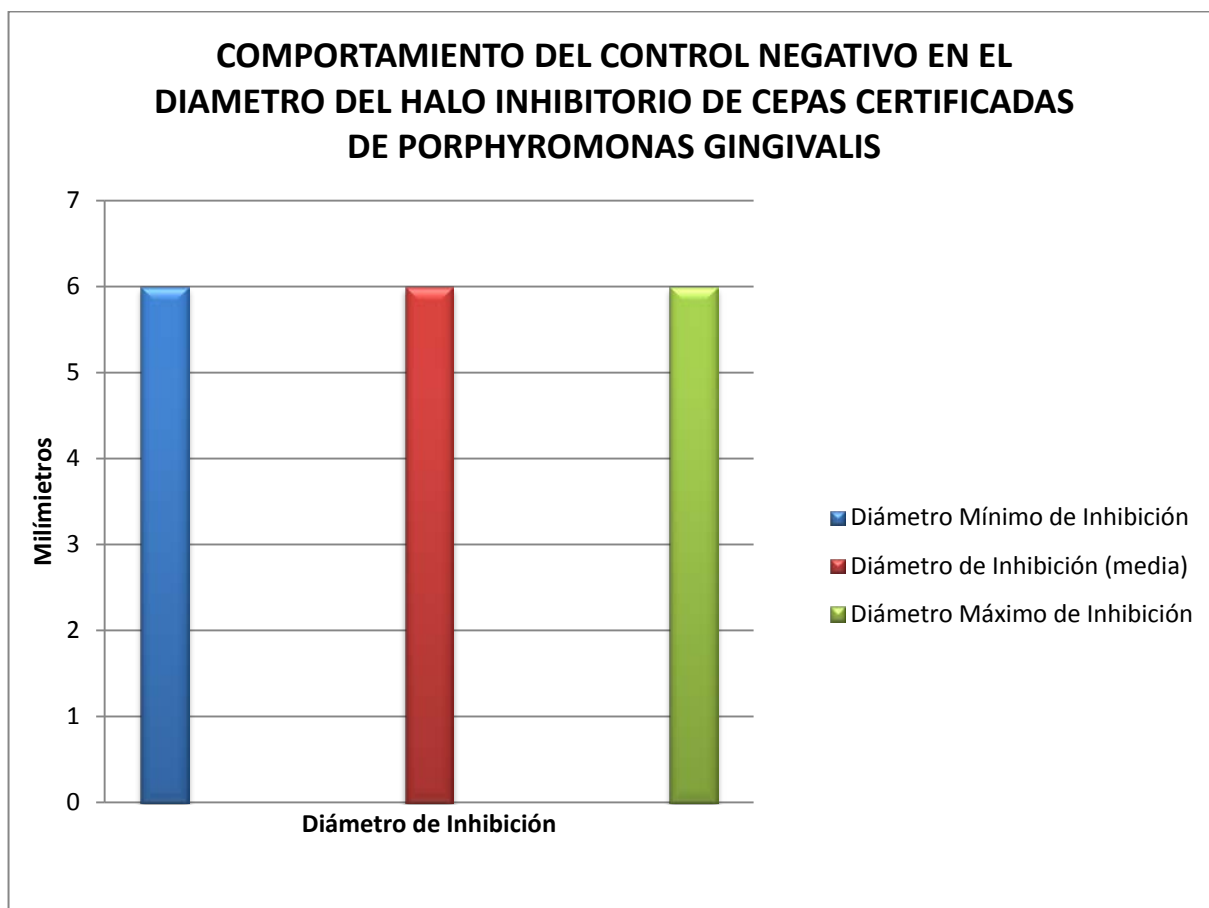
COMPORTAMIENTO DEL CONTROL NEGATIVO EN EL DIAMETRO DEL HALO
INHIBITORIO DE CEPAS CERTIFICADAS DE PORPHYROMONAS GINGIVALIS

CONTROL NEGATIVO	DIAMETRO DEL HALO INHIBITORIO				
	\bar{x}/mm	S	$X_{\text{máx.}} - X_{\text{mín.}}$	R	Nº
	6	0	6 - 6	0	11

FUENTE: Elaboración Personal

La tabla Nº. 4, muestra que el diámetro de inhibición bacteriana del Control Negativo fue de 6 mm y se obtuvo un diámetro mínimo de 6 mm y un diámetro máximo de 6mm.

GRAFICO N° 4



FUENTE: Elaboración Personal

TABLA N°5

EFICACIA IN VITRO DEL EXTRACTO DE BLUEBERRY A CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI) DEL 20%, A CONCENTRACION MINIMA BACTERICIDA (CMB) DEL 25%, DE LA CLORHEXIDINA AL 2% Y DEL CONTROL NEGATIVO EN EL DIAMETRO DEL HALO INHIBITORIO DE CEPAS CERTIFICADAS DE PORPHYROMONA GINGIVALIS

HALO INHIBITORIO			
EXTRACTO DE BLUEBERRY AL 20%	EXTRACTO DE BLUEBERRY AL 25%	CLORHEXIDINA AL 2%	CONTROL NEGATIVO
\bar{x}_1	\bar{x}_2	\bar{x}_3	\bar{x}_4
13.73	18.91	15.73	6

FUENTE: Elaboración Personal

FUENTES DE VARIABILIDAD	SUMA DE CUADRADOS	GL	MEDIA CUADRÁTICA	F	VALOR DE P.	α
Inter-grupos	995,364	3	331,788	424,380	0,000239	0.05
Intra-grupos	31,273	40	,782			
Total	1026,636	43				

N	Subconjunto para alfa = .05			
	CONTROL NEGATIVO	EXTRACTO DE BLUEBERRY AL 20%	CLORHEXIDINA AL 2%	EXTRACTO DE BLUEBERRY AL 25%
11 11 11 11	6,0000	13,7273	15,7273	18,9091

La tabla N°.5, muestra que el diámetro del halo inhibitorio del extracto de blueberry al 20% fue de 13.73 mm; del extracto de blueberry al 25% fue de 18.91 mm, de la clorhexidina al 2% fue de 15.73 mm y del control positivo fue 6 mm.

Así mismo según el análisis de varianza de un factor de variabilidad ($F=424.38$), se muestra que el diámetro del halo inhibitorio en los cuatro grupos presento diferencias estadísticas significativas ($P<0.05$). Es decir que al menos un promedio de los cuatro grupos es diferente de los demás.

Y la prueba de Tukey nos demuestra la eficacia que poseen los estímulos en el diámetro del halo inhibitorio de cepas certificadas de *PorphyromonasGingivalis*, siendo el más eficaz el extracto de blueberry al 25%, seguido por la clorhexidina al 2%, el extracto de blueberry al 20% y finalmente el control negativo.

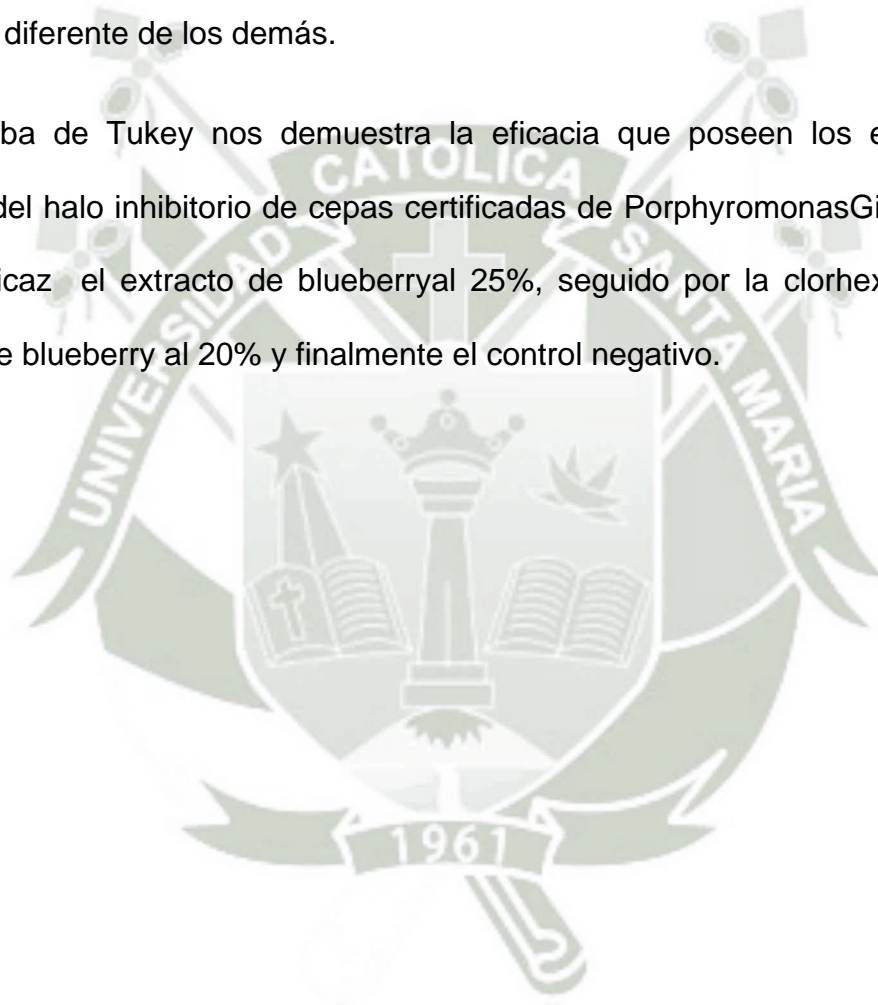
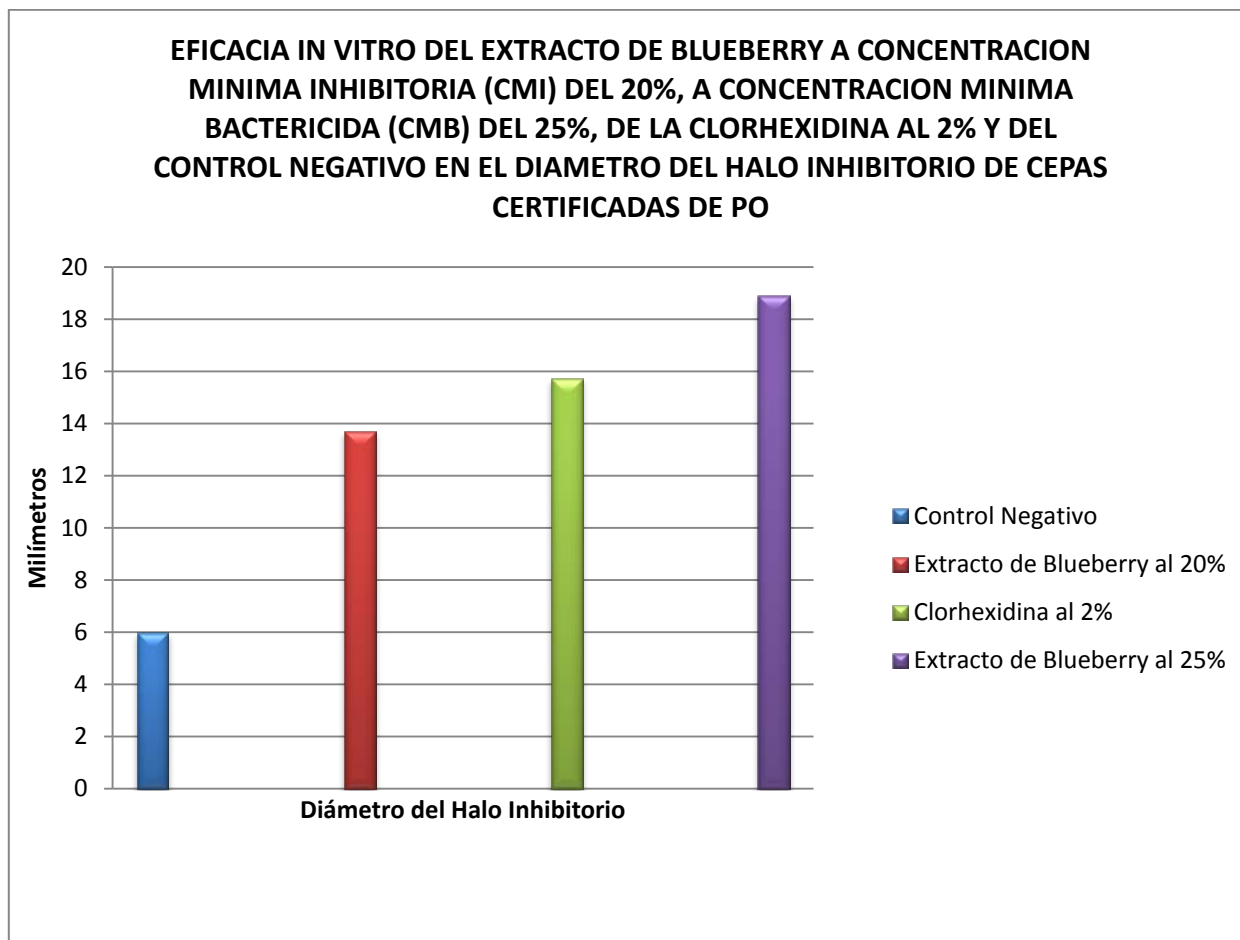


GRAFICO N° 4



FUENTE: Elaboración Personal

DISCUSION

En este trabajo de investigación se comprobó la eficacia del Extracto de Blueberry al 25% en el diámetro del halo inhibitorio de cepas certificadas de *PorphyromonasGingivalis*; con un diámetro de disco de sensibilidad de 18.91 mm, seguido por la Clorhexidina al 2% con un diámetro de disco de sensibilidad de 15.73 mm, el Extracto de Blueberry al 20% con un diámetro de disco de sensibilidad de 13.73 mm y el Control Negativo con un diámetro de disco de sensibilidad de 6 mm.

Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por JepsonRGyCraig JC que llegaron a la conclusión que el jugo de arándano puede reducir el número de infecciones urinarias sintomáticas provocadas por *EscherichiaColi* (bacilo gram negativo) durante un periodo de 12 meses, lo que demuestra el gran poder antibacteriano que posee el arándano en bacterias gram negativas.

Igualmente los de Burdulis D , A Sarkinas , Jasutiené I , Stackevicené E , Nikolajevs L , V Janulis quienes concluyeron que las propiedades antimicrobianas están el en fruto , antocianinas y antioxidantes en sus pieles, por otro lado realizaron pruebas con bacterias gram negativas y gram positivas determinando que de ocho bacterias probadas *Citrobacterfreundii* y *Enterococcusfaecalis* fueron las más sensibles a los arándanos; de tal forma queda comprobada la capacidad antibacteriana del arándano.

El Extracto de Blueberry al 25% es más eficaz por presentar una mayor concentración de blueberry y por el diámetro que posee su halo de inhibición que nos indica una potencia mayor en comparación a los diámetros de los halos inhibitorios de cepas certificadas de *PorphyromonasGingivalis*

Finalmente se determinó que *PorhpyromonasGingivalis* también es sensible al blueberry gracias a sus propiedades antibacterianas que serian las responsables de la eficacia del extracto de blueberry.



CONCLUSIONES

PRIMERA:

El extracto de blueberry a Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), es decir al 20% produjo un diámetro promedio del halo inhibitorio de *PorphyromonasGingivalis* de 13.73 mm.

SEGUNDA:

El extracto de blueberry a Concentración mínima Bactericida (CMB), es decir al 25% produjo un diámetro promedio del halo inhibitorio de *PorphyromonasGingivalis* de 18.91 mm.

TERCERA:

La Clorhexidina al 2% produjo un diámetro del halo de inhibitorio de *PorphyromonasGingivalis* de 15.73 mm.

CUARTA:

El crecimiento bacteriano en el control negativo presento un halo promedio de inhibición para la cepa antes mencionada de 6 mm.

QUINTA:

La Concentración mínima Bactericida (CMB), es decir el extracto de blueberry al 25% es más eficaz que el extracto de blueberry al 20%, la clorhexidina al 2% y el control negativo en el diámetro del halo inhibitorio de cepas certificadas de *PorphyromonasGingivalis*.

SEXTA

Consecuentemente, la hipótesis nula se rechaza, por ende la hipótesis alterna de la investigación se acepta con un nivel de significación de 0.05.



RECOMENDACIONES

PRIMERA:

Se recomienda a futuros tesisistas realizar más investigaciones del mecanismo de acción del extracto de blueberry sobre las diferentes especies patógenas como *Prevotella Intermedia* y *Actinomyces*, con la finalidad de utilizarlo como una alternativa terapéutica en el área de periodoncia.

SEGUNDA:

Se recomienda a los odontólogos la utilización del extracto de blueberry como materia prima para elaborar productos que puedan ayudar a disminuir *Porphyromonas Gingivalis* y de esta manera reducir enfermedades periodontales.

TERCERA:

Se sugiere realizar investigaciones del extracto de blueberry para su utilización en endodoncia como irrigante, ya que posee componentes de gran utilidad para este ámbito.

CUARTA:

Se sugiere realizar investigaciones del extracto de blueberry para su utilización en cariólogía como desinfectante por sus propiedades antibacterianas de gran utilidad para este fin.

BIBLIOGRAFIA

- ABARCA Katia, GARCIA Patricia, VIAL Pablo; *Microbiología clínica*; Universidad Católica de Chile. Chile. 2001.
- BROOKS, Geo; *Microbiología Médica*; Editorial Manual Moderno. México .1999.
- COLLINS, C.H.; LYNE, Patricia; *Métodos Microbiológicos*; Editorial Acribia S.A. España. 1989.
- DELGADO IRRIBAREN, Alberto; *Laboratorio de Microbiología*, Editorial Interamericana, Madrid 1994.
- GRANADOS PEREZ, Raquel; VILLAVERDE, Carmen; *Microbiología Bacteriología Características y Clasificación Bacteriana Virología Características y Técnicas Bioquímicas*; Editorial Paraninfo. Madrid 1997.
- KONEMAN, Elmer; ALLEN, Stephen; *Diagnostico Microbiológico Texto y Atlas a Color*, Eitorial Panamericana. Bogota 1999.
- KONEMAN, Elmer; ALLEN, Stephen; *Diagnostico Microbiológico*. Editorial Panamerica. Buenos Aires 1997
- LIEBANA UREÑA, José; *Microbiología Oral*, Editorial Interamericana. Madrid 2002.
- MOUTON, Christian. CLAUDE, Jean Robert; *Bacteriología Bucodental*, Editorial Masson. España. 1995.
- RIVERA RIVERA, Cayetano; *Genética Bacteriana*. Universidad Católica de Santa María. Arequipa 2013

HEMEROGRAFIA

- <http://www.fisterra.com/guias2/cochrane/AB001321-ES.htm>
- <http://europepmc.org/abstract/MED/19702172/reload=0;jsessionid=xnXOr4HnOMvwUd1LWDrU.22>
- CAÑIGUERAL, Salvador, “*Arándano Americano (Vaccinium Macrocarpon)*”, Editorial Carlet. España. 2010.

CONSULTA INTERNET

- [http://www.researchgate.net/publication/257409196_Evaluacin_del_contenido_de_antioxidantes_en_extractos_convencionales_y_supercriticos_de_arndano_\(Vaccinium_corymbosum_L.\)](http://www.researchgate.net/publication/257409196_Evaluacin_del_contenido_de_antioxidantes_en_extractos_convencionales_y_supercriticos_de_arndano_(Vaccinium_corymbosum_L.))
- <http://www.uclm.es/area/cta/cesia2012/cd/PDFs/4-BIO/BIO-P25T.pdf>
- <http://escuela.med.puc.cl/publ/boletin/laboratorio/Interpretacion.html>
- http://campus.usal.es/~micromed/Practicas_odontologia/unidades/labv/LabMicro/Antibiograma
- <http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/fw/cintro.htm>
- http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pident_articulo=13154072&pident_usuario=0&pcontactid=&pident_revista=4&ty=68&accion=L&origen=zonadelectura&web=http://zl.elsevier.es&lan=es&fichero=4v29n04a13154072pdf001.pdf

- <http://aapaunam.mx/Revista/REV-A4-VOL4-OctDic/LosFlavonoidesTratamientoInfecciones.pdf>
- http://www.fitoterapia.net/revista/pdf/RDF_10-1_vaccinium_macrocarpon.pdf
- <http://respuestanatural.net/tag/arandano-azul/>
- <http://servicio.bc.uc.edu.ve/odontologia/revista/v4n1/4-1-2.pdf>
- http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/odontologia/2011_n1/pdf/a11.pdf
- http://www.ispch.cl/lab_sal/doc/manual_susceptibilidad.pdf
- http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/odontologia/2011_n1/pdf/a11.pdf
- http://www.tesis.uchile.cl/tesis/uchile/2006/delrio_p/sources/delrio_p.pdf
- <http://www.agronegociosperu.org/tema/tem003.htm#.Uxt7TD95NLU>
- <http://www.inforegion.pe/portada/141409/arandano-la-nueva-estrella-de-la-agro-exportacion-peruana/>
- <http://w4.siap.sagarpa.gob.mx/AppEstado/Monografias/Frutales/Blueberry.html>
- http://www.larioja.org/npRioja/cache/documents/558132_PROPIEDADES_MEDICINALES_DEL_ARANDANO_web.pdf;jsessionid=A393464393ADAFD0F63F86C8BD687B92.jvm3
- <http://agraria.pe/noticias/arandanos-azules-peruanos-tienen-potencial-en-eeuu>
- <http://www.enbuenasmanos.com/articulos/muestra.asp?art=2378>
- <http://www.sierraexportadora.gob.pe/productos/catalogo-de-productos/arandano/>
- <http://www.botanical-online.com/medicinalsarandano.htm>

- <http://climafrutal.wordpress.com/el-arandano/>
- <http://www.sexovida.com/colegas/arandanos.htm>
- <http://nutraceuticos2012.blogspot.com/2012/10/acido-clorogenico.html>
- <https://diabetesstop.wordpress.com/2007/11/25/arandano-azul/>
- http://www.espe.edu.ec/portal/files/sitio_congreso_2011/papers/V4.pdf
- <http://www.lineasalud.com/ique-es/413-los-flavonoides.html>
- <http://vidaok.com/el-arandano-variedades-propiedades-del-arandano/>





MODELO DEL INSTRUMENTO

FICHA DE OBSERVACION LABORATORIAL

Ficha No:

Número de Placa Petri:

Diámetro del halo de Inhibición
de la Concentración Mínima Inhibitoria:

Diámetro del halo de Inhibición
de la Concentración Mínima Bactericida:

Diámetro del halo de Inhibición
de la Clorhexidina al 2%:

Diámetro de Halo de
Inhibición del control negativo:

Observaciones

MATRIZ DE REGISTRO Y CONTROL

**EFICACIA IN VITRO DEL EXTRACTO DE BLUEBERRY EN CEPAS CERTIFICADAS
DE PORHPYROMONAS GINGIVALIS EN LOS LABORATORIOS CLINICAS DE LA
UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA, AREQUIPA 2013**

MUESTRAS	CMB / mm	CMI / mm	CONTROL +/ mm	CONTROL- / mm
1	19	13	15	6
2	18	11	15	6
3	20	14	17	6
4	17	15	15	6
5	20	15	17	6
6	19	15	17	6
7	19	13	17	6
8	19	13	15	6
9	19	14	15	6
10	19	14	15	6
11	19	14	15	6

LEYENDA:

CMB: Concentración Mínima Bactericida

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

CONTROL +: Control Positivo

CONTROL - : Control Negativo

PREPARACION DE LOS TUBOS DE ENSAYO

UNIDADES DE ESTUDIO	TUBO N° 1	TUBO N° 2	TUBO N° 3	TUBO N° 4	TUBO N° 5	TUBO N° 6	TUBO N° 7	TUBO N° 8	UNIDADES
EXTRACTO DE BLUEBERRY	1000	800	600	400	200	100	50	25	µl
INOCULO + CALDO TIOGLICOLATO	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	µl



SECUENCIA FOTOGRAFICA



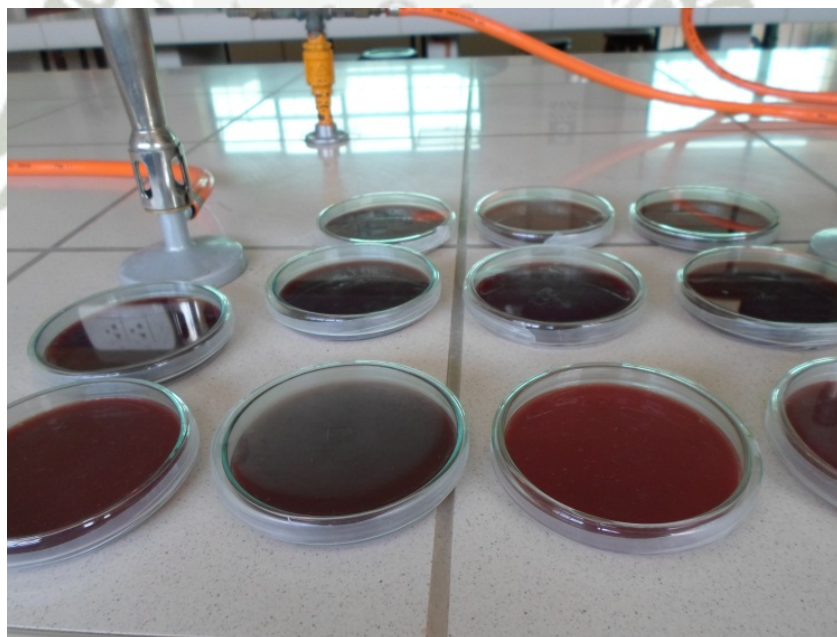
FIG N° 1 CAJA DE BLUEBERRY DE 125 g.



FIG. N° 2 MATERIA PRIMA DE BLUEBERRY



FIG. N°3 EXTRACTO DE BLUEBERRY POR EL METODO CONVENCIONAL



**FIG. N°4 GELIFICACION DEL AGAR SANGRE AL PROMEDIAR LOS 10 MINUTOS
DE PREPARACION DEL MEDIO**



FIG. N°5 CALDO TIOGLICOLATO



FIG. N°6 CEPA CERTIFICADA DE PORPHYROMONAS GINGIVALIS, DEBIDAMENTE
SELLADA Y REGISTRADA

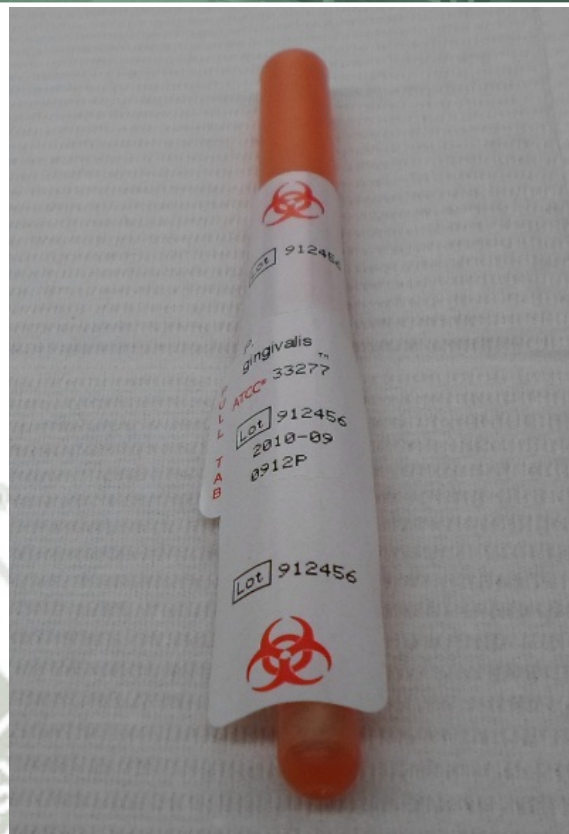


FIG. N°7 CEPA ATCC 33277

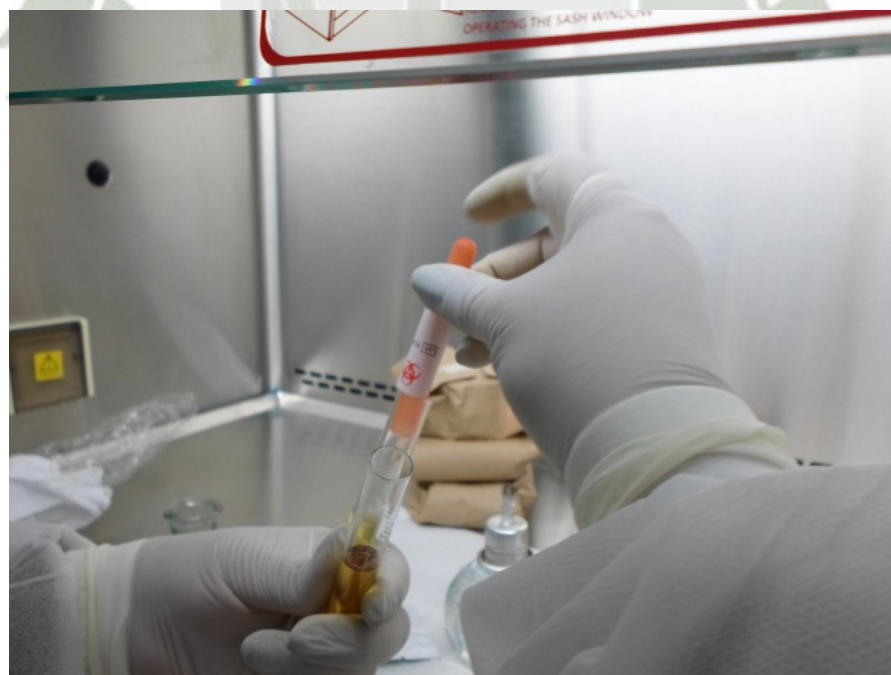


FIG. N°8 REACTIVACION DE LA CEPA DE PORPHYROMONAS GINGIVALIS



FIG. N°9 REPLICACION DE PORPHYROMONAS GINGIVALIS ATCC



FIG. N°10 PORPHYROMONAS GINGIVALIS



**FIG. N°11 INOCULACION DE PORPHYROMONAS GINGIVALIS PARA DETERMINAR
CMI Y CMB**

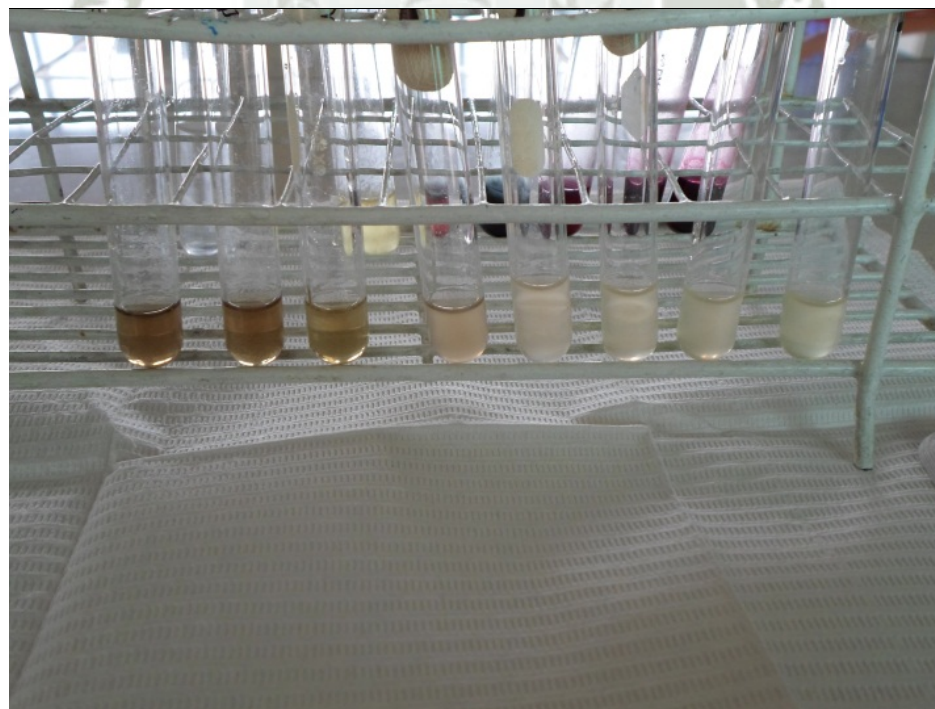


FIG. N° 12 IDENTIFICACION DE LA CMI Y CMB



FIG. N° 13 PREPARACION DE LOS DISCOS DE DIFUSION SOBRE AGAR SANGRE

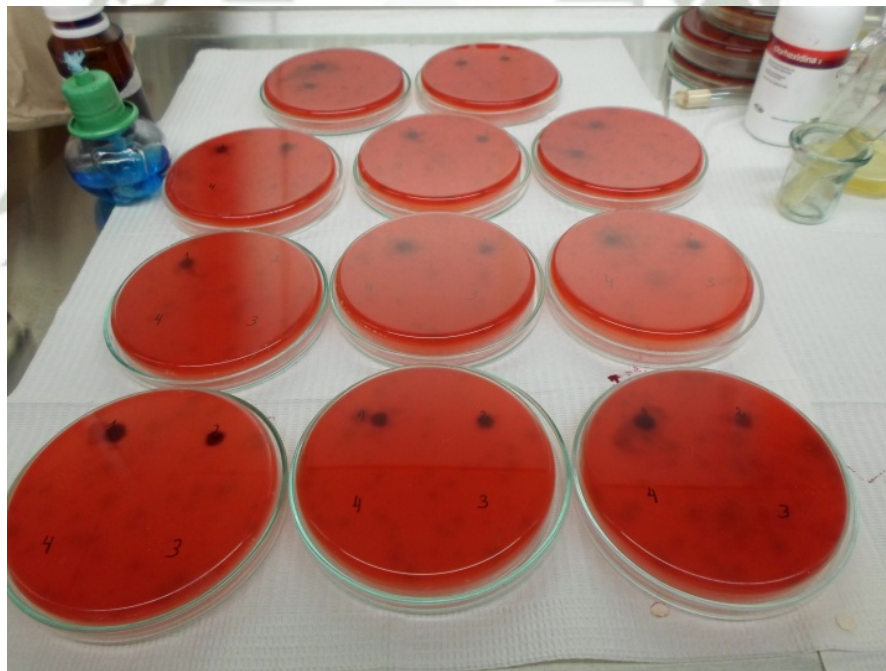


FIG. N° 14 PRESENCIA DE HALOS DE INHIBICION DE LAS MUESTRAS EN AGAR

SANGRE

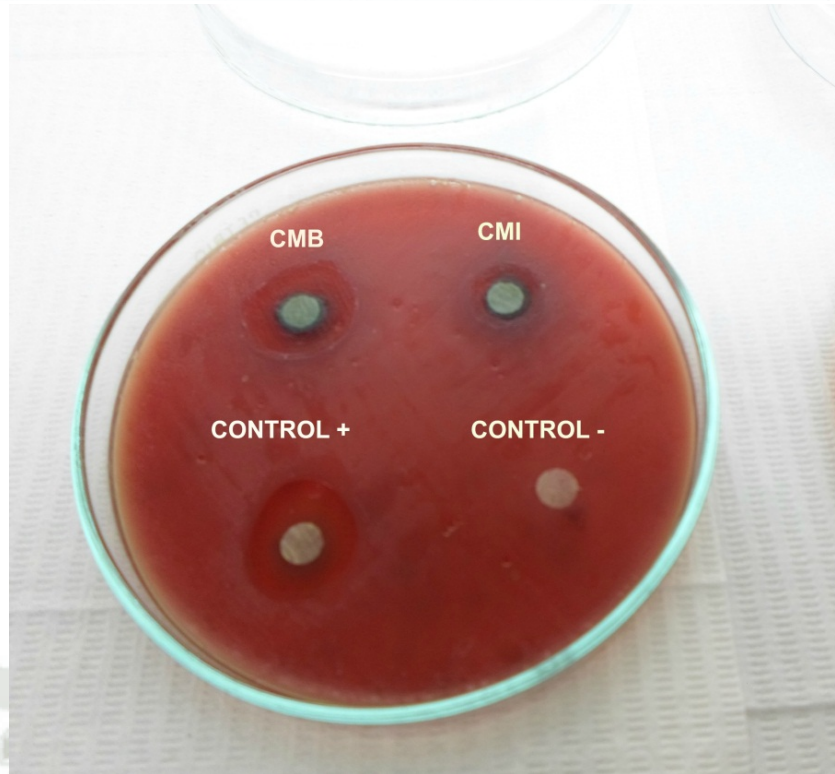


FIG. N°15 HALOS DE INHIBICION DE CMB, CMI, CONTROL + (CLORHEXIDINA AL 2%) Y CONTROL NEGATIVO

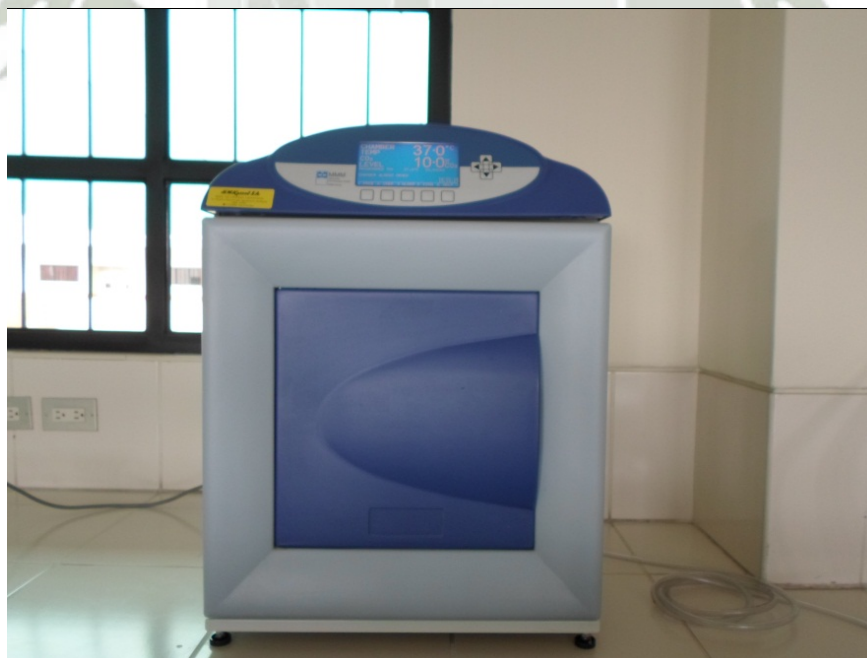


FIG. N°16 CAMARA DE ANAEROBIOSIS A 37°C AL 10% DE CO₂

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD O SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

Para conocer la sensibilidad que pueda existir de una determinada bacteria a los antimicrobianos; se debe conocer la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB).

Existen varios métodos para encontrar estas Concentraciones, sin embargo se optó por las más sencillas y de fácil manejo que según KONEMAN, Elmer en *Diagnostico Microbiológico* pág.612-616, menciona:

PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD EN CALDO DE MACRODILUCIÓN PARA DE DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

Introducción

La prueba de Microdilución es una adaptación de la prueba macroscópica de referencia, puede probarse con facilidad gran número de aislamientos contra múltiples drogas de modo que el procedimiento está bien adaptado al uso de rutina. Esta prueba suministra información cuantitativa.

Principio

Los aislamientos bacterianos son expuestos a una serie de diluciones de cada agente antimicrobiano, después de lo cual se determina la concentración de la droga que inhibe el crecimiento mediante inspección visual (CMI).

Medios y Reactivos

- Caldo nutriente
- 0.5 estándar de Mc Farland para ajustar la Turbidez del inóculo
- Tubos de microtitulación que contengan antibióticos en caldo
- Inoculadores de asas múltiples: asas de alambre o puntas de plástico descartables
- Micropipeta Eppendorf o similar
- Espejo de lectura y plantilla para la visualización de los puntos finales. Puede hacerse análisis fluorométrico o fotométrico si se demuestra equivalente a la inspección visual.

Procedimiento

Preparación del Inóculo

Deben seleccionarse 4 a 6 colonias de apariencia similar, se ajusta la turbidez del caldo de cultivo con crecimiento activo de 0.5 estándar de Mc Farland. Cada receptáculo de esta manera contiene aproximadamente 5×10^5 UFC/ ml.

Inoculación de Tubos

Se inocula la suspensión bacteriana dentro de los 15 minutos de ajustada la densidad del inóculo con determinado antimicrobiano.

Incubación

Se incuba los tubos de acuerdo a la temperatura requerida por las bacterias de estudio y durante 16 – 24 horas.

Interpretación

La CMI es la menor concentración de un antibiótico que inhibe el crecimiento de un aislamiento. Puede determinarse mediante la visualización sin ayuda instrumental, comparando el crecimiento en los receptáculos que contienen antibiótico, el receptáculo que no contiene turbidez representa aquel que no presentó crecimiento bacteriano por lo que se toma en cuenta para la determinación de la CMI que corresponderá a la concentración de sustancia antimicrobiana siguiente a esta.

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MINIMA BACTERICIDA

Introducción

La concentración mínima bactericida (CMB), de un antibiótico es la concentración que destruye por lo menos el 99.9% de un inóculo bacteriano normatizado.

Principio

Unos pocos antibióticos inhiben el crecimiento bacteriano sin destruir a los microorganismos, pero la mayor parte de los antibióticos ejercen actividad letal. La concentración de la droga que inhibe el crecimiento está muy próxima a la concentración que produce la muerte de bacterias.

Materiales y Reactivos

- Placas de agar nutriente, como agar sangre para subcultivar
- Inoculadores de asas múltiples: asas de alambre o puntas de plástico descartables

Procedimiento

Una vez obtenida la CMI, se procede a encontrar la CMB, partiendo de las diluciones seriadas ya estandarizadas y que presentan el antibiótico en determinadas concentraciones usados para la determinación de la CMI, estas son subcultivadas en las placas de agar nutriente y se incuban durante 24 horas.

Interpretación

Se observa las colonias bacterianas presentes en cada placa, la CMB es la concentración mínima de antibiótico que produce la destrucción de 99.9% por lo tanto, cualquier concentración de antibiótico que produzca menos de 45 colonias después de ser subcultivada es considerada bactericida.

PRUEBA DE SUCEPTIBILIDAD DE DIFUSIÓN EN DISCOS (KIRBY – BAUER)

Introducción

La determinación de una prueba normatizada para la difusión en discos no solo ha permitido controles más exactos de calidad, sino también una comparación válida de resultados entre los diferentes laboratorios

Principio

Tan pronto como el disco impregnado en antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda de agar, el agua es absorbida por el papel filtro y el

antibiótico difunde al medio que lo rodea. El promedio de extracción del antibiótico del disco es mayor que su difusión hacia el medio, de modo que la concentración inmediatamente adyacente al disco puede exceder a la del disco mismo. Sin embargo a medida que aumenta la distancia del disco, se produce una reducción logarítmica de la concentración del antibiótico. El punto en el cual se alcanza la masa celular crítica aparece como un círculo marginado bien marcado de crecimiento bacteriano, con el centro del disco formado en el centro del círculo.

Medios y Reactivos

- Placas de agar
- Discos
- Calibres, reglas o plantillas
- Inoculadores: asa asas de alambre o puntas de plástico descartables

Procedimiento

Se prepara una suspensión estándar de las bacterias, ajustando a 05. Estándar de Mc Farland. Con un asa estéril se agrega 0.001 ml de una suspensión bacteriana, que será mezclada en el agar sembrado invirtiendo suavemente y se extiende en toda la superficie de una placa Petri, se dejan las placas 3 a 5 minutos antes de colocar los discos con antibióticos. Considerar discos controles de crecimiento bacteriano para mayor fidelidad en los resultados.

Se colocan los discos impregnados con el antibiótico adecuado sobre la superficie del agar mediante una pinza o dispensador multidisco.

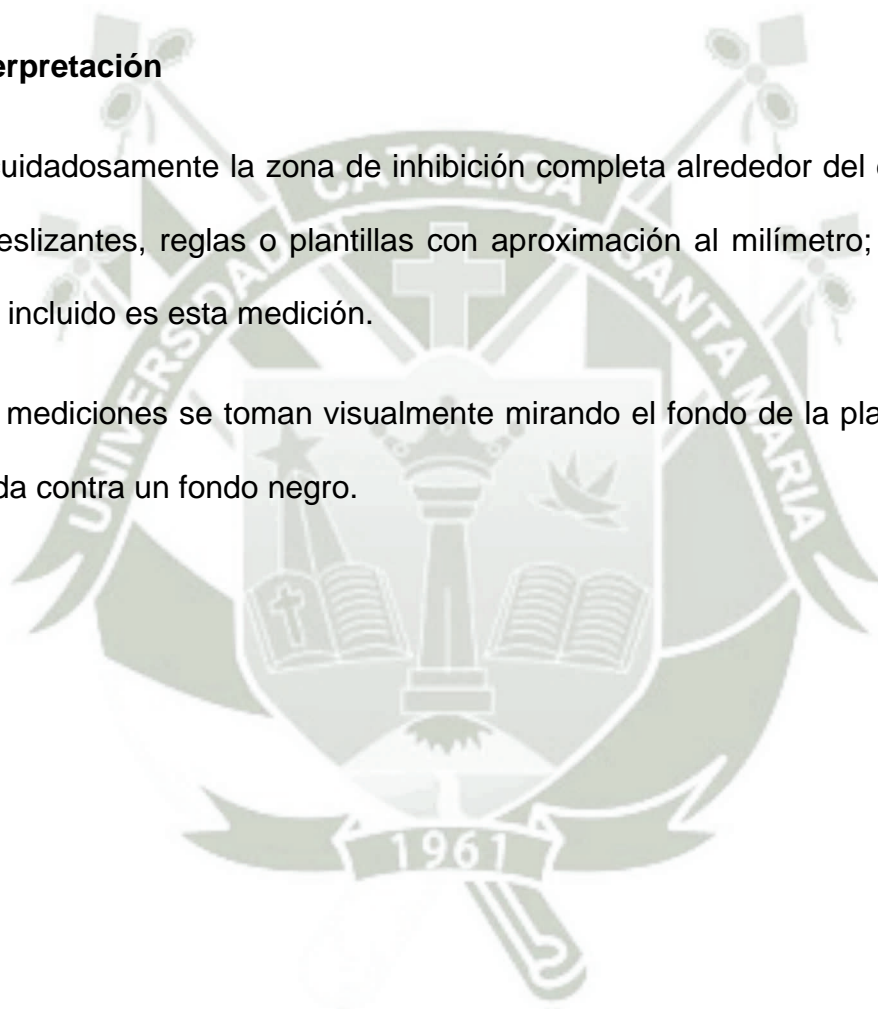
Se presiona con suavidad los discos sobre el agar para permitir un contacto uniforme, porque parte de la droga difunde casi inmediatamente. Los discos deben tener una distribución pareja sobre el agar, de modo que están separados por no menos de 24 mm de centro a centro.

Se invierten las placas y se colocan a temperatura requerida por la bacteria de estudio en incubadora por 16 a 18 horas.

Interpretación

Se mide cuidadosamente la zona de inhibición completa alrededor del disco, mediante calibres deslizantes, reglas o plantillas con aproximación al milímetro; el diámetro del disco está incluido es esta medición.

Todas las mediciones se toman visualmente mirando el fondo de la placa de Petri con luz reflejada contra un fondo negro.





Universidad Católica de Santa María

☎ (51 54) 251210 Fax: (51 54) 251213 ✉ ucsm@ucsm.edu.pe 🌐 <http://www.ucsm.edu.pe> Apartado: 1350

AREQUIPA - PERU

UCSM-COORD.LAB- 46 -13

PASTOR AGUILAR, FLORDELIZ LIDENY

Arequipa. 2013-12-16

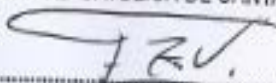
Páse a los Asistentes de Laboratorio:

Sras Sofía Ayahuaca y
Rocio Rodríguez

Se autoriza el uso del **LABORATORIO H-403**, para que el Sr(a)(ta)(s). FLORDELIZ LIDENY PASTOR AGUILAR, alumno(a)(s) del Programa Profesional de ODONTOLOGIA, pueda ejecutar el trabajo de investigación titulado "EFICACIA IN VITRO DEL EXTRACTO DE BLUEBERRY EN CEPAS CERTIFICADAS DE PORPHY ROMONAS GINGIVALIS EN LOS LABORATORIOS CLINICOS DE LA UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA, previa coordinación de horario.

Atentamente,

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA



Q.F. FERNANDO TORRES VELA
Coordinador (e) de Laboratorios y Gabinetes