



# UNIVERSIDAD ANDINA DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGIA



---

EFICACIA ANTIBACTERIANA *IN VITRO* ENTRE ROCOTO (*Capsicum pubescens*) EN COMPARACION CON EL EXTRACTO DE CAPSAICINA SOBRE CEPAS DE *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 CAUSANTE DE ENFERMEDAD PERIODONTAL CUSCO – PERU 2019

---

Presentado por la Bachiller:

**ERIKA ALEXANDRA RIOS PAUCAR**

Para obtener Título Profesional de Cirujano  
Dentista

Asesor:

**Mtro. EDGARDO GUILLERMO RIVERA  
MEDINA**

Co-asesor:

**Blgo. LUGÓ MIRANDA BARRIGA**

**CUSCO – PERU  
2019**



## AGRADECIMIENTOS

Para llevar esta investigación a cabo fue importante e imprescindible el apoyo y asesoramiento constante de muchas personas. Es por eso que expreso mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas, quienes contribuyeron desde el inicio hasta el final de esta investigación.

A la Universidad Andina del Cusco, por ser la casa de estudios de prestigio en donde me formé y adquirí conocimientos por profesionales de alto nivel.

A la Escuela Profesional de Estomatología, por formar profesionales capaces de contribuir a la sociedad con alto nivel profesional, moral y a cada uno de sus docentes por todo el apoyo brindado a lo largo de la carrera.

A mi asesor Mtro. Edgardo Guillermo Rivera Medina, por su apoyo, orientación y dedicación para la elaboración del presente trabajo de investigación.

A mi co-asesor Blgo. Lugó Miranda Barriga, por su constante apoyo y ayuda incondicional con sus aportes y conocimientos en la parte experimental del presente proyecto.

A mis padres y familiares, por creer siempre en mí y apoyarme en todo momento.

A mis mejores amigas, que siempre estuvieron para apoyarme moralmente y en la realización del proyecto de investigación, sin ustedes no lo hubiera logrado.

Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos que me apoyaron ya sea directa o indirectamente y poder concluir la presente tesis, gracias por sus palabras de aliento y empuje diario. A todos ellos y ellas **GRACIAS.**



## DEDICATORIA

A Dios quien me dio la fuerza para seguir adelante en todos mis propósitos es mi guía y me dio la vocación de estudiar esta maravillosa carrera.

A mis padres Isaias y Lourdes les dedico todo lo que hago y por ustedes sigo adelante, gracias por su apoyo incondicional, sus enseñanzas y sacrificios, son el pilar fundamental de mi vida.

A mis hermanas Pahola y Luciana que son el motor y la alegría de mi vida, las amo demasiado.

A mis abuelitos Marcelino y Felicitas mis segundos padres que me dieron su apoyo en cada momento gracias por sus consejos.

Y a toda mi familia y amigos gracias por su ayuda durante toda mi vida universitaria, a todos ellos les dedico esta tesis con mucho cariño y amor.



## INDICE

AGRADECIMIENTOS .....	I
DEDICATORIA.....	II
RESUMEN .....	XIII
ABSTRACT .....	XIV
INTRODUCCIÓN .....	XV
CAPITULO I .....	17
1. EL PROBLEMA.....	17
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	19
1.2.1 PROBLEMAS ESPECÍFICOS .....	19
1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN .....	20
1.3.1 OBJETIVO GENERAL.....	20
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
1.4 JUSTIFICACIÓN .....	21
1.5 LIMITACIONES .....	22
1.6 ASPECTOS ETICOS.....	22
CAPITULO II .....	23
2. MARCO TEORICO.....	23
2.1 ANTECEDENTES DE INVESTIGACIÓN .....	23
2.1.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES.....	23
2.1.2 ANTECEDENTES NACIONALES .....	28
2.2 BASES TEÓRICAS.....	30
2.2.1 <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	30
2.2.2 CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO .....	38
2.2.3 ESPECTROFOTOMETRIA .....	39
2.2.4 ROCOTO ( <i>Capsicum pubescens</i> ).....	42
2.2.5 CAPSAICINA .....	50
2.3 MARCO CONCEPTUAL .....	57
2.4 HIPOTESIS DE ESTUDIO .....	59
2.4.1 HIPOTESIS ESPECÍFICAS:.....	59



2.5 VARIABLES E INDICADORES.....	61
2.5.1 OPERACIONALIZACION DE VARIABLES.....	61
CAPITULO III .....	66
3. DISEÑO METODOLOGICO .....	66
3.1 NIVEL DE INVESTIGACION .....	66
3.1.1 TIPO DE INVESTIGACION .....	66
3.2 POBLACION Y MUESTRA.....	67
3.2.1 POBLACION VEGETAL .....	67
3.2.2 SELECCIÓN DE LA MUESTRA VEGETAL .....	67
3.2.3 POBLACION VEGETAL DEL EXTRACTO DE CAPSAICINA .....	67
3.2.4 SELECCIÓN DE LA MUESTRA DEL EXTRACTO DE CAPSAICINA.....	68
3.2.5 POBLACION BACTERIANA DE <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 .....	68
3.2.6 SELECCIÓN DE LA MUESTRA BACTERIANA.....	68
3.2.1 DISTRIBUCION DE LA MUESTRA.....	68
3.3 TIPO DE MUESTREO .....	70
3.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	70
3.4.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	70
3.4.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN .....	70
3.5 TECNICA DE RECOLECCION DE DATOS .....	70
3.6 PROCEDIMIENTOS.....	71
3.6.1 PROCEDIMIENTOS PARA LA OBTENCION DE LA MUESTRA VEGETAL .....	71
3.7.1 CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	74
3.7.2 DETERMINACIÓN ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO DE CAPSAICINA Y ROCOTO ( <i>Capsicum pubescens</i> ) EN SU PRESENTACION FRESCA .....	78
3.7.4 DETERMINACION DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA .....	83
3.8 RECOLECCION DE DATOS .....	85
3.9 PROCEDIMIENTO PARA LA RECOLECCION DE DATOS.....	86
3.9.1 TRÁMITES ADMINISTRATIVOS.....	86
3.9.2. ACCIONES .....	86
3.10 TECNICA DE PROCESAMIENTO DE DATOS .....	87
3.10.1 NIVEL DE SISTEMATIZACION .....	87
3.10.2 OPERACIONES DEL PROCEDIMIENTO.....	87
3.10.3 PROCESAMIENTO DE DATOS.....	87



3.11 RECURSOS .....	88
3.11.1 RECURSOS MATERIALES .....	88
3.11.2 RECURSOS ECONÓMICOS.....	91
3.11.3 RECURSOS HUMANOS.....	92
3.11.4 RECURSOS FÍSICOS .....	92
3.12 CAMPO DE INVESTIGACION .....	92
CAPITULO IV.....	93
RESULTADOS DE LA INVESTIGACION .....	93
CAPITULO V.....	114
DISCUSIÓN .....	114
CONCLUSIONES .....	120
SUGERENCIAS .....	121
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	123
ANEXOS.....	132



## INDICE DE CUADROS

CUADRO N° 1: FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>P. gingivalis</i> .....	33
CUADRO N° 2: COMPOSICION BROMATICA DE <i>Capsicum pubescens</i> .....	44
CUADRO N°3: CAPSICINOIDES COMÚNMENTE PRESENTES EN EL GENERO <i>Capsicum</i> .....	48
CUADRO N° 4: USOS FARMACEUTICOS DE LA CAPSAICINA .....	55
2.5.2 CUADRO N° 5: CUADRO DE DEFINICION DE VARIABLES .....	62
CUADRO N° 6: VOLUMENES TOTALES DE CADA MUESTRA .....	83
CUADRO N° 7: RECURSOS ECONOMICOS.....	91
CUADRO N° 8: EFICACIA ANTIBACTERIANA IN VITRO ENTRE ROCOTO ( <i>Capsicum pubescens</i> ) EN COMPARACIÓN CON EL EXTRACTO DE CAPSAICINA Y CONTROLES (POSITIVOS Y NEGATIVOS) AL 25% SOBRE CEPAS DE <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 A LAS 5, 10, 15, 20 , 25 Y 30 HORAS MEDIANTE LA PRUEBA ESTADITICA ANOVA DE UN FACTOR.....	96
CUADRO N° 9: EFICACIA ANTIBACTERIANA IN VITRO ENTRE ROCOTO ( <i>Capsicum pubescens</i> ) EN COMPARACIÓN CON EL EXTRACTO DE CAPSAICINA Y CONTROLES (POSITIVO Y NEGATIVO) AL 25% SOBRE CEPAS DE <i>Porphyromonas</i> <i>gingivalis</i> ATCC 33277 A LAS 5, 10, 15, 20, 25 Y 30 HORAS MEDIANTE LA PRUEBA DE POST HOT DE TUKEY PARA LA DIFERENCIA ENTRE GRUPOS.bb.....	98
CUADRO N° 10: EFICACIA ANTIBACTERIANA IN VITRO ENTRE ROCOTO ( <i>Capsicum pubescens</i> ) EN COMPARACIÓN CON EL EXTRACTO DE CAPSAICINA Y CONTROLES (POSITIVO Y NEGATIVO) AL 25% SOBRE CEPAS DE <i>Porphyromonas</i> <i>gingivalis</i> ATCC 33277 A LAS 5, 10, 15, 20 ,25 Y 30 HORAS MEDIANTE LA CLASIFICACIÓN DE STEPANOVIC DE LA FORMACIÓN DE BIOPELICULAS.....	100
CUADRO N° 11: EFICACIA ANTIBACTERIANA IN VITRO ENTRE ROCOTO ( <i>Capsicum pubescens</i> ) EN COMPARACIÓN CON EL EXTRACTO DE CAPSAICINA Y CONTROLES (POSITIVOS Y NEGATIVOS) AL 50% SOBRE CEPAS DE <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 A LAS 5, 10, 15, 20 , 25 Y 30 HORAS MEDIANTE LA PRUEBA ESTADITICA ANOVA DE UN FACTOR.....	102
CUADRO N° 12: EFICACIA ANTIBACTERIANA IN VITRO ENTRE ROCOTO ( <i>Capsicum pubescens</i> ) EN COMPARACIÓN CON EL EXTRACTO DE CAPSAICINA Y CONTROLES (POSITIVO Y NEGATIVO) AL 50% SOBRE CEPAS DE <i>Porphyromonas</i> <i>gingivalis</i> ATCC 33277 A LAS 5, 10, 15, 20, 25 Y 30 HORAS MEDIANTE LA PRUEBA DE POST HOT DE TUKEY PARA LA DIFERENCIA ENTRE GRUPOS.....	104
CUADRO N° 13: EFICACIA ANTIBACTERIANA IN VITRO ENTRE ROCOTO ( <i>Capsicum pubescens</i> ) EN COMPARACIÓN CON EL EXTRACTO DE CAPSAICINA Y CONTROLES (POSITIVO Y NEGATIVO) AL 50% SOBRE CEPAS DE <i>Porphyromonas</i> <i>gingivalis</i> ATCC 33277 A LAS 5, 10, 15, 20 ,25 Y 30 HORAS MEDIANTE LA CLASIFICACIÓN DE STEPANOVIC DE LA FORMACIÓN DE BIOPELICULAS.....	106
CUADRO N° 14: EFICACIA ANTIBACTERIANA IN VITRO ENTRE ROCOTO ( <i>Capsicum pubescens</i> ) EN COMPARACIÓN CON EL EXTRACTO DE CAPSAICINA Y CONTROLES (POSITIVOS Y NEGATIVOS) AL 75% SOBRE CEPAS DE <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 A LAS 5, 10, 15, 20 , 25 Y 30 HORAS MEDIANTE LA PRUEBA ESTADITICA ANOVA DE UN FACTOR.....	108



CUADRO N° 15: EFICACIA ANTIBACTERIANA IN VITRO ENTRE ROCOTO  
(Capsicum pubescens) EN COMPARACIÓN CON EL EXTRACTO DE CAPSAICINA Y  
CONTROLES (POSITIVO Y NEGATIVO) AL 75% SOBRE CEPAS DE Porphyromonas  
gingivalis ATCC 33277 A LAS 5, 10, 15, 20, 25 Y 30 HORAS MEDIANTE LA PRUEBA  
DE POST HOT DE TUKEY PARA LA DIFERENCIA ENTRE GRUPOS. .... 110

CUADRO N° 16: EFICACIA ANTIBACTERIANA IN VITRO ENTRE ROCOTO  
(Capsicum pubescens) EN COMPARACIÓN CON EL EXTRACTO DE CAPSAICINA Y  
CONTROLES (POSITIVO Y NEGATIVO) AL 75% SOBRE CEPAS DE Porphyromonas  
gingivalis ATCC 33277 A LAS 5, 10, 15, 20, 25 Y 30 HORAS MEDIANTE LA  
CLASIFICACIÓN DE STEPANOVIC DE LA FORMACIÓN DE BIOPELICULAS. .... 112

CUADRO N° 17: COMPARACIÓN DE LA EFICACIA DE LAS CONCENTRACIONES  
AL 25%, 50%, 75% EN DIFERENTES TIEMPOS DE LA FORMACIÓN DE  
BIOPELICULA DE LA EFICACIA ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL ROCOTO  
(Capsicum pubescens) EN COMPARACIÓN CON EL EXTRACTO DE CAPSAICINA  
SOBRE CEPAS DE Porphyromonas gingivalis ATCC 33277. .... 213





## INDICE DE FIGURAS

Figura N° 1: Representación de <i>Porphyromonas gingivalis</i> y la liberación de vesículas secretoras y sus productos.....	31
Figura N° 2: Curva de Crecimiento Bacteriano.....	39
Figura N° 3: Rocoto manzano, locoto ( <i>Capsicum pubescens</i> ) .....	42
Figura N° 4: Revista de Química PUCP, Capsaicina .....	50
Figura N° 5: Revista de Química PUCP, Ruta Metabólica de la Capsaicina.....	52
Figura N° 6: Curva de crecimiento de la cepa bacteriana <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 hasta las 30 horas.....	94
Figura N°7: Comunidad de Cocha Distrito de Marcapata, Provincia Quispicanchi, Departamento Cusco.....	168
Figura N°8: Recolección de muestra para estudio y reconocimiento botánico del rocoto ( <i>Capsicum pubescens</i> ).....	168
Figura N°9: Rocoto ( <i>Capsicum pubescens</i> ).....	168
Figura N°10: Toma de muestras de todos los materiales que entraran en contacto con la muestra final en medios de cultivo (McConkey, Ogy, Manitol Salado, BHI).....	169
Figura N°11: Lecturas de muestras de micropipetas de 1000 y 100 $\mu$ l, sin formación de colonias.....	169
Figura N° 12: Lecturas de muestras de sistema de anaerobiosis, sin formación de colonias.....	170
Figura N° 13: Lecturas de muestras de la campana de flujo laminar, sin formación de colonias.....	170
Figura N°14: Lecturas de muestras de cepa <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 y Rocoto ( <i>Capsicum pubescens</i> ) en su presentación fresa, sin formación de colonias.....	171
Figura N° 15: Lecturas de muestras de Rocoto ( <i>Capsicum pubescens</i> ) en su presentación fresa, sin turbidez.....	171
Figura N° 16: Limpieza y selección de materiales .....	172
Figura N° 17: Empaquetamiento de placas petri.....	172
Figura N° 18: Preparación de gares, agua destilada con agar en su presentación seca y dilución a calor.....	173
Figura N° 19: Selección de tubos de ensayo y colocación de caldo BHI.....	173
Figura N° 20: Empaquetamiento de matraz con agares diluidos .....	173
Figura N° 21: Esterilización de agares y caldo BHI en el sistema de autoclave a 121°C° por 15 minutos.....	174
Figura N° 22: Plaqueado de agares en placas petri .....	174
Figura N° 23: Obtención de la cepa <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 .....	175
Figura N° 24: Agar Müeller-Hinton enriquecido en sangre.....	175
Figura N° 25: Reactivación de cepa <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 en agar Müeller-Hinton enriquecido en sangre .....	176
Figura N° 26: Siembra de cepa <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 en caldo BHI y Tioglicolato .....	176
Figura N° 27: Incubación de la cepa <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 a 37°C por 7 días en la jarra de anaerobiosis.....	177



Figura N° 28: Verificación de crecimiento de colonias de cepa Porphyromonas gingivalis ATCC 33277 en agar Müeller-Hinton enriquecido en sangre.....	177
Figura N° 29: Verificación de crecimiento de cepa Porphyromonas gingivalis ATCC 33277 en caldo BHI y Tioglicolato mediante turbidez en la base.....	178
Figura N° 30: Inoculación de medios de cultivo, cepa y medio anaerobio para obtención de muestras para la curva de crecimiento en la cámara de flujo laminar...	179
Figura N° 31: Diferentes muestras de curva de crecimiento en cubetas de cuarzo y plástico.....	179
Figura N° 32: Lectura de la curva de crecimiento de las diferentes muestras en el espectrofotómetro por 30 horas.....	180
Figura N° 33: Muestras de Rocoto y Limon para determinar las concentraciones de volumen y peso de la presentación fresca.....	181
Figura N° 34: Muestras totales de Rocoto (Capsicum pubescens) para determinar la media total de las concentraciones de peso de la presentación fresca.....	181
Figura N° 35: Muestras totales de Limon (Citrus limon) para determinar la media total de las concentraciones de volumen de agua en la presentación fresca.....	182
Figura N° 36: Muestras totales para calcular la Media Media del volumen de agua y peso del Rocoto (Capsicum pubescens).....	182
Figura N° 37: Media total del volumen de agua y peso del Rocoto (Capsicum pubescens).....	182
Figura N° 38: Licuado final de las muestras.....	183
Figura N° 39: Filtrado final de la muestra con papel filtro.....	183
Figura N° 40: Rocoto (Capsicum pubescens) cortados longitudinalmente.....	184
Figura N° 41: Rocoto (Capsicum pubescens) secado a las 100°C.....	184
Figura N° 42: Proceso de extracción de la capsaicina por el método de agotamiento en el equipo de SOXHLET durante 24 horas.....	185
Figura N° 43: Capsaicina en su presentación líquida.....	185
Figura N° 44: Capsaicina en su presentación sólida después de secado y vaporación de etanol.....	186
Figura N° 45: Anaerocult® A reactivo para preparar el medio anaerobio.....	187
Figura N° 46: Preparación de materiales para crear el medio anaerobio.....	187
Figura N° 47: Colocación de capsulas de Anaerocult® A dentro de un medio hermético y sistema de succión de medio anaerobio.....	188
Figura N° 48: Preparación de los materiales dentro de la cámara de flujo laminar para ser esterilizados mediante rayos UV.....	189
Figura N° 49: Lavado con hipoclorito de sodio al 10% y enjuagado con agua destilada estéril caliente y posterior secado con papel toalla.....	189
Figura N° 50: Licuado del Rocoto (Capsicum pubescens).....	190
Figura N° 51: Filtrado del Rocoto (Capsicum pubescens) en Matraz Kitasato.....	190
Figura N° 52: Conexión con Bomba al Vacío para la evacuación de gases y filtrado rápido.....	190
Figura N° 53: Colocación del extracto final en frasco color caramelo.....	191
Figura N° 54: Pesaje de la Capsaicina (sólida) teniendo en cuenta la MIC en la balanza analítica.....	192



Figura N° 55: Dilución de la Capsaicina (solida) en etanol de 96° teniendo en cuenta la MIC para obtención de diferentes concentraciones .....	192
Figura N° 56. Dilución al calor de caldo BHI .....	193
Figura N° 57: Preparación en diferentes matraces de 50 ml para cada estudio.....	193
Figura N° 58: Preparación de materiales para prueba piloto en la cámara de flujo laminar .....	194
Figura N° 59: Inoculación de la cepa, caldo BHI y extractos en sus diferentes concentraciones en todas las muestras de la prueba piloto.....	194
Figura N° 60: Inyección del medio anaerobio en todas las muestras de la prueba piloto .....	194
Figura N° 61. Lecturas en el Espectrofotómetro cada hora por 30 horas.....	195
Figura N° 62: Toma de muestra del agar Müeller-Hinton enriquecido en sangre para prueba Gram .....	196
Figura N° 63: Toma de muestra de los agares control de la presentación fresca Rocoto ( <i>Capsicum pubescens</i> ) y extracto de capsaicina para prueba Gram .....	196
Figura N° 64: Tinciones para prueba Gram .....	197
Figura N° 65: Vista en el microscopio de la cepa <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 a 100X de aumento.....	197
Figura N° 66: Preparación de medio de cultivo caldo BHI.....	198
Figura N° 67: Dividiendo 50 ml de medio de cultivo caldo BHI en matraces pequeños y esterilización.....	198
Figura N° 68: Preparación de todos los materiales en la cámara de flujo laminar y Uveado para prueba final.....	199
Figura N° 69: Toma del caldo BHI con micropipeta de 1000 µl según las diferentes concentraciones (25%, 50% y 75%) y el blanco .....	199
Figura N° 70: Depósito del caldo BHI en cubetas de cuarzo por cuadruplicado en los diferentes estudios .....	200
Figura N° 71: Toma de muestra de presentación fresca de Rocoto ( <i>Capsicum pubescens</i> ) y extracto de Capsaicina con micropipeta de 1000 µl según las diferentes concentraciones (25%, 50% y 75%) y en blanco .....	201
Figura N° 72: Inoculación de muestra de presentación fresca de Rocoto ( <i>Capsicum pubescens</i> ) en cubetas de cuarzo por cuadruplicado en los diferentes estudios.....	201
Figura N° 73: Inoculación de muestra del extracto de Capsaicina en cubetas de cuarzo por cuadruplicado en los diferentes estudios.....	202
Figura N° 74: Toma de inculo de la cepa <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 con micropipeta de 100 µl .....	203
Figura N° 75: Inoculación 90 µl de la cepa <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 en cubetas de cuarzo en todos los estudios .....	203
Figura N° 76: Tapas de conos de gutapercha para sellado de las cubetas de cuarzo	204
Figura N° 77: Sellado de las cubetas con tapas, plastilina y parafilm .....	204
Figura N° 78: Inyección del sistema anaerobio en las muestras con jeringas de 60 ml y agujas largas (21G X 32mm) por donde ingresa el CO <sub>2</sub> y sale oxígeno .....	205
Figura N° 79: Muestras finales .....	205
Figura N° 80: Muestras finales de controles positivos (Azitromicina y Clorhexidina)..	206



Figura N° 81: Muestras finales de controles negativos (Agua Destilada y Etanol 96°)	207
Figura N° 82: Lectura de las muestras finales en el Espectrofotómetro cada hora durante 30 horas	208



## ABREVIATURAS

BHI: Caldo Infusión Cerebro Corazon

CIMB: Concentración Inhibitoria Minima de Biopeliculas

CMRB: Concentracion Minima de Reduccion de Biopeliculas

CMI: *Concentración Mínima* Inhibitoria

CMB: *Concentración Mínima* Bactericida

CV: Curva de Vida

CM: Curva de Muerte

DO: Densidad Óptica

DOc: Densidad Óptica del punto Cortante

ECM: Matriz Extracelular

IL-8: Interleucina-8

NF- $\kappa$ B: Factor Nuclear- $\kappa$ B

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa

TRPV1: Agonista del Receptor de Vaniloides Subtipo

TSB: Caldo Tripticasa Soya

UFC: Unidad Formadora de Bacterias

REM: Radiación Electromagnética

TLR4: Receptor 4 tipo Toll



## RESUMEN

**Objetivo:** Comparar la eficacia antibacteriana *in vitro* del Rocoto (*Capsicum pubescens*) y el extracto de capsaicina sobre *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 causantes de enfermedad periodontal. **Metodología:** Se evaluó la eficacia antibacteriana mediante la espectrofotometría. Se utilizó cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 que fueron cultivadas en Mueller Hinton enriquecido en sangre al 5%, caldo infusión cerebro corazón (BHI), caldo Tioglicolato incubados a una temperatura de 37°C en un ambiente anaerobio por 10 días. Se estableció la curva de crecimiento de las cepas para determinar la formación de suspensiones bacterianas mediante la lectura de la absorbancia (densidad óptica) a 600 nm de longitud de onda cada hora por 30 horas. El diseño del estudio fue de tipo experimental *in vitro*. Se incubó diferentes volúmenes en microlitros del caldo BHI en cubetas de cuarzo con los antibacterianos a) presentación fresca de Rocoto (*Capsicum pubescens*), b) extracto de Capsaicina, c) etanol y d) agua destilada como Control (negativo) y e) Clorhexidina y f) Azitromicina como Control (positivo) en las diferentes concentraciones de 25%, 50% y 75% correspondientemente, y para finalizar se inyectó el sistema anaerobio (S.I.A) a cada muestra. En total fueron examinadas 46 muestras de las cuales se hicieron la lectura de la absorbancia cada hora por 30 horas, se encontró que no existen diferencias significativas. **Resultados:** Los resultados demostraron que, el extracto de Capsaicina en comparación al Rocoto (*Capsicum pubescens*) en su presentación fresca presenta una mejor eficacia antibacteriana obteniendo resultados casi iguales a la clorhexidina al 0.12% y la azitromicina de 500mg, por otro lado, el alcohol y el agua destilada no presentan ninguna eficacia antibacteriana por lo cual el principio activo (Capsaicina) es el único que presenta dicha propiedad. **Conclusión:** El extracto de capsaicina presenta una eficacia antibacteriana superior en un 100% en comparación al Rocoto (*Capsicum pubescens*) sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 causantes de enfermedad periodontal. **Palabras Clave:** Rocoto (*Capsicum pubescens*), presentación fresca, capsaicina, *Porphyromonas gingivalis*, crecimiento bacteriano, sistema anaerobio, eficacia antibacteriana.



## ABSTRACT

**Objective:** To compare the *in vitro* antibacterial efficacy of the Rocoto (*Capsicum pubescens*) and the capsaicin's extract on *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 cause of periodontal disease. **Methodology:** In this study the antibacterial efficacy was evaluated by spectrophotometry. Were used strains of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 that was cultivated in agar Mueller Hinton enriched with blood at 5%, brain heart infusion broth (BHI), Thioglycolate with a temperature of 37 ° C in an anaerobic environment incubated for 10 days. The growing curve was established to determine the growing of bacterial suspensions by reading the absorbance (Optical Density) at 600 nm wavelength every hour for 30 hours. The study's design was an *in vitro* experimental with a cross-sectional type. Different volumes of BHI broth were introduced in micro-liters in each sample of quartz cuvette with the antibacterials a) fresh presentation of Rocoto (*Capsicum pubescens*), b) Capsaicin's extract, c) ethanol and d) distilled water such as Control(negative) and e) Chlorhexidine and f) Azithromycin as Control(positive) at different concentrations of 25%, 50 % and 75% correspondingly, to finish was injected the anaerobic system (S.I.A) to each sample. The total was examined 46 samples, of which the absorbance was reading every hour for 30 hours in total, we found no significant differences. **Results:** The results showed that, Capsaicin's extract has a better antibacterial efficacy compared to the fresh presentation of Rocoto (*Capsicum pubescens*), getting results almost equal to chlorhexidine 0.12% while azithromycin of 500mg, alcohol and distilled water don't present any Antibacterial effect that means the active substance (Capsaicin) is the only one that has this property, all studies were done with the absorbance's measures of each sample. **Conclusion:** The Capsaicin's extract has an antibacterial efficacy that is 100% superior compare to Rocoto (*Capsicum pubescens*) on *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 cause of periodontal disease. **Keywords:** Rocoto (*Capsicum pubescens*), fresh presentation, capsaicin, *Porphyromonas gingivalis*, bacterial growth, anaerobic system, antibacterial efficacy.



## INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal es una de las principales patologías más comunes de la población, según el MINSA aproximadamente un 85% de personas la padece, esta enfermedad de desarrollo lento pero altísimamente destructiva trae consigo múltiples síntomas, aparte de tener un origen bacteriano, se distinguen otros orígenes causantes de la etiología sistémica y/o relacionada a distintos órganos del cuerpo humano como por ejemplo enfermedades cardíacas, cáncer, cardiovasculares, injurias accidentales, diabetes, etc. Por la cual es muy importante destacar la relación entre la salud bucal y los cuidados de la misma con la salud en general.

Esta enfermedad de origen microbiológico multifactorial (huésped, dieta, tiempo y los microorganismos) que principalmente se origina por el crecimiento bacteriano en el tejido sub gingival creándose así una respuesta inmunológica por el huésped causando inflamación, enrojecimiento y sangrado. La enfermedad al no ser tratada causará destrucción de tejido de inserción y pérdida de piezas dentarias, en este caso la bacteria Gram negativa, anaerobia estricta *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 se caracteriza por tener mayor prevalencia en la periodontitis crónica y agresiva.

Frente a esta problemática se busca estudiar nuevas alternativas antimicrobianas en la medicina alternativa para combatir de manera efectiva los microorganismos causantes de destrucción tisular, es más, en nuestra población es muy conocido que se utilizan métodos alternativos para combatir cualquier tipo enfermedad, basados en conocimientos básicos de ciencia natural que fueron heredados por los antiguos pobladores (incas) alimentos provenientes de nuestro medio los cuales dieron resultados muy favorables y rápidos.

El Rocoto (*Capsicum pubescens*) es uno de los frutos ancestrales usado a diario proveniente de las zonas cálidas del Perú, actualmente se siguen estudiando sus efectos beneficiosos para los avances de la medicina tradicional la cual dio muy buenos resultados sorprendiéndonos día a día, pero un compuesto alcalino que lo conforma la “capsaicina” causante del picor del rocoto dotara de efectividad al





mismo, veremos si junto con los demás Capsicinoides que lo conforman será posible potenciar el efecto antibacteriano.

En este trabajo de investigación estudiaremos el efecto antibacteriano del Rocoto (*Capsicum pubescens*) y el extracto de Capsaicina cada una de estas sustancias fueron sintetizadas en el laboratorio para su estudio *in vitro* examinando su capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano para lo cual se realizaran curvas de crecimiento medidas por su nivel de absorbancia y densidad óptica con la intención de conocer su eficacia frente a la *Porphyromonas gingivalis*, además se comparó la eficacia de las dos sustancias con otros colutorios utilizados en el ámbito odontológico que serán la clorhexidina al 0.012% y azitromicina de 500 mg como controles positivos a su vez agua destilada y etanol de 96° como controles negativos.



## CAPITULO I

### 1. EL PROBLEMA

#### 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La enfermedad periodontal es un conjunto de patologías infecciosas, inflamatorias y destructivas las que afectaran a todo el tejido peri odontogénico, descrita así por todo un proceso de colonización bacteriana contenida en el de biofilm patogénico, el cual estas bacterias al encontrar un ambiente perfecto para su reproducción dentro del surco gingival y todo el tejido de inserción, empezaran la interacción con el huésped y todo un proceso degenerativo caracterizado por: enrojecimiento de las encías, sangrado, inflamación vascular, destrucción tisular, tejido de inserción, movilidad, mal aliento, y por último y más preocupante perdida de piezas dentarias, causando un daño directo a las estructuras periodontales que la conforman, entre las bacterias y organismos periodonto patogénicos más frecuentes tenemos a *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola*, etc.

Es la *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 esta bacteria Gram negativo, anaerobio estricto, la cual con sus diferentes mecanismos de acción causaran la perdida de tejido periodontal exacerbando la inflamación de vasos sanguíneos, y perdida de tejido de inserción.

Los distintos métodos que se conocen y se estudiaron para combatir los patógenos que provocan la enfermedad periodontal son los enjuagues o gel con antibióticos como la clorhexidina al 0,12% que se aplican entre la encía y el diente para eliminar las bacterias por completo, pero la medicina alternativa también aporta sus propiedades medicinales y farmacológicas.



El Rocoto (*Capsicum pubescens*) alimento consumido diariamente, por las propiedades multi benéficas que este posee, es un alimento antiinflamatorio, analgésico, antioxidante hasta anti cancerígeno, pero es su característica antibacteriana la que estudiaremos en esta investigación empleándolo como medicamento alternativo para nuestra salud bucal.

Así también, la “Capsaicina”, será la participe de estos efectos beneficiosos del rocoto, aquella que precisamente le da el sabor picante a este alimento y sin duda posee todas las características anteriormente mencionadas, Por este motivo es importante contrastar los efectos antibacterianos de los productos de origen químico como los de origen natural para poder verificar si los tendrán los mismos efectos beneficiosos sobre el tejido periodontal.

En este trabajo de investigación vimos la relación de estos compuestos, el rocoto en su presentación fresca y extracto de la Capsaicina relacionada con el efecto antibacteriano contra la *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. Cuál de estas presentaciones tuvo un efecto más rápido y beneficioso en relación a las bacterias que son las causantes de la destrucción tisular e inflamación del tejido periodontal, siendo también posible que tenga propiedades antiinflamatoria, analgésica, antioxidante los cuales serán motivos para nuevas investigaciones



## 1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.

¿Cuál será la eficacia antibacteriana *in vitro* entre Rocoto (*Capsicum pubescens*) en comparación con el extracto de capsaicina sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 causantes de enfermedad periodontal?

### 1.2.1 PROBLEMAS ESPECÍFICOS

1.2.1.1 ¿Cuál será la curva de crecimiento bacteriana de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 a las 5,10,15,20,25,30 horas?

1.2.1.2 ¿Cuál será la eficacia antibacteriana *in vitro* entre Rocoto (*Capsicum pubescens*) en comparación con el extracto de capsaicina y controles (positivos y negativos) al 25% sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 a las 5,10,15,20,25,30 horas?

1.2.1.3 ¿Cuál será la eficacia antibacteriana *in vitro* entre Rocoto (*Capsicum pubescens*) en comparación con el extracto de capsaicina y controles (positivos y negativos) al 50% sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 a las 5,10,15,20,25,30 horas?

1.2.1.4 ¿Cuál será la eficacia antibacteriana *in vitro* entre Rocoto (*Capsicum pubescens*) en comparación con el extracto de capsaicina y controles (positivos y negativos) al 75% sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 a las 5,10,15,20,25,30 horas?



### 1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

#### 1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Comparar la eficacia antibacteriana *in vitro* entre Rocoto (*Capsicum pubescens*) en comparación con el extracto de capsaicina sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 causantes de enfermedad periodontal

#### 1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1.3.2.1 Determinar la curva de crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 a las 5,10,15,20,25,30 horas.
- 1.3.2.2 Determinar la eficacia antibacteriana *in vitro* entre Rocoto (*Capsicum pubescens*) en comparación con el extracto de capsaicina y controles (positivos y negativos) al 25% sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 a las 5,10,15,20,25,30 horas.
- 1.3.2.3 Determinar la eficacia antibacteriana *in vitro* entre Rocoto (*Capsicum pubescens*) en comparación con el extracto de capsaicina y controles (positivos y negativos) al 50% sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 a las 5,10,15,20,25,30 horas.
- 1.3.2.4 Determinar la eficacia antibacteriana *in vitro* entre Rocoto (*Capsicum pubescens*) en comparación con el extracto de capsaicina y controles (positivos y negativos) al 75% sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 a las 5,10,15,20,25,30 horas.



## 1.4 JUSTIFICACIÓN

**a. Relevancia Científica:** El presente trabajo de investigación tiene fundamentos científicos; relacionados a la enfermedad periodontal, bacterias odontopatógenas y está relacionada a la medicina natural. Aporta conocimientos enfocándose en el estudio de las bacterias *Porphyromonas gingivalis* causante de la enfermedad periodontal en relación con el Rocoto (*Capsicum pubescens*) y uno de sus compuestos “la capsaicina” atribuyéndole un efecto antibacteriano sobre las cepas antes mencionadas.

Mediante un análisis detallado de los compuestos se buscó contrastar estudios previos con nuestra investigación con resultados reales, además si este fruto en sus diferentes concentraciones y presentaciones tendrá o no un efecto positivo antibacteriano sobre estas cepas.

**b. Relevancia Social:** Si se comprueba la efectividad antibacteriana del Rocoto (*Capsicum pubescens*) y la Capsaicina, permitirá el uso y posible aplicación en la medicina tradicional. Ya que este estudio es netamente *in vitro* y realizado en un grupo aislado de bacterias, también se podrá estudiar en animales de experimentación y en un futuro como irrigante en el mismo tejido periodontal de humanos.

**c. Implicaciones Prácticas:** La medicina alternativa es usada en nuestra población a diario, pero muchas veces es de forma empírica ya que no se está científicamente comprobado si un alimento ya sea fruto o planta tendrá efectivamente las propiedades deseadas. Con este trabajo de investigación se busca demostrar que el Rocoto (*Capsicum pubescens*) y la Capsaicina poseen los beneficios antibacterianos sobre bacterias periodonto patógenas siendo de aporte para la ciencia, futuras investigaciones y a la población.



**d. Originalidad:** Se encontraron antecedentes internacionales y nacionales mas no locales ni regionales, por lo que es original en nuestro medio, siendo un estudio nuevo ya que aún no se estudió profundamente el efecto que podría tener el uso del Rocoto (*Capsicum pubescens*) así como la capsaicina como medicamento alternativo en la cavidad oral, encías, y/o bacterias causantes de enfermedades periodontos patogénicos, la investigación es beneficiosa para los profesionales y pacientes.

## 1.5 LIMITACIONES

### a. Limitaciones Bibliográficas

Pocas fuentes bibliográficas, se encontró muy pocos estudios pasados con respecto al tema en específico, pero sí relacionados con otras bacterias y/o microorganismos. No se encontró antecedentes locales y nacionales con respecto al tema.

### b. Limitaciones Económicas

Ninguna

## 1.6 ASPECTOS ETICOS

El presente trabajo se desarrolló con todos los procedimientos reales y veraces teniendo en cuenta todas las normas de bioseguridad basándonos en el “Manual de Bioseguridad en el Laboratorio” redactado por la Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>1</sup>. Se evaluaron los riesgos, contaminantes biológicos, transporte adecuado de materiales, sustancias infecciosas, y protección biológica. Sobre todo, cuidando la integridad de los participantes del proceso de experimentación.

Se tomo en cuenta toda la información de seguridad proporcionada por la misma empresa Microbiologics expendedora de las cepas *Porphyromonas gingivalis* en cuanto al uso, manejo, almacenamiento, etc. tanto del operador como el microorganismo.



## CAPITULO II

### 2. MARCO TEORICO

#### 2.1 ANTECEDENTES DE INVESTIGACIÓN.

##### 2.1.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES

**Toyoda T. et al, Japón (2016).** En su investigación titulada “Efectos antiinflamatorios de la capsaicina y la piperina en la gastritis crónica inducida por *Helicobacter pylori* en jerbos mongoles” realizado en la: División de Patología, Instituto Nacional de Ciencias de la Salud.

**OBJETIVO:** Se evaluó los posibles efectos quimiopreventivos de los compuestos derivados de especias (curcumina, capsaicina y piperina) sobre la gastritis inducida por *Helicobacter pylori*. **METODOLOGIA:** El método para determinar los efectos inhibidores fue mediante las unidades formadoras de colonias y la RT-PCR en tiempo real en células de cáncer gástrico estimuladas por *Helicobacter pylori* AGS. **RESULDADOS:** Los tres compuestos inhibieron la proliferación in vitro de *Helicobacter pylori*, siendo la curcumina la más efectiva en cuanto a la capsaicina también disminuyó los neutrófilos en el antro, el corpus. la infiltración de células mononucleares y las glándulas proliferativas heterotópicas en el cuerpo. **CONCLUSION:** La capsaicina y la piperina tienen efectos antiinflamatorios sobre la gastritis inducida por *Helicobacter pylori* en jerbos independientes de los efectos antibacterianos directos y, por lo tanto, pueden tener potencial para la quimio prevención de la carcinogénesis gástrica asociada a *H. pylori*.<sup>8</sup>

**Marini E. et al, Italia (2015)** En la investigación titulada “Actividad antimicrobiana y anti virulencia de la capsaicina contra *Streptococos* del grupo A resistentes a la eritromicina e invasivos de células”, realizada en la universidad de Universidad Politécnica de Las Marcas.





**OBJETIVO:** Esta investigación tuvo como objetivo el estudio de la capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenamida) su actividad antibacteriana y anti-virulencia *in vitro* contra *Streptococcus pyogenes* (estreptococos del grupo A, GAS), un importante patógeno humano. **METODOLOGIA:** Se utilizó el método de formación del biofilm, fue cuantificado midiendo la absorbancia a 690 nm con Multiscan Ascent apparatus, la densidad óptica DO del punto cortante DOc (cutt-off) se definió como tres desviaciones estándar por encima de la DO media del control negativo, representados por pozos no inoculados que contienen TSB. Las cepas se clasificaron como no productoras ( $DO \leq DOc$ ), productor débil ( $DOc < DO \leq 2 \times DOc$ ), o productor fuerte ( $DO > 4 \times DOc$ ). La cepa formadora de biopelículas *S. epidermidis* ATCC 35984 se utilizó como control positivo. Con concentraciones de (8, 16 y 64  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ). **RESULTADOS:** A una concentración de 64  $\mu\text{g} / \text{mL}$  ( $1/2 \times \text{MIC}$ ), la producción de biopelícula fue de (0,6 de densidad óptica) cayó del 4 al 97% en todas las cepas con respecto al control negativo, pero sin efectividad antibacteriana. **CONCLUSIÓN:** La capsaicina tiene una actividad bactericida prometedora contra los aislados de GAS faríngeos invasivos de células resistentes a la eritromicina e inhibe la invasión intracelular y la actividad hemolítica.<sup>7</sup>

**Zhou Y. et al, China (2013).** En su estudio titulado “La capsaicina inhibe el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis*, la formación de biopelículas, la secreción de citoquinas inflamatorias gingivales y la osteoclastogénesis *in vitro*” redactado en el libro “Revista Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas”, realizado en el Laboratorio de Enfermedades Orales, hospital de Estomatología al este de China y la Universidad de Sichuan China, se escribe lo siguiente:

La capsaicina, un agonista del receptor de vaniloides subtipo 1 (TRPV1) y debido a su actividad bacteriostática contra bacterias Gram negativas y efectos antiinflamatorios, parece ser un fármaco prometedor. Se cultivo en medio TSB-extracto de levadura complementado con Clorhidrato.

**OBJETIVO:** El objetivo del trabajo muestra la actividad antimicrobiana de la



capsaicina sobre el crecimiento de reproducción del biofilm formado por las *Porphyromonas gingivalis*. **METODOLOGIA:** Se utilizó la metodología de MIC y MBC, se prepararon diluciones dobles en serie de capsaicina a volúmenes de 100  $\mu$ l / pocillo en placas de 96 pocillos. Las concentraciones finales de capsaicina variaron de 0.5 a 64 mg / l en los cuales colocaron 20  $\mu$ l e suspensión de células bacterianas de *P. gingivalis* a una concentración final de  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias (UFC) / ml. Después de la incubación en una cámara anaeróbica a 37° C durante 24 h. **RESULTADOS:** Los resultados a los que se llegaron demostraron que estudios cinéticos de tiempo-muerte fueron conducidos, el efecto asesino de la capsaicina en *P. gingivalis* fue de (0  $\log_{10}$  UFC/ml) dependiente del tiempo desde las cero horas a una concentración de 64 mg / l, la capsaicina en su máxima concentración mostró una curva de muerte con un patrón similar al observado en clorhexidina al 0.05%. **CONCLUSION:** Se llegó a la conclusión que la capsaicina no solo mató a *P. gingivalis* dentro de la biopelícula, pero también mostró habilidades para inducir biopelículas maduras en un estado desintegrado.<sup>6</sup>

**Moreno S. México (2012).** En su investigación titulada “Efecto antifúngico de capsaicina y extractos de chile piquín *Capsicum annum*, sobre el crecimiento *in vitro* de *Aspergillus flavus*” realizado en el Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

**OBJETIVO:** Esta investigación fue estudió el chile piquín, por su capacidad de reducir los riesgos de contraer cáncer y como bactericida, y evaluar la actividad biológica de extractos etanólicos de frutos de chile piquín (*Capsicum annum L. var aviculare*) y de capsaicina, sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus*. **METODOLOGIA:** La metodología que se uso fue mediante el MIC pozo en agar (se colocó concentraciones de 1000, 800 600, 400 y 200 ppm, equivalentes a 2, 1.6, 1.2, 0.8 y 0.4 mg respectivamente) y la lectura de los halos de inhibición. **RESULTADOS:** Se demostró que tienen mayor efecto los extractos de chile, al registrarse halos de inhibición de hasta



10.9 mm, mientras que con la capsaicina los halos fueron de 8.28 mm.

**CONCLUSION:** La capsaicina presenta menor inhibición, se mostró con las concentraciones de 1.2 y 2.0 mg con 3 y 4.67 mm de diámetro. Por otra parte, los extractos de chile piquín en todas las concentraciones muestran una mayor inhibición que la capsaicina.<sup>5</sup>

**Kalia NP. et al, India (2012).** En su investigación titulada “La capsaicina, un nuevo inhibidor de la bomba de reflujo NorA, reduce la invasión intracelular de *Staphylococcus aureus*” estudio realizado en la División de Microbiología Clínica, Instituto Indio de Medicina Integrativa, India.

**OBJETIVO:** Esta investigación tuvo como objetivo descubrir por primera vez el efecto potenciador de la capsaicina con ciprofloxacina en estudios de combinación in vitro contra *S. aureus*, como un inhibidor de la bomba de eflujo NorA y su impacto sobre la invasión de macrófagos por *Staphylococcus aureus*. **METODOLOGIA:** Se realizó el método de curva de tiempo muerto, se usó suspensión bacteriana en su fase logarítmica ( $1 \times 10^6$  UFC / ml) como inóculo. Se ensayó ciprofloxacina a 2 mg / l ( $0,25 \times \text{MIC}$ ) sola y en combinación con capsaicina en la concentración de MEC (25 mg / l). La UFC/ml se determinó mediante un método de dilución en serie por triplicado en TSA a 0 (control no tratado), 2, 4, 8 y 24 h de incubación a 37°C. **RESULTADOS:** La capsaicina a una concentración de 25 mg/l no redujo significativamente el crecimiento de *Staphylococcus aureus* con un crecimiento bacteriano de hasta  $10 \log_{10}$  UFC / ml sin efectividad antibacteriana, en cambio con la combinación de ciprofloxacina aumento la actividad bacteriostática hasta 2 a 4 veces de  $\log_{10}$  UFC por debajo del UFC ( $0 \log_{10}$  UFC / ml) inicial a las cero horas. **CONCLUSION:** Se llegó a la conclusión que la capsaicina junto a la ciprofloxacina, no solo inhibe la bomba de eflujo NorA de *S. aureus*, sino que también reduce la invasividad de *S. aureus*, lo que reduce su virulencia.<sup>4</sup>



**Lee I. et al. Corea del Sur (2007).** En su investigación titulada “Efecto antiinflamatorio de la capsaicina en *Helicobacter pylori* infectado en células epiteliales gástricas” realizada en la División de Gastroenterología, Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina de la Universidad de Yonsei, se realizó la siguiente investigación:

**OBJETIVO:** Tuvo como objetivo demostrar que la capsaicina inhibe la liberación de citoquinas proinflamatorias, interleucina-8 (IL-8) por células epiteliales gástricas infectadas por *H. pylori*. **METODOLOGIA:** Se utilizaron cultivos mediante un ensayo ELISA en el cual las células epiteliales gástricas se pre-trataron con diversas concentraciones de capsaicina y se infectaron con *H. pylori* durante diferentes períodos de tiempo para determinar las concentraciones de IL-8. **RESULTADOS:** Se demostró que capsaicina inhibe la producción de IL-8 inducida por *H. pylori* por células epiteliales gástricas donde la mínima concentración inhibitoria de la capsaicina en *H. pylori* o células gástricas fue de 50 a 250 (mol/L) en el cual durante 24 horas redujeron significativamente la producción de IL-8 en 40.9%, 77.9% y 97%, respectivamente, en comparación con las células infectadas con *H. pylori* sin capsaicina. **CONCLUSIÓN:** La capsaicina reduce el gen IL-8 transcripción y secreción de proteína IL-8 por *H. pylori* infectada células epiteliales gástricas y el efecto inhibitor de la capsaicina en la transcripción de ARNm inducida por *H. pylori*.<sup>3</sup>

**Colivet J, Venezuela (2006).** En su investigación titulada “Comparación del efecto inhibitor de extractos de ají dulce (*Capsicum chinense*) sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Bacillus sp*” realizado en Universidad de Oriente.

**OBJETIVO:** Evaluar la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos, etéreos y acuosos de ají dulce (*Capsicum chinense*), sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Bacillus sp*. **METODOLOGIA:** El método utilizado fue por halos de inhibición el cual se sembraron (*Escherichia coli* y *Bacillus sp*.) en placas con agar nutritivo, posteriormente, se colocaron discos de papel de



filtro estériles impregnados con dos gotas del extracto a concentraciones de 0, 25, 50, 75 y 100% y otro con el solvente empleado en la extracción (control). **RESUTADOS:** Los resultados fueron; los extractos con ají dulce verde secados a 100°C tuvieron un efecto inhibitor mayor para *Escherichia coli* que los obtenidos con ají secado a 70°C y los extractos del ají secado entero fueron los que presentaron mayor poder inhibitorio del crecimiento de *Bacillus sp* además que el extracto obtenido con ají secado entero a 100°C fue más inhibitorio (16,82 mm) en comparación a 70°C (12,25 mm), **CONCLUSION:** En conclusión los extractos etanólicos de ají dulce verde fueron los únicos que presentaron actividad antibacteriana sobre *Escherichia coli* y *Bacillus sp*, además que el corte (longitudinal) y la temperatura (100°C) de secado tuvieron efecto significativo sobre la actividad antimicrobiana de los extractos. <sup>2</sup>

### 2.1.2 ANTECEDENTES NACIONALES

**Salazar E, Lima (2016).** En su investigación titulada “Efecto bacteriostático y bactericida de extractos de ají panca (*Capsicum chinense*) y pimienta (*Capsicum annum var. annum*) sobre cultivos de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923”, realizada en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Mayor de San Marcos.

**OBJETIVO:** Evaluar la actividad bacteriostática y bactericida de oleorresinas de ají panca y de pimienta; dos especies botánicas de uso extendido en nuestro medio; frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

**METODOLOGIA:** Se utilizó distintas metodologías de estudio los cuales son; métodos de la microdilución en microplacas de 96 pocillos diferentes concentraciones de oleorresina de ají panca y de pimienta, los caldos de cultivo fueron a base de TBS. El estudio de Virología se determinó mediante la densidad óptica, para finalizar con la determinación de supervivencia de las bacterias expuestas a diferentes concentraciones de oleorresina por 22 horas, cada muestra de pocillo se sembró en placas Petri con agaros específicos a 35°C por 48h. **RESULTADOS:** No existe efecto bacteriostático



para ambas cepas. Asimismo, la viabilidad de *E. coli* no fue afectada por los dos extractos mientras que para *S. aureus* solo el ají panca no afecto su viabilidad, pero si hubo un efecto bactericida para *S. aureus*, el cual fue observado con el extracto de pimiento a concentraciones de 25%, 12.5% y 6.25%. **CONCLUSION:** Los extractos vegetales poseen una gran variabilidad en cuanto a contenido de compuestos activos y su efecto antimicrobiano.<sup>9</sup>

### **2.1.3 NO SE ENCONTRARON ANTECEDENTES LOCALES NI REGIONALES**



## 2.2 BASES TEÓRICAS.

### 2.2.1 *Porphyromonas gingivalis*

Es una bacteria Gram negativa, anaerobia estricta, no móvil, que aprovecha las condiciones que da el huésped para generar mayor daño. Esta bacteria induce a varios factores de virulencia, así como su capacidad de invadir células periodontales, dándose una protección contra el sistema de defensa del huésped. También este microorganismo se le conoce, como un factor de riesgo o patógeno que contribuye al desarrollo de infecciones pulmonares, parto pretérmino y bajo peso al nacer. Su acumulación en placas ateroscleróticas incrementa el riesgo de infarto del miocardio, aislándose también de abscesos dento-alveolares y trompas ováricas.<sup>10</sup>

Este microorganismo manifiesta una serie de factores de virulencia, tales como fimbria, enzimas proteolíticas, hemaglutininas, lipopolisacáridos (LPS) y cápsula y exhibe una diversidad genotípica y serotípica que permite una variabilidad intra-especie con la potencialidad de producir inflamación y destrucción periodontal.<sup>10</sup>

#### 2.2.1.1 TAXONOMIA

El género *Bacteroides*, en su primera clasificación tiene agrupadas un conjunto de bacterias heterogéneas, con características de ser anaerobios estricto, Gram negativo, no esporulados y de forma bacilar, al haber aplicado nuevas técnicas de identificación a base de biología molecular, como el ADN-ADN hibridación, y estudio de sus características bioquímicas, se pudo identificar un grupo homogéneo de especies a partir de los *bacteroides*, llamados ahora *Porphyromonas*, que en sus inicios estuvo formando por 3 especies, *P. gingivalis*, *P. asaccharolyticus* y *P. endodontales*.



Estas especies tienen como características ser no fermentadores, utilizar como sustrato el nitrógeno y obtener su energía a partir de triptocasa y peptona.<sup>10</sup>



Figura N° 1: Fandiño V, Muñoz E, Parra A, Salgado Y. Representación de *Porphyromonas gingivalis* y la liberación de vesículas secretoras y sus productos. [Internet]. 2013 [citado 19 Jun 2018]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/ceso/v28n1/v28n1a6.pdf>

### 2.2.1.2 MORFOLOGIA Y ESTRUCTURA

*Porphyromonas gingivalis* es un bacilo corto o cocobacilo, varillas cortas que tienen como medida aproximadamente de 0.5 - 0.8  $\mu\text{m}$  x 1 - 3.5  $\mu\text{m}$  anaerobio estricto, Gram negativo, siendo considerado un comensal en la cavidad oral (infecciones orales, conductos radiculares, periodontitis). Su pared celular presenta a nivel de la membrana externa las endotoxinas, son capsulados, no esporulados, sin flagelos y abundantes fimbrias de diferentes tipos. En su superficie presenta vesículas las cuales contienen una variedad de enzimas estas juegan un rol importante en su virulencia. También produce múltiples enzimas con capacidad de degradar compuestos proteicos.<sup>10</sup>

Generalmente las células que se forman son de color desde marrón a negro en el agar suplementado con sangre.

### 2.2.2.3 FACTORES DE VIRULENCIA:

**A) CAPSULA:** Conformado por polisacáridos, este gen codificante de epimerasa psC esencial para su síntesis, existiendo 6 serotipos





capsulares de K1 – K6. Esta tiene un rol importante en la evasión del sistema inmunológico, eludiendo la fagocitosis, opsonización y accionar del complemento.<sup>10</sup>

**B) ENDOTOXINA (LPS):** Se localiza en la membrana externa de la bacteria, compuesta en parte por el lípido A, la cual participa en la interrupción de la homeostasis inmunológica del huésped, ocasionando inflamación gingival, asociada con la destrucción del tejido conectivo y la reabsorción del hueso alveolar por activación de osteoclastos, la cual causa la liberación de prostaglandinas E, y un incremento de IL18 y IL1B.<sup>10</sup>

**C) VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA:** Son sacos cerrados que se encuentran a un nivel más externo de la bacteria, en su interior presentan numerosas enzimas como; fosfolípasa C, proteasas, fosfatasa alcalina, hemolisinas, lipopolisacáridos dichas enzimas son liberadas ocasionando daño a las células periodontales y neutrófilos.<sup>10</sup>

**D) HEMAGLUTININAS:** Son proteínas codificadas por el gen *hag* y pueden ser 5 de A-E, inducen la colonización por mediación de la unión bacteriana a receptores oligosacáridos en células humanas.<sup>10</sup>

**E) FIMBRIAS:** Presentes en forma peritrica de 0.3 a 3.0  $\mu\text{m}$  de largo y 5 nm de ancho, conformados por monómeros de fimbrilina, codificados por el gen *fim A*, clasificándose en 6 variantes, del tipo I al V y el Ib. Tienen una gran capacidad de unirse a distintos sustratos, moléculas, y células, como epitelial, fibrinógeno, fibronectina, lactoferrina. A su vez presenta propiedades quimio tácticas y de inducción de citoquinas. Se ha podido identificar a las *P. gingivales* con fimbrias *fimA* tipo II y IV en la progresión de la periodontitis y a las de tipo I, V en adultos sanos.<sup>10</sup>

**F) PROTEÍNASAS CISTEINPROTEASAS:** Son compuestos bacterianos que proporcionan nutrientes para el crecimiento bacteriano, produciendo un daño irreversible al huésped, degradando colágeno de diferentes tipos. Estas proteínas son llamadas gingipainas, produciendo



el 85 % de la actividad proteolítica generada por *P. gingivalis* y el 100 % de la actividad tipo tripsina. Las gingipainas son producidas por 3 genes rgpA, rgpB, Kgp. Se determinó que entre las acciones que producen son; la degradación de fibronectina, fibrinógeno y de las uniones de las células epiteliales, activación del sistema de coagulación y sistema calicreina – quinina. Es así que logran Interrumpir en la defensa del huésped al degradar IL, un importante quimiotáctico y C3 cuya activación produce C3a y C3b, este último un potente opsonizante.<sup>10</sup>

**G) PROTEÍNAS NO CISTEINPROTEASAS:** Aquí encontramos a la colagenasa, proteasa, hemaglutinina, una enzima tipo convertora de endotelina, una dipeptidilpeptidasa y la periodontaina, que podrá degradar las proteínas desnaturalizadas y los polipéptidos.<sup>21</sup>

**H) INDUCTOR DE METALOPROTEINASAS DE LA MATRIZ:** Es inducido por la *P. gingivalis*, para que sea producida por fibroblastos, leucocitos y macrófagos también conocidas como metaloproteinasas que degradan la mayoría de moléculas de la matriz extracelular, como el colágeno, fibronectina y la laminina. La *P. gingivalis* inactiva los inhibidores tisulares de metaloproteinasas, específicamente el tipo 1, la cual está relacionada a la destrucción del colágeno tipo I y fibronectina.<sup>10</sup>

**CUADRO N° 1: FACTORES DE VIRULENCIA DE *P. gingivalis***

FACTOR DE VIRULENCIA	TAXONOMIA	EFECTOS PRINCIPALES	EVIDENCIA
<b>LPS</b>	01, 02, 03	Tiene receptores tipos Toll 2 y 4. Induce secreción de citoquinas pro inflamatorias	24 y 42
<b>CAPSULA</b>	Ki, K2, K3, K4, K5, K6	Induce diferenciación de ferotipos Th1, Th2, Th17 y Treg	5, 14 y 73
<b>FIMBRINA</b>	I, Ib, II, III, IV, V	Evasión de fagocitos Activación de RANKL	26, 33
<b>Gen kgp</b>	I, II	Enzima proteolítica	25
<b>Gen rgpA</b>	A, B, C	Enzima proteolítica	25



<b>Gingipaina</b>	R, K	Edema Inflamación de neutrófilos Aumento de sangrado gingival	36
-------------------	------	---	----

FUENTE: Yáñez Figueroa. Factores de virulencia de *P. gingivalis*. Variabilidad de genotipos y/o serotipos [Internet]. 2012 [citado 19 Jun 2018]. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/piro/v5n1/art07.pdf>

#### 2.2.1.4 FISIOPATOLOGIA:

*Porphyromonas gingivalis* es considerado un colonizador secundario, comensal del surco gingival, que se localiza por medio de contagio o transmisión de individuos infectados, a través de la saliva. Su capacidad principal es la de adherirse por sus fimbrias peritricas tipo Ib, II, así como por sus vesículas de membrana, hemaglutininas, cápsula, que le permiten la colonización del surco para así poder adaptarse e invadir las células epiteliales teniendo un periodo de adaptación de 20 minutos aproximadamente, y reproduciéndose dentro de ellas como diseminarse a las células de alrededor. Al solo invadir la célula, tendrá la capacidad de evadir las defensas del huésped. Así también degradar diferentes proteínas, componentes del surco gingival, ligamento periodontal y hueso alveolar, además de alterar la respuesta innata y específica del hospedero. El huésped al verse atacado por la bacteria activa una diversidad de respuestas que logran incrementar el proceso inflamatorio, presente en el surco, creando un proceso crónico de destrucción del periodonto.<sup>10</sup>

También tiene la capacidad de adherirse a diversos tejidos y células del hospedero, la habilidad de invasión y multiplicación. Las fibrinas se comportan como adhesivas y posibilitan a la *Porphyromonas gingivalis* la adherencia y congregación, especialmente observada entre la *Porphyromonas gingivalis* y el *Fusobacterium nuclatun* microorganismo considerado puente de la microbionta gingival.<sup>11</sup>

La *Porphyromonas gingivalis* tiene la capacidad de crecer en escasez de hierro, puede formar más vesículas y mayor actividad de proteasa tipo



tripsina. Logrando que las proteínas se degradan a tipos I y IV de colágeno, las anteriores mencionadas son principales componentes de proteínas de la matriz intercelular y del tejido conectivo.<sup>11</sup>

La LPS de la *Porphyromonas gingivalis* específicamente del tipo A produce citosinas las cuales son capaz de estimular la respuesta inflamatoria del hospedador.<sup>11</sup>

### **2.2.1.5 *Porphyromonas gingivalis* Y SU RELACIÓN CON LA PERIODONTITIS CRÓNICA:**

Una de las patologías más comunes en la cavidad oral es la periodontitis crónica, en su etiología bacteriana más predominante podemos destacar a los siguientes microorganismos: *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, siendo considerandos el grupo más agresivo en esta lesión. Pero es la *Porphyromonas gingivalis* la predominante en esta patología. En el Perú, según MINSA, la enfermedad periodontal, presenta una prevalencia de 85-87 %, no habiendo reportes de exactamente sobre la periodontitis crónica, la cual se presenta en su mayoría en personas por encima de los 40 años. La bacteria una vez que llega a su habitat, se logra condicionar en un medio de óxido reducción, ya que tiene una diversidad de factores de virulencia, rompe la homeostasis en el surco, generando una destrucción continua y agresiva de los tejidos de sostén del diente, logra así degradar hueso y tejidos blandos. La destrucción que provoca logra generar signos clásicos como enrojecimiento perisulcular, incremento de la profundidad del surco gingival, sangrado al estímulo, movilidad de diversos grados y cuando estas lesiones se vuelven crónicas se puede llegar a perder la pieza dentaria.<sup>11</sup>

Las investigaciones han concluido que el “lípid A” el cual se encuentra en la superficie externa de la *Porphyromonas gingivalis*, es capaz de tener una interacción directa con un regulador clave del sistema inmune



del huésped llamado TLR4 (Receptor 4 tipo Toll) pudiendo producir distintas versiones del lípido A, es así que logran modificar la respuesta inmune y contribuyen a la capacidad del patógeno para sobrevivir y causar inflamación, primero se hará evidente a nivel local luego hacia todo el nivel oral ocasionando la pérdida de hueso alveolar y luego el daño será a nivel sistémico afectando a los vasos sanguíneos distantes.<sup>12</sup>

Se puede concluir que la *Porphyromonas gingivalis* tiene la capacidad de puede interactuar con la estructura lipídica de las células logrando modificar su estructura para así poder invadir las células de defensa del huésped estableciendo un estado crónico de infección induciendo a la inflamación.<sup>12</sup>

#### **2.2.1.6 *Porphyromonas gingivalis* Y SU RELACIÓN CON LA PERIODONTITIS AGRESIVA:**

La asociación de *Porphyromonas gingivalis* constituyen el llamado complejo rojo, estos patógenos que estarían implicados en la destrucción y avance del tejido periodontal junto con *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

Se pudo evidenciar una correlación entre citomegalovirus humano y *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia*, estos microorganismos estuvieron relacionados al ocasionar un nivel de pérdida de inserción periodontal, profundidad del saco periodontal y sangrado gingival al sondaje.<sup>12</sup>

La *Porphyromonas gingivalis* específicamente va estar presente en diversos tipos de enfermedad, siendo en la periodontitis del adulto y la periodontitis rápidamente progresiva la más predominante, y en última escala presente en la periodontitis asociada al VHI y enfermedad peri-implantaría.



### 2.2.1.7 TRATAMIENTO

La fuente de los microorganismos y su transmisión en la enfermedad periodontal tiene mucha importancia en la prevención y tratamiento de esta enfermedad. <sup>44, 45, 46</sup>

Como se mencionó anteriormente la *Porphyromonas gingivalis* es un microorganismo que va a predominar en distintos tipos de enfermedad periodontal en tejido enfermo y mayormente adulto para lo cual, para estas diversas manifestaciones clínicas, el tratamiento se puede dividir en dos tipos; mecánico y sistémico.

El antibiótico a usar deberá reunir una serie de características como, por ejemplo:

- a) Activo frente a los microorganismos involucrados en el proceso infeccioso
- b) Evitar la aparición de resistencias
- c) Adecuados parámetros farmacocinéticos
- d) Buena penetración y difusión en el lugar de la infección
- e) Buena tolerancia y pocos efectos adversos

La *Porphyromonas gingivalis* bacteria Gram negativa anaerobia, la penicilina, la ampicilina y la amoxicilina han sido clásicamente los antibióticos más utilizados en el tratamiento, pero ha desarrollado enzimas (betalactamasas) capaces de hidrolizar las penicilina y amoxicilina ocasionando un fracaso terapéutico, por lo cual descartamos su uso para este tipo de bacteria, la primera opción de tratamiento es la amoxicilina y ácido clavulánico (875/125 mg/8h x 7 días) la cual hace frente a bacterias anaerobias, así también la doxiciclina (100mg mg/12h x 2 semanas) es la tetraciclina más utilizada en la odontología en los cuadros de periodontitis de joven y adulto en las cuales la *Porphyromonas gingivalis* destaca. En la última década han aparecido nuevos medicamentos como azitromicina (500mg mg/24h x 3 días) que hace frente a bacterias anaerobias Gram negativas las cuales tienen una acción más prolongada y mayor soporte en un medio ácido en más



tejidos. Y el uso de la clindamicina en caso de alérgicos a la penicilina.  
44, 45, 46

Por otro lado, también de mucha importancia tenemos el tratamiento del control mecánico y local los cuales consistirán en el raspado y alisado de las zonas afectadas junto con antibióticos locales como la clorhexidina al 0.12 % aplicado 2 veces por día por un periodo de 10 a 14 días según la evolución de la lesión.<sup>44, 45, 46</sup>

## 2.2.2 CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO

El crecimiento bacteriano se definirá por el aumento de números de células de un determinado microorganismo dentro de un medio nutritivo que ayuda a su reproducción. Este se realizará por fisión binaria reproduciéndose de forma exponencial. Se divide en las siguientes etapas.

- Fase de latencia o adaptación: No habrá un aumento significativo en la densidad celular, en el cual el inoculo bacteriano se adapta al medio nutritivo donde las células sintetizan la mayor cantidad de enzimas para su metabolismo celular, la edad del inoculo influye mucho en el tiempo de duración de esta etapa, si el inoculo es viejo o reutilizado tomara más tiempo la adaptación.<sup>13,14</sup>
- Fase exponencial: El crecimiento por la unidad de tiempo de la masa y número de células se, mantienen constantes, quiere decir que el crecimiento es sincrónico donde el crecimiento aumenta exponencialmente, dependerá mucho de la temperatura, pH, y medios aerobios o anaerobios que la bacteria requiera.<sup>13,14</sup>
- Fase estacionaria: No hay cambios significativos en la densidad celular manteniéndose mismo número de bacterias vivas y muertas, por lo que no hay un aumento de células sin actividad metabólica, En esta etapa se van agotando los suministros necesarios de nutrientes es más se observan suministros metabolitos tóxicos.<sup>13,14</sup>



- Fase de muerte: El equilibrio metabólico desaparece y predominan más bacterias muertas por lisis celular, no hay nutrientes para el recambio y las condiciones para el crecimiento son adversas.<sup>13,14</sup>



Figura N° 2: Curva de Crecimiento Bacteriano [Internet]. [citado el 28 agosto 2015]. Disponible en: <https://es.slideshare.net/Altajimenez/curva-de-crecimiento-bacteriano>

### 2.2.2.1 CURVA DE CRECIMIENTO RELACIONADO A LA DENSIDAD OPTICA

Mediante la curva de crecimiento se establecieron relaciones entre la densidad óptica y absorbancia, de los cuales se determinará la densidad celular, las lecturas se hacen cada 2 horas o 30 minutos dependiendo del investigador con el uso de un espectrofotómetro el cual mide la absorbancia óptica.

Se busca contrastar los resultados de la absorbancia con el tiempo, para crear una curva de crecimiento la cual nos muestre las fases de vida de un microorganismo.<sup>13, 14</sup>

### 2.2.3 ESPECTROFOTOMETRIA

La espectrofotometría es una de las técnicas experimentales de análisis óptico instrumento que tiene la capacidad de manejar un haz de Radiación Electromagnética (REM) y la detección de moléculas de diferentes maneras que se presenten como por ejemplo





contaminante, microorganismos, biopelículas, etc. La espectrofotometría usa fundamentos físico-químico bastante sencillo como: Las moléculas a estudiar pueden absorber energía luminosa y almacenarla en forma de energía interna.<sup>15, 16,17</sup>

Es así que la espectrofotometría se significa la medida del espectro de la luz refiriéndose al tipo y medida de la cantidad de luz de la solución. Cuando la luz monocromática incide (a una sola longitud de onda) sobre un medio homogéneo, dicha luz en parte es absorbida y la otra transmitida en este medio. Dependiendo a su presentación ya sea líquida, sólida o gaseosa cada sustancia tiene su propio espectro de absorción, por medio de esta se formará una curva la cual mostrará la cantidad radiante de energía absorbida.<sup>15, 16,17</sup>

### 2.2.3.1 ESPECTROFOTOMETRO

El espectrofotómetro es un equipo e instrumento utilizado en la física óptica, el cual sirve para medir la absorbancia de un espectro de luz, para así poder realizar la cuantificación de microorganismos y sustancias, este equipo presenta varios tipos por ejemplo de absorción química o de masa. (38,39)

Este instrumento funciona de la siguiente manera:

Primero se deberá ajustar la longitud de onda correspondiente a nuestras cepas en ese caso es de 600 nm este será el rayo de luz de acuerdo al largo de onda escogido.<sup>18, 19</sup>

El espectrofotómetro se deberá “blanquear” antes de cada lectura con la solución que se vaya a utilizar en la cubeta de 2 ml, así mismo con las soluciones control que tenga todos los componentes. Este tiene la capacidad de leer la absorbancia de las muestras, para después de ajustar las mismas a cero.<sup>18, 19</sup>

Después se realizarán las lecturas correspondientes de todas las muestras obteniendo el número de absorbancia del mismo. Para lo



cual ocurrirá en siguiente fenómeno; la luz emitida por el espectrofotómetro pasa por una hendidura que determina la intensidad del haz. Este haz atraviesa la muestra y llega a un tubo fotográfico, donde es medido. La cantidad de luz que atraviesa la muestra es el porcentaje (%) de transmitida y el equipo nos mostrara la cantidad de absorbancia obtenido de acuerdo a esta correspondientes a ley de "LAMBERT-BEER".<sup>18, 19</sup>

### 2.2.3.2 ABSORBANCIA

Está definida como la cantidad de energía radiante absorbida por la sustancia a estudiar pura o en solución. En relaciona la transmitancia corresponde a su logaritmo negativa o expresada en su fracción decimal (% T) ósea transmitancia expresada como porcentaje.<sup>15, 16,</sup>

$$A = -\log T = 2 - \log \%T$$

$$T = P / P_0 = 10^{-abc}$$

$$A = -\log (P / P_0) = -\log 10^{-abc}$$

$$A = a b c$$

### 2.2.3.3 TRANSMITANCIA

Es la razón entre la luz monocromática transmitida (P) por una muestra y la energía o luz incidente (Po) sobre ella. Tanto la energía radiante incidente como la transmitida deben ser medidas a la misma longitud de onda.<sup>15, 16</sup>

$$T = P / P_0 = 10^{-abc} \quad \text{ó} \quad \%T = 100 P / P_0$$

Se acostumbra a considerar la transmitida como la razón de la luz transmitida por la muestra y la luz transmitida por un estándar arbitrario.

El aparato detecta la cantidad de "luz" transmitida y/o absorbida a través de la solución en la celda y la compara con la que se transmite o absorbe a través de una solución de referencia o "blanco".<sup>15, 16</sup>



#### 2.2.4 ROCOTO (*Capsicum pubescens*)

Es un fruto del género *capsicum* utilizado como salsa picante en la cocina latinoamericana, es capaz de producir un grupo único de alcaloides llamados capsaicinoides que le confieren y dan ese picante al fruto. El cultivo del rocoto se remonta desde épocas pre-incas hasta la actualidad. Este fruto es el principal condimento consumido por la mayoría de personas sin tener la mínima idea del valor alimenticio, vitamínico y el papel importante que podría estar desempeñando en la dieta diaria, aun cuando sea usado en pequeñas proporciones.<sup>20</sup>

Su nombre científico es *Capsicum pubescens*; más conocido como rocoto; perteneciente a la familia *Solanáceas*, generalmente sus zonas de producción son los valles andinos y la época de siembra es todo el año teniendo en cuenta un clima templado.<sup>20</sup>

Esta es una especie que tiene características muy especiales por las cuales se puede distinguir de otras especies cultivadas, como el color de la flor, además del color de sus semillas, los frutos son muy variables en forma, pungencia y tamaño. El fruto tiene un color rojo, naranja o café, *Capsicum pubescens* crece entre 1500 y 3300 m.s.n.m. y es común en la región de los Andes de Colombia, Perú, Ecuador y Bolivia.<sup>20</sup>



Figura N° 3:Rocoto manzano, locoto (*Capsicum pubescens*) [Internet]. [citado el 19 Jun 2018]. Disponible en: <http://www.spicegarden.eu/Semillas-de-Rocoto-manzano-locoto-Capsicum-pubescens>



El color también puede variar desde el rojo, verde naranja o amarillo. Su comercialización se produce en un su estado natural en los países y mexicanos, bolivianos y peruanos, también se logra adquirir en diferentes presentaciones como pasta y polvo. Tiene como característica las hojas pubescentes por lo cual tiene ese nombre y sus flores son de color violeta.<sup>20</sup>

#### 2.2.4.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL *Capsicum pubescens*

**División:** *Fanerógamas*

**Sub-división:** *Angiospermas*

**Clase:** Equisetopsida C. Agardh

**Sub clase:** *Magnoliidae Novák ex Takht.*

**Orden:** *Solanales Juss. ex Bercht. & J. Presl*

**Sub Orden:** *Asteranae Takht.*

**Familia:** *Solanaceae Juss*

**Género:** *Capsicum L.*

**Especie:** *Capsicum pubescens R y P*

**Nombre común:** Rocoto

#### FUENTE:

SARDÓN E. Clasificación sistemática del rocoto [Internet]. 2015 [citado el 19 Jun 2018]. Disponible en: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/2071/E70-S37-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>  
<https://www.tropicos.org/Name/29603363?langid=66>

RUIZ H, PAVÓN JA. Flora Peruviana, et Chilensis 2: 30. 1799. Trópicos [Internet]. 1799 [citado el 19 febrero Del 2019]. Disponible en: <https://www.tropicos.org/Name/29603363?langid=66>



Este fruto presenta una flor por nudo (en cada axila), donde sus pedicelos son erectos durante la entesis. La corola es de color púrpura o morada, con un color blanco en las zonas marginales de los lóbulos; no existiendo manchas en la base de esta. El cáliz no presenta constricciones anulares, pero si dientes. Sus frutos son lisos y persistentes, de semillas negras. Dentro de sus 24 cromosomas un par es acrocéntricos.<sup>21</sup>

Este fruto presenta semillas de color negro y picante, este germina más lentamente que otros chiles este se vuelve resistente a bajas temperaturas cuando ya se encuentra madura, la planta en su totalidad tiene de unos 60 a 100 cm de altura y los frutos en si unos 5 cm de largo y 5 cm de diámetro. Durante su maduración su color cambia de verde a amarillo o naranja o rojo dependiendo a la especie que representa. La cosecha se puede dar en un tiempo mínimo de 80 días.<sup>21</sup>

#### 2.2.4.2 COMPOSICION BROMATICA

En la evaluación nutricional descrita para el rocoto, se reporta 19g de grasas totales, 333mg de sodio, 5g de proteína, entre otros.<sup>21</sup>

**CUADRO N° 2: COMPOSICION BROMATICA DE *Capsicum pubescens***

PORCIONES		1	100G
<b>CALORIAS</b>	313 g	<b>SODIO</b>	333 mg
<b>GRASAS TOTALES</b>	19 g	<b>POTASIO</b>	0 mg
<b>GRASAS SATURADAS</b>	8 g	<b>CARBOHIDRATOS TOTALES</b>	0 g
<b>POLIINSATURADOS</b>	0 g	<b>FIBRA DIETETICA</b>	0 g
<b>MONOINSATURADOS</b>	0 g	<b>AZUCARES</b>	31 g



<b>TRANS</b>	0 g	<b>PRETEINAS</b>	5 g
<b>COLESTEROL</b>	0 mg		

**FUENTE:** SARDÓN E. Clasificación sistemática del rocoto [Internet]. 2015 [citado el 19 Jun 2018]. Disponible en: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/2071/E70-S37-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

#### 2.2.4.3 COMPOSICION QUÍMICA

La composición química del rocoto incluye: agua, hidratos de carbono, proteínas, fibra, cenizas, calcio, fósforo, hierro, caroteno, tiamina, ribofabina, niacina, ácido ascórbico, capsaicina.

Capsaicina, el alcaloide mayoritario presente en las variedades picantes del género *Capsicum*. Estas aminas simples presentan nitrógeno extra cíclico siendo producidas por el metabolismo de los aminoácidos. Este es un alcaloide oxigenado, al presentarse de manera pura se caracteriza por ser un sólido cristalizable, incoloro y blanco.<sup>20</sup>

#### 2.2.4.4 CARACTERISTICAS AGROCLIMATICAS DEL ROCOTO

**A) ALTURA:** Los cultivos de rocoto se ubican entre los 300 y 1900 m.s.n.m. en la ceja selva, la siembra se realiza de preferencia en la parte media y alta de los cerros, para obtener mejores productos la altura optimas de crecimiento y desarrollo del cultivo van entre los 900 y 1200 msnm.<sup>20</sup>

**B) PRECIPITACIÓN:** La precipitación requerida para poder desarrollarse sin ningún tipo de enfermedades y evitando las plagas va entre los 0 y 1200 mm. Un veranillo prolongado puede ser crítica para el cultivo e impedir su evolución en determinada fase de crecimiento.<sup>20</sup>

**C) TEMPERATURA:** Para su maduración y evolución requerirá de 20° para así poder crecer en óptimas condiciones, podemos resaltar que el cultivo requiere de temperaturas mayores de 20°C para poder



desarrollarse en óptimas condiciones, teniendo como límite máximo los 40°C a 7°C como las temperaturas más bajas de la floración se retarda.<sup>20</sup>

**D) VIENTOS:** No se recomiendan producirlos en ligares con vientos fríos y secos los cuales pueden producir una excesiva evapotranspiración y dan lugar a algunos daños por frío, dependiendo en la etapa en que se encuentre el cultivo, lo más recomendable es su desarrollo en lugares con vientos cálidos para que el cultivo se desarrolle con normalidad.

**E) NUBOSIDAD:** El rendimiento del cultivo se hará notar más o serán mayores cuando haya una mayor cantidad de iluminación solar.<sup>20</sup>

**F) FECHA DE SIEMBRA:** Las mejores épocas de siembra son en los meses de agosto y setiembre porque el periodo de lluvias se encuentra próximo. Sin embargo, se puede sembrar en cualquier época del año.<sup>22</sup>

**G) ZONAS DE PRODUCCION:** Las zonas de cultivo y producción son las zonas de “ceja de selva”, donde termina la sierra y empieza la selva, en la parte oriental de los andes peruanos. En el Cusco los centros de abasto en su mayoría se abastecen de Rocoto de los sembríos de Marcapata por su extensa producción, variedad y calidad del fruto. Otros departamentos que también son productores es Pasco, Huánuco y Junín.

**H) ÉPOCAS DE PRODUCCIÓN:** Debido a que el rocoto es de un clima cálido-lluvioso, en el Perú se produce rocoto todo el año.<sup>21</sup>

#### 2.2.4.5 PROPIEDADES BENEFICIOSAS

Los estudios demostraron las diversas propiedades beneficiosas del rocoto, por ejemplo, se caracteriza por ser un excelente protector estomacal, el cual será perfecto para el tratamiento de úlceras, colitis y gastritis siendo muy beneficioso para el sistema digestivo. Es así que la capsaicina también se caracteriza por estimular la segregación de jugos gástricos propiciando así la acumulación de lípidos y bicarbonatos esta



capacidad lograra que el estómago se fortalezca facilitando el proceso digestivo.<sup>23</sup>

#### **A) COMPUESTOS DE *Capsicum* CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

Los Capsaicinoides da la cualidad a algunas variedades de ajíes son ser picantes o pungentes. Pertenecen al grupo de alcaloides derivados de la vainillilamina, sintetizados y almacenados en el tejido de la placenta del fruto, lugar donde se insertan las semillas. Debido a esta ubicación, se cree que los capsaicinoides juegan un rol importante en la protección química de las semillas, de los capsaicinoides más del 70% es capsaicina [N-(4-hidroxi-3-metilmetoxibenzil-8-metilnon-6-tran-enamide)] seguida de la dihidrocapsaicina [N-(4- hidroxi-3-metil-metoxibenzil)-8-metilnonenamida] y otros derivados, como nordihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina. Estas moléculas se presentan en estado puro como cristales blancos inodoros y de pungencia severa. La diferencia entre ellas es netamente estructural pues no se han podido aislar en forma estable.<sup>24</sup>

La capsaicina y dihidrocapsaicina son los compuestos más fuertes y producen ardor por toda la boca. Nordihidrocapsaicina es el compuesto menos irritante y poco dulce; homodihidrocapsaicina es un compuesto muy irritante y produce cierto ardor, el más prolongado en su duración. La homocapsaicina produce poco ardor en la garganta, con una sensación lenta de pungencia a través de ella. Evidentemente todos los capsicinoides actúan juntos para producir la pungencia de los chiles, pero la capsaicina es el más fuerte de todos los compuestos.<sup>25</sup>





**CUADRO N° 3: CAPSICINOIDES COMÚNMENTE PRESENTES EN EL  
GENERO *Capsicum***

NOMBRE	NOMBRE CIENTÍFICO	UNIDADES SCOVILLE	%
Capsaicina	trans-8-metil-n-vanilil6-nonamida	16,000,000	69%
Dihidrocapsaicina (DHC)	8-metil-n-vanililnonamida	16,000,000	22%
Nordihidrocapsaicina (NDHC)	7-metil-n-vanililoctamida	9,100,000	7%
Homodihidrocapsaicina (HDHC)	9-metil-n-vanilildecamida	8,600,000	1%
Homocapsaicina (HC)	trans-9-metil-n-vanilil7-decenamida	8,600,000	1%

**FUENTE:** Ubillús Manuel, Capsicinoides comúnmente presentes en *Capsicum*, 2014.

Según el índice de UNIDADES SCOVILLE basado en el examen organoléptico (examen diluido en agua azucarada hasta que el picante ya no pueda ser detectado) nos indica el grado de pungencia o picor de *Capsicum pubescens* que es de 30 000 - 60 000 la cual lo posiciona en una escala de picor alta. Podemos decir que mientras más dulce sea un chile menos Capsaicina tendrá dentro de su composición y a más picor presentara más niveles de Capsicinoides y por ende Capsaicina.<sup>47</sup>

**B) PROPIEDADES ANTINFLAMATORIAS Y ANTIBIÓTICAS**

Esta característica es un tanto especial ya que aquí sucederá lo siguiente, cuando consumimos rocoto este provoca una sensación de picor sobre la lengua este se asemeja mucho al ejemplo en el cual nosotros al hacer deporte, en esta actividad nuestro organismo como respuesta a esta actividad produce endorfinas inhibiendo ciertas



partes del cerebro las cuales provocan una sensación de placer que genera cierta adicción difícil de describir.

Es útil para combatir la neuropatía diabética, administrado como capsaicina tópica alivia el dolor asociado a la soriasis y artrosis. También cumple un papel muy importante como dilatador de los vasos sanguíneos en casos de hipertensión. <sup>23</sup>

Es conocido que el rocoto también posee una cantidad importante de vitamina C superando hasta 4 veces a la naranja, es así que se recomienda su consumo esencial en nuestra dieta al igual que otros productos por sus propiedades antioxidantes y prevención del cáncer. No solo se remonta a una característica también presenta propiedades antihemorroidal, antirreumático, digestivo, diaforético y tonificante general. <sup>23</sup>

### **C) USO ODONTOLÓGICO**

Antiguamente se cree que se utilizaban las pepas del rocoto para combatir dolores dentales y como antiinflamatorio.

### **D) USO ALIMENTICIO**

El rocoto es el fruto que más consumen los cusqueños, no solo para acompañar las comidas con su sabor picoso, más aún se ha vuelto una tradición es consumirlo. Se pueden degustar un sinnúmero de platos a base de rocoto en nuestras mesas, pero el predominante es el que le damos como ají. Se degusta el rocoto mayormente en su presentación fresca. Por eso que impulsamos su consumo por sus tantas propiedades medicinales que posee.



### 2.2.5 CAPSAICINA

Todas las especies del género *Capsicum* producen una sustancia química llamada Capsaicina este compuesto se encarga de proporcionarle el sabor picante al rocoto. Este es un compuesto el cual se encuentra de manera natural en este tipo de frutos, pero en distintas proporciones según el tipo, pero en general los frutos de *Capsicum* tienen un contenido de capsaicina entre 0,1 hasta 1% en peso. <sup>26</sup>

Este compuesto químico capsaicina o capsáicina (8-metil-N-vanillil-6-nonenamida) es un componente activo irritante para mamíferos se produce como un metabolito secundario en diversas plantas del género *Capsicum*, lo que probablemente les impide ser consumidas por animales herbívoros. La capsaicina en su estado puro es un compuesto lipídico, inodoro, incoloro, parecido a la cera. <sup>26</sup>

Solo con una pequeña cantidad de capsaicina es suficiente para producir la típica sensación de picor, este compuesto no se encuentra de forma uniforme en el fruto, suele concentrarse en las semillas y en la cubierta que las rodea (pericarpio). Por tanto, estos serán los lugares de mayor concentración y ricas en capsaicina para realizar extracciones. <sup>26</sup>

- **Fórmula semi-desarrollada: C<sub>18</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O**
- **Número CAS: 404-86-41**

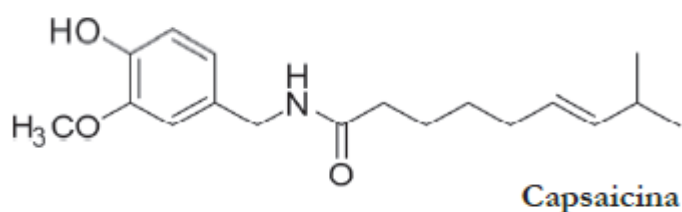


Figura N° 4:Revista de Química PUCP, Capsaicina, 2013, 27(1-2).



Alcaloide de formula  $C_{18}H_{27}N_3O$  que es sólido a temperatura ambiente (punto de fusión  $64^{\circ}C$ ). Conforman el 90% de todos los compuestos responsables del picor del ají y pimientos.

### 2.2.5.2 PROPIEDADES FISICAS

- a) Estado de agregación: Líquido
- b) Masa molar: 305.41 g/mol g/mol
- c) Punto de fusión: 336 K ( $63^{\circ}C$ )
- d) Punto de ebullición: 483 K ( $210^{\circ}C$ )

### 2.2.5.3 RUTA METABOLICA

La capsaicina es el producto final de una ruta metabólica bien caracterizada. En 1980 se demostró que los aminoácidos son los precursores de los *capsaicinoides*; según Estrada y colaboradores en el año 2000, la síntesis de los ácidos grasos fue verificada en 1968, marcando con isótopos radiactivos los precursores de la capsaicina. Todavía no han sido identificadas la totalidad de las enzimas que participan en esta síntesis, pero sí la enzima *capsaicina sintasa*, que realiza la unión de las dos ramas metabólicas. El primer trabajo sobre la estructura de la capsaicina fue el de Nelson en 1920, el cual planteó que su estructura estaba compuesta por una unidad básica, la *vainillilamina*, y un componente ácido que él denominó “ácido isodecenoico”.<sup>27</sup>

Posteriormente, se determinó que este componente en realidad es el ácido 8-metil-6-nonenoico. La formación de cada uno de los capsaicinoides está determinada por el aminoácido que da origen al ácido graso de cadena corta que se unirá con la vainillilamina.<sup>27</sup>

Si el primer aminoácido de la ruta de los ácidos grasos es la L-valina, se formará capsaicina y dihidrocapsaicina; y si es L-leucina, los



capsaicinoides serán nordihidrocapsaicina, homodihidrocapsaicina y homo -capsaicina. (29)

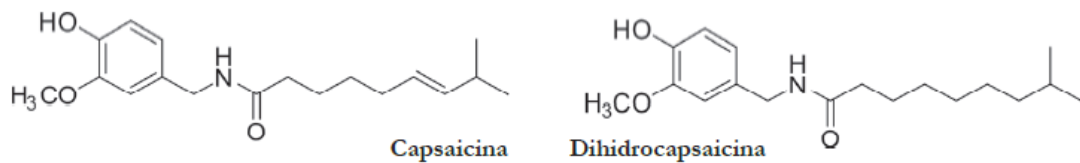


Figura N° 5:Revista de Química PUCP, Ruta Metabólica de la Capsaicina, 2013, 27(1-2).

Conjuntamente con la hidrocapsaicina (capsaicina que ha perdido el doble en lace por hidrogeno)

#### 2.2.5.4 EXTRACCION DE LA CAPSAICINA POR EL METODO DE SOXHLET

Este método se basa generalmente es la extracción de compuestos de naturaleza lipídica, contenidos en un sólido a través de un disolvente.

En este procedimiento la muestra sólida finamente pulverizada se coloca en un cartucho de material poroso que se sitúa en la cámara del extractor soxhlet. Se calienta el disolvente extractante, situado en el matraz, se condensan sus vapores que caen, gota a gota, sobre el cartucho que contiene la muestra, extrayendo los analitos solubles. Cuando el nivel del disolvente condensado en la cámara alcanza la parte superior del sifón lateral, el disolvente, con los analitos disueltos, asciende por el sifón y retorna al matraz de ebullición. Este proceso se repite hasta que se completa la extracción de los analitos de la muestra y se concentran en el disolvente. <sup>28</sup>

El método que nos permite seguir este aparato tiene la ventaja de que siempre se está extrayendo con el disolvente puro en su punto de ebullición por lo que el rendimiento es óptimo.

Lo que hace el extractor Soxhlet es realizar un sin fin de extracciones de manera automática, con el mismo solvente que se evapora y condensa llegando siempre de manera pura al material. <sup>28</sup>



### 2.2.5.5 IMPORTANCIA FARMACOLOGICA

El uso de la Capsaicina tiene muchos efectos beneficiosos para la salud como, por ejemplo:

#### **A) ANALGESICO**

Puede parecer algo contradictorio que se aplique un producto causante de picor a una superficie inflamada es más sobre la piel o mucosas produce un dolor de ardor e hiperalgesia, pero la aplicación repetida de lugar hace que el tejido pierda la sensibilidad a la capsaicina, es así que dosis más elevadas causan un bloqueo de fibras C que conducen a un déficit sensorial de larga duración. No por nada ya ha sido utilizada terapéuticamente en el dolor neuropático como una opción cuando los fármacos son ineficientes.<sup>29</sup>

Por lo que es eficiente cuando se logra administrar en ocasiones repetidas en diferentes tipos de dolor como: el dolor del muñón, la distrofia simpática refleja, el dolor neuropático oral, la fibromialgia, y la neuropatía diabética.<sup>29</sup>

#### **B) REDUCTOR DE PESO CORPORAL**

La investigación dirigida por el doctor Jong Won Yun el 2010 en la universidad de Daegu en Corea del Sur, sugiere que la capsaicina puede causar la pérdida de peso e impedir la acumulación de grasa mediante la estimulación de ciertas proteínas degradantes de grasa logrando establecer la regulación de otras proteínas que trabajan en la síntesis de grasa.<sup>29</sup>

#### **C) ANTICANCERIGENO**

Científicos británicos en la revista “Biochemical and Biophysical Research Communications” demostraron que la capsaicina era capaz de eliminar las células malignas atacando las fuentes de energía que las alimenta.<sup>29</sup>

Se demostró que los vaniloides, moléculas que conforman la capsaicina se unen a las proteínas de las mitocondrias de la célula cancerígena y



genera la apoptosis, o muerte celular, sin dañar a las células sanas circundantes.

Pero lo que caracteriza su efectividad es la gran selectividad que la Capsaicina posee ya que bioquímica de las mitocondrias de las células cancerígenas es muy diferente a las células normales es ahí que logra reconocerlas y darles un trato diferente.<sup>29</sup>

#### **D) ANTI-MICROBIANO**

Esta es la característica que nos interesa más en este trabajo de investigación, ya que la capsaicina presenta propiedades antimicrobianas y anti-fúngicas, que logran retardar el desarrollo de peroxidases y ácidos grasos los mismos que son esenciales para el desarrollo bacteriano.<sup>29</sup>

Cichewicz y colaboradores comprobaron que los extractos obtenidos a partir de pimientos picantes inhibían el desarrollo de determinados patógenos como *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tetani* y *Streptococcus pyogenes*. Molina-Torres y colaboradores encontraron que la capsaicina inhibía además el crecimiento y desarrollo de *Escherichia coli*, *Pseudomonas solanacearum* además de *Bacillus subtilis*. También se ha demostrado que extractos de capsaicinoides presentan propiedades antibacterianas frente a *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa*, y frente a *Helicobacter pylori* entre otras.<sup>29</sup>

#### **E) ANTI-INFLAMATORIO**

La capsaicina es capaz de controlar la inflamación neurogénica y disminuye los neuropeptidos de la sinapsis neural. Retardando el desarrollo de peroxidases y ácidos grasos que son esenciales para el desarrollo bacteriano. Pero también favorecerá la eliminación de la sustancia P la cual es responsable de los mecanismos nerviosos que participan en la transmisión de dolor. Por esta propiedad también se



podría usar en áreas de odontología como antiinflamatorio y analgésico.

29

**CUADRO N° 4: USOS FARMACEUTICOS DE LA CAPSAICINA**

<b>EFEECTO</b>	<b>PADECIMIENTO</b>	<b>MECANISMO IMPLICADO</b>
<b>Analgesico</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Artrosis</li><li>• Dolor muscular</li><li>• Fibromialgia</li><li>• Lumbalgia</li><li>• Neuralgias posoperatorias</li><li>• Neuralgia diabética y periférica</li><li>• Osteoartrosis</li><li>• Regeneración de fibras nerviosas periféricas</li></ul>	La capsaicina favorece la eliminación de sustancia P, responsable de los mecanismos nerviosos que participan en la transmisión de dolor desde la periferia hasta el sistema nerviosos central.
<b>Antiagregante Plaquetario Antiinflamatorio</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Enfermedad intestinal inflamatoria</li><li>• Neuritis</li><li>• Pulitis</li></ul>	Controla de inflamación neurogenica y disminuye los neuropeptidos de la sinapsis neural Retarda el desarrollo de peroxidadas y ácidos grasos que son esenciales para el desarrollo bacteriano.
<b>Aparato Respiratorio</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Expectorante</li><li>• Prevención de la neumonía</li><li>• Rinitis alérgica</li></ul>	Bloque la acción de neuropeptidos, contra el reflejo axonal y puede tener efecto curativo sobre la Rinitis alérgica.





<b>Cicatrizante</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Heridas quirúrgicas</li><li>• Pulpotomía</li></ul>	Regeneración pulpar in vitro. Induce de proliferación celular de fibroblastos.
<b>Uso Odontológico</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Boca Ardorosa</li><li>• Dolor dental</li><li>• Dolor masticatorio</li><li>• Neuralgia del trigémino</li><li>• Procesos neoplásicos en aparato estomatológicos.</li></ul>	La capsaicina favorece la eliminación de la sustancia P. responsable de los mecanismos nerviosos que participan en la transmisión de dolor.
<b>Sistema Urinario</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Vejiga Hiperactiva</li></ul>	
<b>Antimicrobiano</b>		Retarda el desarrollo de peroxidasas y ácidos grasos que son esenciales para el desarrollo bacteriano.

**FUENTE:** Waizel Bucay, Camacho Morfin, Algunas actividades farmacológicas de la capsaicina, 2011.



## 2.3 MARCO CONCEPTUAL

**MIC:** (Minimum Inhibitory Concentration) Concentración mínima inhibitoria, en microbiología, es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación.<sup>30</sup>

**UFC:** Unidad formadora de colonias, cada colonia formada después de la inoculación.<sup>31</sup>

**ESPECTROFOTOMETRIA:** La espectrofotometría es un método científico utilizado para medir cuanta luz absorbe una sustancia química, midiendo la intensidad de la luz cuando un haz luminoso pasa a través de la solución muestra.<sup>32</sup>

**ESPECTROFOTOMETRO:** El espectrofotómetro es un instrumento usado en la física óptica que sirve para medir, en función de la longitud de onda, la relación entre valores de una misma magnitud fotométrica relativos a dos haces de radiaciones.<sup>33</sup>

**TRANSMITANCIA:** La transmitancia es la fracción de la luz incidente con una longitud de onda específica, que atraviesa una muestra de materia. Es un fenómeno relacionado directamente con la absorbancia. Consiste en el paso inalterado de radiación por la materia, ocasionada por la saturación de esta energía.<sup>34</sup>

**ABSORVANCIA:** La absorbancia es definida como la intensidad de la luz con una longitud de onda específica, es una medida de la radiación que absorbe una sustancia cuando sobre ésta incide las ondas electromagnéticas generalmente en la región visible de una determinada longitud de onda. La absorbancia varía con la composición y la concentración de los elementos en una muestra.<sup>35</sup>



**LONGITUD DE ONDA:** Las ondas luminosas tienen crestas (puntos altos) y valles (puntos bajos). La distancia entre dos picos (o dos depresiones) se denomina longitud de onda.<sup>32</sup>

**CURVA DE CRECIMIENTO:** La curva de crecimiento se dará por la reproducción y bacteriano es la división de una bacteria en células hijas en un proceso llamado fisión binaria. Fases: Fase logarítmica, Fase exponencial, Fase estacionaria, Fase de muerte.<sup>36</sup>

**CURVA DE CALIBRACION:** Esta curva de calibración es una gráfica que relaciona la concentración de al menos cinco soluciones de estándar de concentraciones conocidas, con la absorbancia de cada uno de ellos a la longitud de onda máxima ( $\lambda$  max).<sup>32</sup>

**DENSIDAD OPTICA:** La densidad óptica es la absorción de un elemento óptico por unidad de distancia, para una longitud de onda determinada. Mientras más alta es la densidad óptica, más corta es la transmitancia.<sup>37</sup>

**CALDO BHI: (Brain Heart Infusion)** Infusión Cerebro Corazón, es un medio líquido, de enriquecimiento para favorecer el crecimiento indicado de una gran variedad de microorganismos.<sup>38</sup>

**ATCC: (American Type Culture Collection)** Colección estadounidense de cultura tipográfica, es el control de calidad interno de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.<sup>39</sup>

**AGAR MUELLER HILTON:** Este agar contiene niveles bajos de timina y timidina además de niveles controlados de calcio y magnesio, se suplementa sangre al 5% para el crecimiento de microorganismos aislados nutricionalmente exigentes.<sup>39</sup>



## 2.4 HIPOTESIS DE ESTUDIO

### HIPOTESIS NULA

**H0:** El extracto de capsaicina NO presenta mayor eficacia antibacteriana en comparación al Rocoto (*Capsicum pubescens*) sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 causantes de enfermedad periodontal.

**H1:** El extracto de capsaicina presenta mayor eficacia antibacteriana en comparación al Rocoto (*Capsicum pubescens*) sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 causantes de enfermedad periodontal.

### 2.4.1 HIPOTESIS ESPECÍFICAS:

**H0:** La curva de crecimiento bacteriana de las cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 NO se dará a las 5,10,15,20,25,30 horas.

**H2:** La curva de crecimiento bacteriana y de las cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 se dará a las 5,10,15,20,25,30 horas.

**H0:** El extracto de capsaicina NO presenta mayor eficacia antibacteriana en comparación al Rocoto (*Capsicum pubescens*) y controles (positivos y negativos) al 25% sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 causantes de enfermedad periodontal a las 5,10,15,20,25,30 horas.

**H3:** El extracto de capsaicina presenta mayor eficacia antibacteriana en comparación al Rocoto (*Capsicum pubescens*) y controles (positivos y negativos) al 25% sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 causantes de enfermedad periodontal a las 5,10,15,20,25,30 horas.

**H0:** El extracto de capsaicina NO presenta mayor eficacia antibacteriana en comparación al Rocoto (*Capsicum pubescens*) y



controles (positivos y negativos) al 50% sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 causantes de enfermedad periodontal a las 5,10,15,20,25,30 horas.

**H4:** El extracto de capsaicina presenta mayor eficacia antibacteriana en comparación al Rocoto (*Capsicum pubescens*) y controles (positivos y negativos) al 50% sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 causantes de enfermedad periodontal a las 5,10,15,20,25,30 horas.

**H0:** El extracto de capsaicina NO presenta mayor eficacia antibacteriana en comparación al Rocoto (*Capsicum pubescens*) y controles (positivos y negativos) al 75% sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 causantes de enfermedad periodontal a las 5,10,15,20,25,30 horas.

**H5:** El extracto de capsaicina presenta mayor eficacia antibacteriana en comparación al Rocoto (*Capsicum pubescens*) y controles (positivos y negativos) al 75% sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 causantes de enfermedad periodontal a las 5,10,15,20,25,30 horas.



## 2.5 VARIABLES E INDICADORES

### 2.5.1 OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

#### VARIABLES INDEPENDIENTES

- A) Rocoto (*Capsicum pubescens*) presentación fresca
- B) Extracto de Capsaicina

#### VARIABLES DEPENDIENTES

- A) Eficacia antibacteriana sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

#### CO – VARIABLE

- A) Tiempo (t).



2.5.2 CUADRO N° 5: CUADRO DE OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

VARIABLES	DEFINICION CONCEPTUAL	CARACTERISTICAS	INDICADOR	INTRUMENTO Y PROCEDIMIENTO DE MEDICION	EXPRESION FINAL DE LA VARIABLE	VALORIZACION DE LA VARIABLE	DEFINICION OPERACIONAL
INDEPENDIENTES	Fruto de color rojo, contiene una variedad de capsaicinoides que le confieren picor al fruto y sus diferentes propiedades medicinales.	<b>NARURALEZA:</b> Cualitativa  <b>TIPO:</b> Categórica  <b>ESCALAD DE MEDICION:</b> Nominal  <b>FORMA DE MEDICION:</b> Directa	Rocoto presentación fresca en porcentajes  %	<b>INSTRUMENTO:</b> Se hizo uso de la micropipeta calibrada marca Eppendorf con unidad de medición en $\mu\text{L}$ . <b>PROCEDIMIENTO:</b> Se medio exactamente los $\mu\text{L}$ de presentación fresca de rocoto licuados en una con el uso de una micropipeta calibrada marca Eppendorf. Para posteriormente colocarlo en cada cubeta respectivamente.	1. 750 $\mu\text{L}$ (25%) 2. 1500 $\mu\text{L}$ (50%) 3. 2250 $\mu\text{L}$ (75%)	1. 25% 2. 50% 3. 75%	La variable rocoto ( <i>Capsicum pubescens</i> ) se expresa en porciones v/v en $\mu\text{L}$ los cuales son:  1. 25% 2. 50% 3. 75%  Dichos se obtuvieron mediante diluciones a partir del 100% considerando el consumido por la población regularmente.
Rocoto ( <i>Capsicum pubescens</i> )							



VARIABLES	DEFINICION CONCEPTUAL	CARACTERISTICAS	INDICADOR	INTRUMENTO Y PROCEDIMIENTO DE MEDICION	EXPRESION FINAL DE LA VARIABLE	VALORIZACION DE LA VARIABLE	DEFINICION OPERACIONAL
INDEPENDIENTES							
Extracto de Capsaicina	La capsaicina es un extracto alcohólico alcaloide en su presentación para un compuesto lipofílico, inodoro, incoloro, que confiere el sabor picante al rocoto. El cual presenta diversas propiedades farmacológicas.	<p><b>NARURALEZA:</b> Cualitativa</p> <p><b>TIPO:</b> Categórica</p> <p><b>ESCALAD DE MEDICION:</b> Nominal</p> <p><b>FORMA DE MEDICION:</b> Directa</p>	<p>Diferentes concentraciones de extracto de capsaicina.</p> <p style="text-align: center;">%</p>	<p><b>INSTRUMENTO:</b> Se hizo uso de la micropipeta calibrada marca Eppendorf con unidad de medición en <math>\mu\text{L}</math>.</p> <p><b>PROCEDIMIENO:</b> Se realizo el procedimiento de extracción alcohólica utilizando el método de Soxhlet usando como diluyente etanol de <math>96^\circ</math>.</p>	<p>1. <math>750 \mu\text{L}</math> (25%)</p> <p>2. <math>1500 \mu\text{L}</math>(50%)</p> <p>3. <math>2250 \mu\text{L}</math>(75%)</p>	<p>1. 25%</p> <p>2. 50%</p> <p>3. 75%</p>	<p>La variable extracto de capsaicina se expresa en diferentes concentraciones de se expresa en porciones v/v en <math>\mu\text{L}</math> los cuales son:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 25%</li> <li>2. 50%</li> <li>3. 75%</li> </ol> <p>Las cuales se obtuvieron mediante método de Soxhlet usando como diluyente etanol de <math>96^\circ</math>, obteniendo así las diferentes concentraciones de capsaicina.</p>





VARIABLES	DEFINICION CONCEPTUAL	CARACTERISTICAS	INDICADOR	DIMESIONES	INTRUMENTO Y PROCEDIMIENTO DE MEDICION	EXPRESION FINAL DE LA VARIABLE	VALORIZACION DE LA VARIABLE	DEFINICION OPERACIONAL
DEPENDIENTES	Es la capacidad inherente de una sustancia de origen químico o natural de inhibir o destruir el crecimiento bacteriano	<b>NATURALEZA:</b> Cuantitativa  <b>TIPO:</b> Numérica  <b>ESCALAD DE MEDICION:</b> Ordinal Intervalo  <b>FORMA DE MEDICION:</b> Directa	Medición del nivel de absorbancia en el espectrofotómetro.  1. No productoras ( $DO \leq DOc$ ) 2. Productor débil ( $DOc < DO \leq 2 \times DOc$ ) 3. Productor moderado ( $(2 \times DOc) < DO \leq (4 \times DOc)$ ) 4. Productor fuerte ( $(4 \times DOc) < DO$ )	<ul style="list-style-type: none"> <li>Efecto antibacteriano del Rocoto (<i>Capsicum pubescens</i>) sobre cepas de Porphyromonas gingivalis.</li> <li>Efecto antibacteriano del extracto de capsaicina sobre cepas de Porphyromonas gingivalis.</li> </ul>	<b>INTRUMENTO:</b> Espectrofotómetro marca Thermo SCIENTIFIC.  <b>PROCEDIMIENTO:</b> Se leyó el nivel de absorbancia traducida como nivel bactericida con el uso de un espectrofotómetro de marca Thermo SCIENTIFIC calibrado a 600 nm de longitud de onda, de cada una de las cubetas de cuarzo que contenían las diferentes cepas de bacterias con la solución fresca de rocoto y el extracto alcohólico de capsaicina.	Se expresa mediante el nivel de absorbancia y la densidad óptica del punto cortante (DOc), El cual se obtuvo el promedio de las densidades ópticas obtenidas en los controles negativos más 3 desviaciones estándar, se clasificaron en:  <b>1. EFICACIA (+)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>No productoras ( <math>DO \leq DOc</math> )</li> <li>Productor débil ( <math>DOc &lt; DO \leq 2 \times DOc</math> )</li> </ul>	<b>Abs</b> Absorbancia  <b>1. EFICACIA (+)</b>  <b>2. NO EFICACIA (-)</b>	La variable eficacia antibacteriana se expresa mediante el nivel de absorbancia y la curva de calibración de cada muestra leída en el espectrofotómetro calibrado a 600 nm el cual dará los valores de: <b>1. No productoras ( <math>DO \leq DOc</math> )</b> <b>2. Productor débil ( <math>DOc &lt; DO \leq 2 \times DOc</math> )</b> <b>3. Productor moderado ( <math>(2 \times DOc) &lt; DO \leq (4 \times DOc)</math> )</b> <b>4. Productor fuerte ( <math>(4 \times DOc) &lt; DO</math> )</b> Para lo cual (no productor de biopelículas y productores débiles) significara eficacia y los (productores moderados y productores fuertes) significara no eficacia/
Eficacia antibacteriana						<b>1. EFICACIA (+)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>No productoras ( <math>DO \leq DOc</math> )</li> <li>Productor débil ( <math>DOc &lt; DO \leq 2 \times DOc</math> )</li> </ul> <b>2. NO EFICACIA (-)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Productor moderado ( <math>(2 \times DOc) &lt; DO \leq (4 \times DOc)</math> )</li> <li>Productor fuerte ( <math>(4 \times DOc) &lt; DO</math> )</li> </ul>		



CO-VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	CARACTERISTICAS	DIMENSION	INTRUMENTO Y PROCEDIMIENTO DE MEDICION	EXPRESION FINAL DE LA VARIABLE	VALORIZACION DE LA VARIABLE	DEFINICION OPERACIONAL
TIEMPO	Se define como tiempo a una magnitud de carácter físico que se emplea para realizar la medición del crecimiento bacteriano, reproducción e inhibición bacteriana en los caldos nutritivos de cultivo BHI.	<b>NATURALEZA:</b> Cuantitativa <b>TIPO:</b> Categoría <b>ESCALAD DE MEDICION:</b> Longitudinal <b>FORMA DE MEDICION:</b> Directa	La lectura se realizó cada hora en el espectrofotómetro:  t Tiempo	<b>INTRUMENTO:</b> Reloj. <b>PROCEDIMIENTO:</b> Se tomo en valor de la absorbancia de cada muestra en el espectrofotómetro cada hora, empezando por la hora cero o $t_0$ . Para así poner realizar las curvas de letalidad o muerte.	Se expresa mediante las horas transcurridas en el reloj.	<ol style="list-style-type: none"><li>1. 05 horas</li><li>2. 10 horas</li><li>3. 15 horas</li><li>4. 20 horas</li><li>5. 25 horas</li><li>6. 30 horas</li></ol>	La co-variable tiempo se expresó mediante las horas transcurridas en el reloj. La lectura se realizó cada hora en el espectrofotómetro comenzando desde las cero horas ( $t_0$ ) tomando en cuenta las 30 ( $t_{30}$ ) horas donde empieza la fase estacionaria hasta llegar a la fase muerte.



## CAPITULO III

### 3. DISEÑO METODOLOGICO

#### 3.1 NIVEL DE INVESTIGACION

Según la asignación de los agentes evaluados el estudio tiene un diseño metodológico de tipo:

**EXPERIMENTAL:** Se manipulo de manera intencional las variables independientes para así observar los efectos que tendrán sobre la variable dependiente, además existen grupos control asegurando la validez del estudio.<sup>41</sup>

##### 3.1.1 TIPO DE INVESTIGACION

Según la dirección en el tiempo el presente estudio es de tipo:

**PROSPECTIVO:** Porque los datos se analizaron transcurrido un determinado tiempo en el futuro.<sup>42, 43</sup>

Según período y secuencia en el tiempo el presente estudio es de tipo:

**LONGITUDINAL:** Porque se estudió todos los fenómenos en un lapso de tiempo el cual será cada hora hasta llegar a 30 horas en total, para obtener la información que permita someter los resultados a pruebas estadísticas.<sup>42, 43</sup>

Según propósito general el presente estudio es de tipo:

**COMPARATIVA:** Porque se comparó y contraste los resultados entre las dos unidades de estudio diferentes, cual tuvo más efecto en cuanto tiempo y si ambas son efectivas o no.<sup>42, 43</sup>



Según el análisis y alcance de los datos numéricos el presente estudio es de tipo:

**CUANTITATIVA:** Porque se utilizó la estadística como herramienta básica para el análisis de datos y resultados. <sup>42, 43</sup>

Según los fenómenos observados en el laboratorio presente estudio es de tipo:

**INVITRO:** Porque la técnica a utilizar fue en un ambiente controlado, fuera de un organismo vivo como son las placas de caldos de cultivo. <sup>42, 43</sup>

## 3.2 POBLACION Y MUESTRA

### 3.2.1 POBLACION VEGETAL

Se recolectaron las especies vegetal Rocoto (*Capsicum pubescens*) de la Comunidad Campesina de Cocha Distrito de Marcapata, Provincia Quispicanchi, Región del Cusco, ubicada a 3.150 msnm, con una ubicación geográfica de: Latitud: 13°30'54" Sur Longitud: 70°56'45" oeste y una Superficie de: 1687.91 km<sup>2</sup>.

### 3.2.2 SELECCIÓN DE LA MUESTRA VEGETAL

Las muestras se seleccionaron de acuerdo de los criterios de inclusión y exclusión. Los cuáles fueron 4kg de Rocoto Rocoto (*Capsicum pubescens*) picados en forma longitudinal posteriormente licuados siendo usada solo la pulpa del fruto para su posterior pesaje

### 3.2.3 POBLACION EXTRACTO DE CAPSAICINA

El extracto de capsaicina se obtuvo mediante el método de Soxhlet, el cual se colocó en envases de caramelos, al pesaje se obtuvo un peso final de 10 g los envases fueron refrigerados y colocados a baja temperatura.



### 3.2.4 SELECCIÓN DE LA MUESTRA EXTRACTO DE CAPSAICINA

Las muestras se inocularon en cubetas de cuarzo de acuerdo a las medidas de la concentración mínima inhibitoria MIC, se pesó el extracto de capsaicina de acuerdo a los volúmenes en µl en la balanza analítica, se realizó las pruebas de control respetivas.

### 3.2.5 POBLACION BACTERIANA DE *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277

La bacteriana de *Porphyromonas gingivalis* se obtuvo de la casa comercial Microbiologics, los cuales se reactivaron para su posterior crecimiento en 15 tubos de caldo de cultivo líquido BHI y en 4 placas de Agar nutritivo Mueller Hinton.

### 3.2.6 SELECCIÓN DE LA MUESTRA BACTERIANA

Las muestras se inocularon en cubetas de cuarzo de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión, se utilizó cepas que no presenten ningún tipo de contaminación por el medio externo o que hayan estado expuestas a un ambiente aerobio el cual puede inhibir su crecimiento.

### 3.2.1 DISTRIBUCION DE LA MUESTRA

La muestra se dividió en los siguientes grupos:

**3.2.7.1 GRUPO 1:** 4 Cubetas con cepas de *Porphyromonas gingivalis* sin ninguno de los antibacterianos a usar.

**3.2.7.2 GRUPO 2:** 7 Cubetas con cepas de *Porphyromonas gingivalis* donde se colocó 25% de Rocoto (*Capsicum pubescens*) en su presentación fresca. Que corresponde 4 cubetas por concentración, 2 con control (positivo) y 1 con control (negativo).



- 3.2.7.3 GRUPO 3:** 7 Cubetas con cepas de *Porphyromonas gingivalis* donde se colocó 50% de Rocoto (*Capsicum pubescens*) en su presentación fresca. Que corresponde 4 cubetas por concentración, 2 con control (positivo) y 1 con control (negativo).
- 3.2.7.4 GRUPO 4:** 7 Cubetas con cepas de *Porphyromonas gingivalis* donde se colocó 75% de Rocoto (*Capsicum pubescens*) en su presentación fresca. Que corresponde 4 cubetas por concentración, 2 con control (positivo) y 1 con control (negativo).
- 3.2.7.5 GRUPO 5:** 7 Cubetas con cepas de *Porphyromonas gingivalis* donde se colocó el extracto de Capsaicina a una concentración de 25%. Que corresponde 4 cubetas por concentración, 2 con control (positivo) y 1 con control (negativo).
- 3.2.7.6 GRUPO 6:** 7 Cubetas con cepas de *Porphyromonas gingivalis* donde se colocó el extracto de Capsaicina a una concentración de 50%. Que corresponde 4 cubetas por concentración, 2 con control (positivo) y 1 con control (negativo).
- 3.2.7.7 GRUPO 7:** 7 Cubetas con cepas de *Porphyromonas gingivalis* donde se colocó el extracto de Capsaicina a una concentración de 75%. Que corresponde 4 cubetas por concentración, 2 con control (positivo) y 1 con control (negativo).



### 3.3 TIPO DE MUESTREO

Tipo de muestreo no probabilístico por conveniencia

### 3.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN

#### 3.4.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

**3.4.1.1** Se trabajó con cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, que se encuentran en buenas condiciones de temperatura, humedad y libre de contaminantes certificados de autenticidad por el laboratorio.

**3.4.1.2** Se tomó frutos maduros de *Capsicum pubescens* con las características ya mencionadas, siendo la especie vegetal identificada.

#### 3.4.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

**3.4.2.1** No se trabajó con cepas que hayan sido manipuladas anteriormente.

**3.4.2.2** No se tomó en cuenta frutos los cuales presenten pérdida de color, picaduras de insectos o parásitos, con mal olor o que el tejido este degradado por diversos factores mecánicos o biológicos.

### 3.5 TECNICA DE RECOLECCION DE DATOS

Se realizó la observación y descripción a través de los datos obtenidos en el estudio *invitro*, donde se obtuvo una comparación entre las medidas de absorbancia, densidad ópticas y longitudes de onda confirmado por las distintas muestras a las diferentes concentraciones del Rocoto (*Capsicum pubescens*) y el extracto de Capsaicina sobre el crecimiento de las cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.



### 3.6 PROCEDIMIENTOS

#### 3.6.1 PROCEDIMIENTOS PARA LA OBTENCION DE LA MUESTRA VEGETAL

##### 3.6.1.1 PRUEBA PARA DETERMINAR LAS CONCENTRACIONES DE VOLUMEN Y PESO DE LA PRESENTACION FRESCA DE ROCOTO (*Capsicum pubescens*)

Para determinar las distintas concentraciones de la presentación fresca del Rocoto (*Capsicum pubescens*) se tomó en cuenta las medidas y equivalentes a lo consumido por la población, es este caso fue medio rocoto mezclado con agua destilada.

- Se escogieron de forma arbitraria 5 Rocotos (*Capsicum pubescens*), de entre 15 unidades para calcular sus pesos aproximados y sacar el peso promedio de los frutos a usar.
- Los 5 Rocotos se cortaron a la mitad de forma longitudinal y se pesaron en gramos por separado.
- Cuando se tengan los pesos de todos los frutos se sacó la media tanto del Rocoto con la siguiente ecuación:

Siendo:

$(X_1, X_2, X_3, \dots, X_N)$  = Numero de muestras Rocotos a estudiar en  
gramos

Entonces la Media Aritmética será:

$$\text{MEDIA (X)} = \bar{x} = \frac{g_1+g_2+g_3+g_4+g_5}{\text{numero de rocotos (5)}}$$





- En este caso las medidas obtenidas del limón en mL representaran a la medida del disolvente que utilizaremos en este caso el agua destilada sobre el rocoto.
- Se realizó los cálculos aritméticos obteniendo el promedio de los dos compuestos de entre los cinco a usar.
- Cuando se obtuvo los promedios en gramos y mililitros, se mezcló la solución en una licuadora pequeña, para finalizar con el filtrado de la solución con papel filtro.
- Nuestra solución final en mL será considerada como (solución madre al 100%) la cual utilizaremos como base para obtener el resto de las concentraciones al 25%, 50% y 70%.
- Se obtuvo un promedio de 21.2 g de Rocoto (*Capsicum pubescens*) y 12.78 mL de agua destilada.

### **3.6.1.2 OBTENCIÓN DE LA PRESENTACIÓN FRESCA DE ROCOTO *Capsicum pubescens***

Después de determinar los valores de las concentraciones de volumen y peso tanto del Rocoto (*Capsicum pubescens*) como el limón, se procedió a su licuado y filtrado. Se pesó 21.2 g de Rocoto (*Capsicum pubescens*) lavándolo cuidadosamente con hipoclorito al 5% y enjuague con agua destilada. Se midió 12.78 ml de Agua Destilada cantidades equivalentes al consumo regular, se licuo hasta crear una mezcla de los dos componentes. Para filtrar la muestra se usó papel de filtrado lento en un embudo el cual desembocaba en un Matraz Kitasato este se conectó a una Bomba al Vacío, este equipo ayuda a acelerar y optimizar el proceso.



### 3.6.1.3 OBTECION DEL EXTRACTO ETANOLICO DE CAPSAICINA

#### METODO DE DILUCION DEL ETANOL

Para obtener las diferentes concentraciones de Capsaicina nos basaremos en la concentración mínima inhibitoria MIC del estudio de Y. Zhou. China<sup>6</sup> el cual refiere que es de (64mg/L), el cual se traduce a 64 mg de Capsaicina diluidos en 1 litro de solvente en nuestro caso es etanol de 96°, para lo cual realizaremos las diferentes ecuaciones ajustadas a nuestro trabajo.

- 25% =  $\frac{64 \text{ mg} \times 1000000 \mu\text{L}}{X \text{ mg} \times 750 \mu\text{L}}$

$$X = \frac{750 \times 64}{1000000}$$

$$X = 0,048 \text{ mg}$$

- 50% =  $\frac{64 \text{ mg} \times 1000000 \mu\text{L}}{X \text{ mg} \times 1500 \mu\text{L}}$

$$X = \frac{1500 \times 64}{1000000}$$

$$X = 0,096 \text{ mg}$$

- 75% =  $\frac{64 \text{ mg} \times 1000000 \mu\text{L}}{X \text{ mg} \times 2250 \mu\text{L}}$

$$X = \frac{2250 \times 64}{1000000}$$

$$X = 0,144 \text{ mg}$$

Los resultados que obtuvimos nos servirán para mezclar el extracto de Capsaicina (sólida) con los microlitros de etanol al 96% requeridos, ya que el etanol lo utilizamos como solvente en nuestro medio líquido así obtendremos las diferentes concentraciones de Capsaicina al 25%, 50% y 75%.

### 3.6.1.4 METODO DE SOXHLET PARA OBTENER EL EXTRACTO DE CAPSAICINA

Se realizó la eliminación del pedúnculo del rocoto el cual solo utilizamos la pulpa y pepas, para tomar el peso real de la cantidad



a procesar (4kg), con la ayuda de un cuchillo cortar en pedazos que faciliten la eliminación de humedad y secado del mismo. Los trozos cortados se colocaron en charolas metálicas para su posterior secado en una estufa a una temperatura de 100 °C durante 24h.

Se pesó 2 kg de rocoto seco de los cuales se colocó 10 g de Rocoto (*Capsicum pubescens*) en el balón o recipiente seco del extractor Soxhlet del mismo modo se procedió a agregar los 10 mL correspondientes de solvente a usar en este caso el etanol de 96°.

Se inició la extracción, manteniendo el proceso durante 12h en el cartucho por agotamiento, al finalizar el proceso, se recuperó el solvente en la rota vapor. Colocar el extracto de Capsaicina líquido en la estufa por 24 horas a 70°C para la evaporación del etanol y otros compuestos orgánicos del rocoto, la capsaicina concentrada final obtenida es sólida. Se mantiene el producto final en refrigeración a 4°C para su posterior uso.

### **3.7.1 CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO**

#### **3.7.1.1 MEDIOS DE CULTIVO**

Se utilizó medios de cultivo caldo BHI (Brain Heart Infusion) y Agar Müeller-Hinton enriquecido en sangre.

#### **3.7.1.2 PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO CALDO BHI**

Para preparación se disolvió 37 g de medio en 1000 mL de agua destilada, dejar reposar por 5 minutos hasta obtener una mezcla homogénea, calentar la mezcla con agitación frecuente y esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos. El color final del medio es ámbar. No sobrecalentar, para evitar el oscurecimiento por caramelización del medio.



Se mantuvo de 2 – 8 °C evitando su congelamiento y sobrecalentamiento.

### **3.7.1.3 PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO AGAR MÜELLER-HINTON ENRIQUECIDO EN SANGRE**

Para la preparación se disolvió 38 mg de suspensión en polvo del Agar Müller-Hinton en 1000 mL de agua destilada. Calentar en baño de agua hirviendo o en corriente de vapor hasta obtener una solución homogénea, calentar la mezcla con agitación frecuente y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos, y dejar enfriar a 50 - 45° C.

Añadir mezclando y sin formación de burbujas 5% de sangre de conejo desfibrinada estéril, mezclar hasta homogenizar totalmente, distribuir en placas Petri estériles con una medida no mayor a 4 mm o 25 ml de agar en cada placa aproximadamente y dejar solidificar. Por último, mantener a refrigeración en 4 °C evitando su congelamiento y sobrecalentamiento para la reactivación y para el posterior crecimiento de la cepa.

### **3.7.1.4 CONTROL DE CALIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO**

Se incubo los medios de cultivo nutritivos ante cualquier “deterioro del producto”, examinando visualmente para asegurarse de que los defectos físicos existentes no interfieran con el uso. Se incubo los medios de cultivo sin inocular a 37°C por 24 horas, examinado después del tiempo mencionado en busca de contaminación microbiana.



#### 3.7.1.4 REACTIVACIÓN DE LA CEPA BACTERIANA

Para la reactivación de nuestra cepa seguiremos las instrucciones de laboratorio Microbiologics, en el cual nos indica:

- a) El empaque con la muestra permanecerá en el contenedor a bajas temperaturas hasta su uso y reactivación, todos los procedimientos se realizaron en la cámara de flujo laminar, cerca del mechero encendido.
- b) Antes de usar el empaque lo dejamos a temperatura ambiente sin abrirlo. Rasgamos la ranura y tomaremos la unidad de KWIK-STIK™.
- c) Se procedió a retirar la etiqueta, sin desmontar el dispositivo durante la hidratación.
- d) Pellizcar solo una vez la ampolla en la parte superior, el líquido hidratante se liberó en la tapa del mismo.
- e) Se sujeto verticalmente golpeando suavemente la superficie dura para facilitar el flujo del líquido a través del eje y hacia la parte inferior de la unidad que contiene el pellet. El líquido hidratante deberá fluir a través del eje del bastoncillo y dentro de la parte inferior de la unidad que contiene el pellet.
- f) Se pellizco la parte inferior de la unidad, aplastando el pellet en el líquido hasta que la suspensión del pellet sea homogénea.
- g) Inmediatamente después se empapo el bastoncillo o hisopo en el material hidratado y transferirlo al medio de cultivo agar sangre (se formó estrías longitudinales para facilitar el aislamiento de las colonias) y caldo BHI para viabilizar la cepa bacteriana.
- h) Luego se colocó en la incubadora y la cámara de anaerobiosis a 37°C por 10 días.



### **3.7.1.5 INOCULACION Y SIEMBRA DE *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™ EN CALDO BHI**

En cada recipiente se colocó con la ayuda de una asa de siembra 1 colonia de cepas *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 requeridos en cada caldo nutritivo BHI de los inóculos con 5 ml anteriormente realizado, en los cuales se inoculara no más de 10 colonias bacterianas para cada recipiente a estudiar.

### **3.7.1.6 CULTIVO**

El cultivo se mantuvo a un ambiente anaerobio a 37°C por 30 horas.

### **3.7.1.7 CREACION DEL AMBIENTE ANAEROBIO**

Para la reactivación de la cepa se procedió a agregar uniformemente 35 mL de agua destilada sobre una tira de Anaerocult®A según indicaciones del fabricante, inmediatamente después se colocó dentro de una jarra de anaerobiosis, se cierra herméticamente y después de 30 minutos se consigue un ambiente anaerobio dentro de la jarra.

La *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 fue estudiado en cubetas de cuarzo para su lectura en el espectrofotómetro, es así que era conveniente crearles un ambiente de anaerobiosis dentro de las mismas cubetas cerradas para el crecimiento ininterrumpido de la misma.

### **3.7.1.8 SISTEMA DE INYECCION DE ANAEROBIOSIS (S.I.A)**

El ambiente anaerobio dentro de la cubeta se creó inyectando directamente CO<sub>2</sub> precedente del Anaerocult®A, se colocaron seis pastillas procedentes de las tiras de CO<sub>2</sub> en una bolsa hermética (Ziploc) para evitar cualquier fuga. Se creó un dispositivo de inyección de CO<sub>2</sub> para las cubetas,



usándose un equipo de venoclisis y llaves de vía endovenosas en “Y” para poder cerrar y abrir los conductos a donde se conectó a una jeringa 60 mL para inyectar CO<sub>2</sub> a cada cubeta. Todo el equipo se adaptó a una aguja larga de (21G X 32mm) por donde ingresaba el CO<sub>2</sub> y otra aguja Tuberculina de (25G X 16mm) para el desfogue de la presión estas fueron inyectadas en tapas de plástico que cubrían las cubetas, se cerró y aseguro salida de fugas con plastilina estéril y parafilm.

### **3.7.2 DETERMINACIÓN ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO DE CAPSAICINA Y ROCOTO (*Capsicum pubescens*) EN SU PRESENTACION FRESCA**

Se realizó el test de CINETICA O CURVAS DE LETALIDAD BACTERIANA.

Se realizó mediante la determinación de las curvas de mortalidad-tiempo, para determinar los efectos del extracto de Capsaicina y Rocoto (*Capsicum pubescens*) en su presentación fresca sobre las bacterias.

Este es un método que se realiza en caldo BHI donde la tasa de muerte de un inóculo fijo es determinado por la muestra control (microorganismo sin agente antibacteriano) y los microorganismos en cubetas de cuarzo.

#### **A) INÓCULO**

Ya reactivadas las cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 se tomaron los inóculos con ayuda de micropipetas.

#### **B) RECUENTO DE UFC/mL DEL INÓCULO INICIAL**

Se efectuaron los recuentos microbiológicos de cada una de ellas y se obtuvo el promedio para determinar el número de log 10 UFC/mL iniciales.



Se comprobó el crecimiento bacteriano comparándolo evaluando la presencia de turbidez en el tubo, la cual indicara el crecimiento bacteriano.

### C) PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DEL ANTIBACTERIANO A SUS DIFERENTES CONCENTRACIONES

En ambos casos se obtuvo las diferentes concentraciones de acuerdo a los volúmenes tanto de los antibacterianos (Capsaicina y Rocoto (*Capsicum pubescens*)) en medio de cultivo y las cepa *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 teniendo como referencia el volumen total del antibacteriano representado en un 100%.

Para lo cual tendremos las siguientes ecuaciones según volúmenes:

Volumen total de 3000 $\mu$ L de cada muestra = 100%
--

- $25\% = \frac{100\% \text{ } \underline{\hspace{1cm}} \text{ } 3000 \mu\text{L}}{25\% \text{ } \underline{\hspace{1cm}} \text{ } X \mu\text{L}}$

$$X = \frac{25 \times 3000}{100}$$

$$X = 750 \mu\text{L BHI}; 2151 \mu\text{L}$$

- $50\% = \frac{100\% \text{ } \underline{\hspace{1cm}} \text{ } 3000 \mu\text{L}}{50\% \text{ } \underline{\hspace{1cm}} \text{ } X \mu\text{L}}$

$$X = \frac{50 \times 3000}{100}$$

$$X = 1500 \mu\text{L BHI}; 1401 \mu\text{L}$$

- $75\% = \frac{100\% \text{ } \underline{\hspace{1cm}} \text{ } 3000 \mu\text{L}}{75\% \text{ } \underline{\hspace{1cm}} \text{ } X \mu\text{L}}$

$$X = \frac{75 \times 3000}{100}$$

$$X = 2250 \mu\text{L BHI}; 651 \mu\text{L}$$

Estos son los valores en microlitros ( $\mu$ L) que se tomaron en cuenta con relación del antibacteriano y nuestros medios de





cultivo BHI obtendremos nuestras concentraciones finales de 25%, 50% y 75%. Los volúmenes del caldo nutritivo se hicieron por diferencia de volumen entre los antibacterianos y la cepa de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 de 99  $\mu$ L en todas las muestras.

#### **D) CURVAS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA MEDIANTE LA COMBINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS MEDIANTE CINÉTICA DE MUERTE O DE LETALIDAD**

Se prepararon las diferentes muestras:

- 1) Curva de vida (CV): O curva de crecimiento para lo cual se agregó de caldo 2901  $\mu$ L de BHI y 99  $\mu$ L de inóculo de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 realizando el estudio en diferentes recipientes.
- 2) Curva de muerte (CM): A los demás recipientes se agregó diferentes volúmenes en microlitros de caldo BHI y antibacteriano de acuerdo a las concentraciones deseadas mezclándolas con 99  $\mu$ L de inóculo de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 . Las cantidades de todas las muestras deberán tener la misma cantidad de 3000  $\mu$ L en total para que la comparación sea de forma igual y homogénea.
  - **GRUPO 1:** Se estudiaron 4 muestras diferentes en dos cubetas de cuarzo y plástico con un total de 3000  $\mu$ L de caldo BHI y 99  $\mu$ L *Porphyromonas gingivalis* y otras dos muestras en matraz con 29 ml de caldo BHI donde se agregó solo 1,0 ml de *Porphyromonas gingivalis* sin ningún antibacteriano (CV).
  - **GRUPO 2:** Se estudiaron 4 muestras diferentes con 2151  $\mu$ L de caldo BHI donde se agregaron 99  $\mu$ L cepas de



*Porphyromonas gingivalis* se colocó 750  $\mu$ L de Rocoto (*Capsicum pubescens*) en su presentación fresca representando el 25%. A las otras 3 muestras se inoculo 750  $\mu$ L de (clorhexidina) y 500 g de (azitromicina) diluidos en 750  $\mu$ L de agua destilada para el control positivo y 750  $\mu$ L de agua destilada para el control negativo. Todas las cubetas de cuarzo tuvieron un volumen total de 3000  $\mu$ L.

- **GRUPO 3:** Se estudiaron 4 muestras diferentes con 1401  $\mu$ L de caldo BHI conde se agregaron 99  $\mu$ L cepas de *Porphyromonas gingivalis* se colocó 1500  $\mu$ L de Rocoto (*Capsicum pubescens*) en su presentación fresca representando el 50%. A las otras 3 muestras se inoculo 1500  $\mu$ L de (clorhexidina) y 500 g de (azitromicina) diluidos en 1500  $\mu$ L de agua destilada para el control positivo y 1500  $\mu$ L de agua destilada para el control negativo. Todas las cubetas de cuarzo tuvieron un volumen total de 3000  $\mu$ L.
- **GRUPO 4:** Se estudiaron 4 muestras diferentes con 651  $\mu$ L de caldo BHI conde se agregaron 99  $\mu$ L cepas de *Porphyromonas gingivalis* se colocó 2250  $\mu$ L de Rocoto (*Capsicum pubescens*) en su presentación fresca representando el 75%. A las otras 3 muestras se inoculo 2250  $\mu$ L de (clorhexidina) y 500 g de (azitromicina) diluidos en 2250  $\mu$ L de agua destilada para el control positivo y 2250  $\mu$ L de agua destilada para el control negativo. Todas las cubetas de cuarzo tuvieron un volumen total de 3000  $\mu$ L.
- **GRUPO 5:** Se estudiaron 4 muestras diferentes con 2151  $\mu$ L de caldo BHI conde se agregaron 99  $\mu$ L cepas de *Porphyromonas gingivalis* se colocó 750  $\mu$ L de Extracto de Capsaicina representando el 25%. A las otras 3 muestras se



inoculo 750  $\mu\text{L}$  de (clorhexidina) y 500 g de (azitromicina) diluidos en 750  $\mu\text{L}$  de agua destilada para el control positivo y 750  $\mu\text{L}$  de etanol de 96° con agua destilada para el control negativo. Todas las cubetas de cuarzo tuvieron un volumen total de 3000  $\mu\text{L}$ .

- **GRUPO 6:** Se estudiaron 4 muestras diferentes con 1401  $\mu\text{L}$  de caldo BHI conde se agregaron 99  $\mu\text{L}$  cepas de *Porphyromonas gingivalis* se colocó 1500  $\mu\text{L}$  de Extracto de Capsaicina representando el 50%. A las otras 3 muestras se inoculo 1500  $\mu\text{L}$  de (clorhexidina) y 500 g de (azitromicina) diluidos en 1500  $\mu\text{L}$  de agua destilada para el control positivo y 1500  $\mu\text{L}$  de etanol de 96° con agua destilada para el control negativo. Todas las cubetas de cuarzo tuvieron un volumen total de 3000  $\mu\text{L}$ .
- **GRUPO 7:** Se estudiaron 4 muestras diferentes con 651  $\mu\text{L}$  de caldo BHI conde se agregaron 99  $\mu\text{L}$  cepas de *Porphyromonas gingivalis* se colocó 2250  $\mu\text{L}$  de Extracto de Capsaicina representando el 75%. A las otras 3 muestras se inoculo 2250  $\mu\text{L}$  de (clorhexidina) y 500 g de (azitromicina) diluidos en 2250  $\mu\text{L}$  de agua destilada para el control positivo y 2250  $\mu\text{L}$  de etanol de 96° con agua destilada para el control negativo. Todas las cubetas de cuarzo tuvieron un volumen total de 3000  $\mu\text{L}$ .



**CUADRO N° 6: VOLUMENES TOTALES DE CADA MUESTRA**

N° GRUPO	Rocoto (Capsicum pubescens) presentación fresca	Caldo de cultivo nutritivo BHI	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Volumen Final	Concentración
2	750 µL	2151 µL	99 µL	3000 µL	25%
3	1500 µL	1401 µL	99 µL	3000 µL	50%
4	2250 µL	651 µL	99 µL	3000 µL	75%
N° GRUPO	Extracto Alcohólico de Capsaicina	Caldo de cultivo nutritivo BHI	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Volumen Final	Concentración
5	750 µL	2151 µL	99 µL	3000 µL	25%
6	1500 µL	1401 µL	99 µL	3000 µL	50%
7	2250 µL	651 µL	99 µL	3000 µL	75%

Se realizaron recuentos cada hora para cada una de las muestras hasta las 30h aproximadamente. A cada hora se obtuvo recuentos de inóculo tanto del tubo de curva de vida como de los de cinética de muerte.

### 3.7.4 DETERMINACION DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Para la determinación de actividad antibacteriana se utilizó los métodos indirectos de la escala de espectrofotometría.

Se estableció la curva de calibración para determinar formación o no de suspensiones bacterianas mediante la lectura de la absorbancia (Densidad Óptica) a 600 nm de longitud de onda en cada muestra.

#### 1) Preparación del blanco

El blanco para este estudio, consistió en el sistema celda del espectrofotómetro con un volumen de 3.5 mL en el cual evaluaremos y haremos lectura de la absorbancia del medio del cultivo BHI y nuestras dos presentaciones antibacterianas Capsaicina y Rocoto *Capsicum pubescens* (BHI + Capsaicina +



Rocoto). Calibrado a los 600 nm correspondiente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. (Anexo 9)

## 2) Para la lectura

Las cubetas de 3,5 mL de cada muestra en el sistema celda del espectrofotómetro para su lectura cada hora empezando del tiempo ( $t_0$ ). Calibrado a los 600 nm correspondiente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

- Primero se determinó la absorbancia de cada muestra por medio de los valores que nos dará el espectrofotómetro.
- Anotamos en nuestra ficha de recolección de datos cada valor de absorbancia de cada tubo que contengan las concentraciones de antimicrobiano.
- Para realizar la curva de calibración, colocamos en un cuadro de comparación tanto los datos de absorbancia como el tiempo.
- En un plano colocamos en el eje "Y" (ordenadas) los niveles de absorbancia obtenidos representando a los UFC y en el eje "X" (abscisas) correspondiente al tiempo.
- Luego se trazaron puntos con respecto a los dos datos (X, Y)
- Se dibujó la curva de calibración uniendo estos puntos.
- Así se realizó con cada cubeta de cuarzo que contenía las diferentes concentraciones de Capsaicina y las presentaciones frescas de rocoto.
- Se determino y comparo la efectividad antibacteriana tanto de los extractos de Capsaicina y las presentaciones frescas de rocoto, se compararon las diferentes curvas de calibración (CV, CM, los Controles (positivo, negativo)) dadas por el nivel de absorbancia en el espectrofotómetro de cada compuesto.

Los resultados se basaron en la Densidad Óptica (DO) producidas por películas bacterianas las cuales nos basamos por el estudio que realizo Stepanovic en el 2004 <sup>41</sup>, en el cual las cepas se clasificaron en las siguientes categorías: 1) No



productores de biopelículas, 2) productores débiles, 3) productores moderados, 4) productores fuertes, el punto cortante (cutt-off) DOc, está conformado por el promedio de las densidades ópticas obtenidas en los controles negativos más 3 desviaciones estándar.

Las cepas se clasificaron de la siguiente manera:

$$DOc = \bar{x}_{OD} + 3S [C (-)]$$

DOc: Densidad óptica del punto cortante

$\bar{x}_{OD}$ : Medias de las densidades ópticas

S: Desviaciones estándar

C (-): Control negativo

- $DO \leq DOc$ : No productor de biopelículas (cultivo bacteriano)
- $DOc < DO \leq 2 \times DOc$ : Productores débiles de biopelículas (cultivo bacteriano)
- $(2 \times DOc) < DO \leq (4 \times DOc)$ : Productores moderados de biopelículas (cultivo bacteriano)
- $(4 \times DOc) < DO$ : Productores fuertes de biopelículas (cultivo bacteriano)

Todas las pruebas se llevaron a cabo por cuadruplicado y los resultados se promediaron.

Los resultados fueron tomados en cuenta de acuerdo de las biopelículas formadas y las curvas de crecimiento de muestra, para lo cual en los resultados de (no productor de biopelículas y productores débiles de biopelículas) significara eficacia y los (productores moderados de biopelículas y productores fuertes de biopelículas) significara no eficacia.

### 3.8 RECOLECCION DE DATOS

Para este trabajo se utilizó como instrumento las fichas de recolección de datos (Anexo 2, 3 y 4) los cuales fueron llenados en el periodo de tiempo



establecido, los datos serán registrados sobre cada medida y nivel de absorbancia en el Espectrofotómetro de marca Thermo SCIENTIFIC de cada una de las muestras. Los datos se leyeron cada hora empezando por la hora cero ( $t_0$ ) hasta las 30 horas ( $t_{30}$ ) equivalente a la etapa estacionaria de las cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

### 3.9 PROCEDIMIENTO PARA LA RECOLECCION DE DATOS

#### 3.9.1 TRÁMITES ADMINISTRATIVOS

- a) Se realizaron las diferentes solicitudes al Decano de la Facultad de Ciencias de la Salud para el uso del Laboratorio de Investigación de los laboratorios de Ciencias Básicas, tanto de los equipos y materiales necesarios para la experimentación.
- b) Se realizó el pedido de la cepa de bacteria *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 por medio de la Universidad y el Blgo. Lugó Miranda Barriga.

#### 3.9.2. ACCIONES

- a) Se adquirió la cepa de bacterias *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 del laboratorio y la posterior reactivación e inoculación de las mismas.
- b) Se hizo la adquisición de un ciento de Rocoto (*Capsicum pubescens*) del distrito de Marcapata – Comunidad Campesina de Cocha.
- c) La extracción de capsaicina se realizó en el laboratorio de Biofotoquímica de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, para el cual se usó 2 kg de rocoto.
- d) Se realizó la lectura de curva de crecimiento de la *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.
- e) Se realizó prueba piloto.



- f) Se inoculó las nuestras antibacterianas por el método de curvas de letalidad bacteriana, y se leyó cada muestra en el espectrofotómetro.
- g) Se realizaron las curvas de crecimiento de cada muestra para obtener los resultados finales y realizar las comparaciones, todos los datos se almacenarán en Microsoft Word para su presentación virtual.
- h) Se procedió a analizar los datos.

### **3.10 TECNICA DE PROCESAMIENTO DE DATOS**

#### **3.10.1 NIVEL DE SISTEMATIZACION**

Se realizó una matriz de los datos obtenidos utilizando el programa Microsoft Excel.

#### **3.10.2 OPERACIONES DEL PROCEDIMIENTO**

- a) Clasificación: Se ordenó los datos que se obtuvieron gracias a los instrumentos en una matriz.
- b) Codificación: La codificación se llevó de acuerdo a los indicadores.
- c) Recuento: Se aplicaron matrices de recuento.
- d) Tabulación: Se realizaron tablas simples y de doble entrada.
- e) Gráficos: Gráficos de barras y lineales.

#### **3.10.3 PROCESAMIENTO DE DATOS**

Para el procesamiento y análisis de las curvas de crecimiento se utilizó en programa EXCEL el cual valoro los datos mediante gráficos de líneas y la calidad de cultivo bacteriano según el estudio de Densidad Óptica se realizó en gráficos de puntos.

Para el procesamiento y análisis estadístico de la eficiencia bacteriana se utilizó el programa SPSS versión 24, las pruebas se trabajaron a un nivel de significancia del 5% ( $p < 0.05$ ).





La estadística analítica se realizó mediante el estudio ANOVA (análisis de varianza) en el cual se midió la probabilidad de diferencia o igualdad entre grupos del experimento, también se usó la prueba de comparaciones múltiples de Post Hoc Tukey y la clasificación de Stepanovic de acuerdo a la formación de biopelículas.

### **3.11 RECURSOS**

#### **3.11.1 RECURSOS MATERIALES**

##### **a) Equipos de laboratorio**

Espectrofotómetro marca Thermo SCIENTIFIC

Jarra de anaerobiosis

Incubadora BINDE

Rotapapor

Microscopio

Balanza Analítica

Baño Maria

Camara de Flujo Laminar

Esterilizadora al seco

Autoclave

Refrigeradora

Mechero Bunsen

Estufa

##### **b) Materiales de laboratorio**



Cubetas de Cuarzo marca Thermo SCIENTIFIC

10 tubos de ensayos

50 placas Petri

1 gradilla

2 micropipetas calibrada marca Eppendorf

Puntas de plastico

10 matraces

5 vaso de Precipitados

5 probetas

1 embudo

1 matraz Kitasato

Varillas de Vidrio

Probetas

Papel Aluminio

Papel Kraf

Papel de filtrado lento y rápido

Parafilm

Asas de Siembra

Agujas de Siembra

**c) Materiales para el cultivo de la muestra**

Caldo nutritivo BHI

Agar Sangre



Agar Mueller Hinton

Agar Ogy

Agar Manitol Salado

Agar Mc Conkey

Cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™

**d) Materiales para el efecto Antibacteriano**

Extracto de Capsaicina al 50%, 75% y 90%

Presentación fresca de rocoto 100 uni.

**e) Otros Materiales**

1 laptop Hp

1 licuadora

1 caja de guantes

1 caja de mascarillas

1 caja de Gorras

1 mandil de alfodon

2 mandil estéril

1 caja de gorras



### 3.11.2 RECURSOS ECONÓMICOS

CUADRO N° 7: RECURSOS ECONOMICOS

RECURSOS	CANTIDAD	COSTO UNIDAD (soles)	COSTO TOTAL (soles)
<b>RECURSOS HUMANOS</b>			
Estadista	1	S./ 600	S./ 600
Reconocimiento Botánico	-	S./ 20	S./ 20
<b>RECURSOS MATERIALES</b>			
Uso del Laboratorio	-	S./ 515	S./ 515
Cepa de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	2 unid	S./ 400	S./ 400
Presentación Fresca de rocoto	1 ciento	-	S./ 25
Solución de Etanol al 96°	1 unid.	S./ 16	S./ 16
Extracto de Capsaicina	20 ml	S./ 500	S./ 500
Agujas largar y cortas	2 cajas.	S./ 10	S./ 45
Guantes	1 caja	S./ 1.20	S./ 10
Mascarilla	1 caja	S./ 1.00	S./ 10
Gorro	1 caja	S./ 0.50	S./ 8
Mandil Estéril	1 unid.	S./ 5	S./ 5
Papel Bond	-	S./ 0.10	S./ 20
Equipo de Venoclisis	1 unid.	S./	S./ 5
Via endovenosas Y	1 unid	S./	S./ 5
Cubeta de cuarzo	1 unid	S./	S./ 400
Papel Aluminio	1 unid	S./	S./ 10
Papel Kraf	10 unid	S./ 0. 50	S./ 10
Guantes Estériles	1 caja	S./	S./ 30
<b>TOTAL</b>		S./ 3500	



### 3.11.3 RECURSOS HUMANOS

- a) Investigadora: Erika Alexandra Ríos Paucar
- b) Asesor: Mtro. Edgardo Guillermo Rivera Medina
- c) Co-asesor: Blgo. Lugó Miranda Barriga
- d) Estadista

### 3.11.4 RECURSOS FÍSICOS

- a) Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Andina Del Cusco
- b) Laboratorio de Investigación de los Laboratorios de Ciencias Básicas la Universidad San Antonio Abad del Cusco
- c) Biblioteca central de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Andina Del Cusco
- d) Repositorio virtual de la Universidad Andina Del Cusco
- e) Sitios web-internet

## 3.12 CAMPO DE INVESTIGACION

**AREA DE SALUD:** Ciencias de la Salud

**AREA ESPECÍFICA:** Estomatología

**ESPECIALIDAD:** Microbiología

**TEMA:** Microbiología de la Enfermedad Periodontal



## **CAPITULO IV**

### **RESULTADOS DE LA INVESTIGACION**



**CURVA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA BACTERIANA *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 HASTA LAS 30 HORAS.**

**CRECIMIENTO BACTERIANO EN FUNCION DE LA ABSORVANCIA V.S HORAS**

**DENSIDAD OPTICA (600nm)**

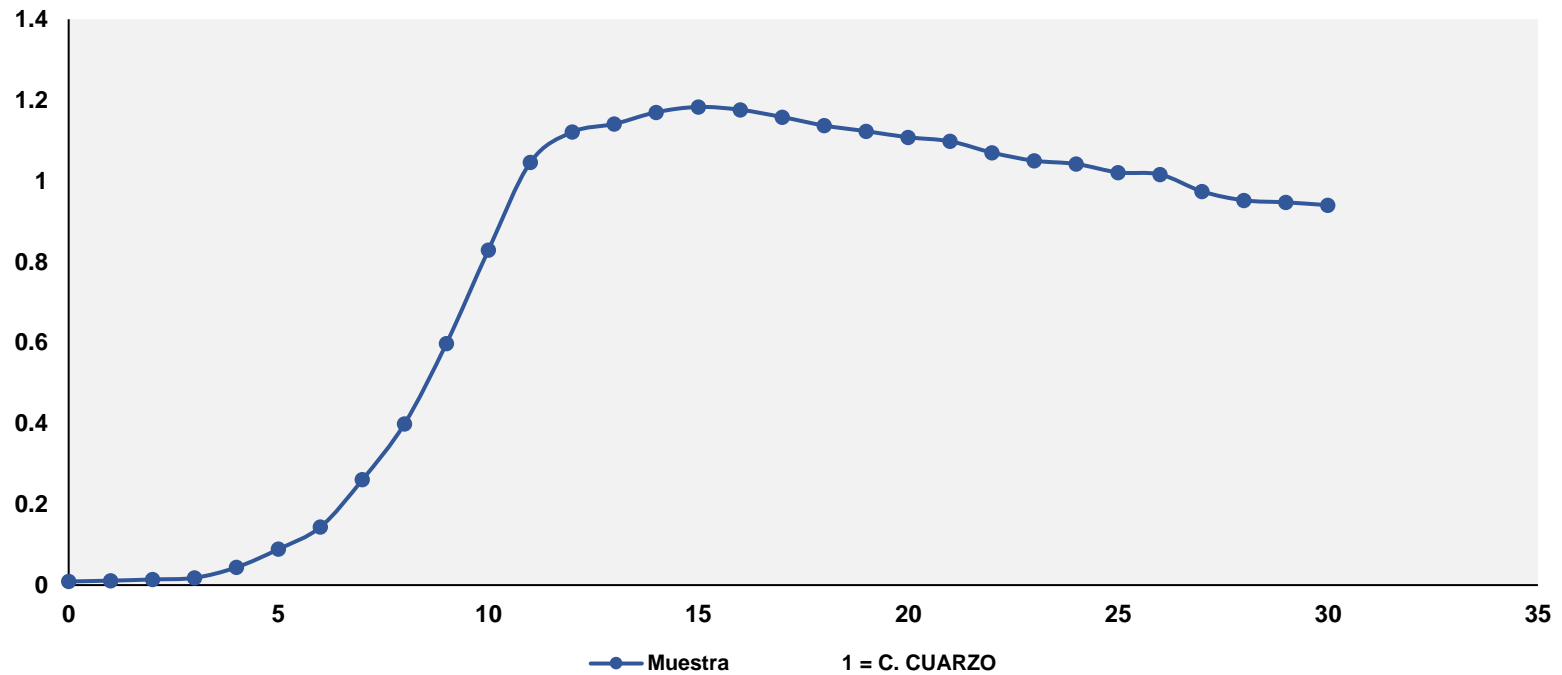


Figura N° 6: Curva de crecimiento de la cepa bacteriana *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 hasta las 30 horas

Fuente: PROPIA

**TIEMPO HORAS (h)**



### **Interpretación y análisis:**

La curva de crecimiento presentada en el gráfico anterior, se representa por (muestra 1 = cubeta de cuarzo) según el crecimiento bacteriano de la cepa *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, observamos que: La fase de latencia fue durante las primeras 5 horas de crecimiento, después se puede diferenciar la fase de crecimiento exponencial aproximadamente entre las 5 hasta las 15 horas de estudio con una densidad óptica de 1.183 con el punto más alto a las 15 horas, la fase estacionaria donde hay un crecimiento igual y constante se produce desde las 15 hasta 20 horas aproximadamente, se aprecia una diferencia importante en la fase de muerte observándose una disminución de la densidad óptica entre las 25 hasta las 30 horas que representa a la disminución del crecimiento bacteriano.





**CUADRO N° 8: EFICACIA ANTIBACTERIANA *IN VITRO* ENTRE ROCOTO (*Capsicum pubescens*) EN COMPARACIÓN CON EL EXTRACTO DE CAPSAICINA Y CONTROLES (POSITIVOS Y NEGATIVOS) AL 25% SOBRE CEPAS DE *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 A LAS 5, 10, 15, 20 , 25 Y 30 HORAS MEDIANTE LA PRUEBA ESTADÍSTICA ANOVA DE UN FACTOR.**

TIEMPO	CONCENTRACIÓN AL 25%										PRUEBA ESTADÍSTICA ANOVA DE UN FACTOR
	EXTRACTO CAPSAICINA		P. FRESCA		CONTROL (-)		CONTROL (+) CLOREXIDINA 0.12%		CONTROL (+) AZITROMICINA 500 mg		
	N	Media DENSIDAD OPTICA	N	Media DENSIDAD OPTICA	N	Media DENSIDAD OPTICA	N	Media DENSIDAD OPTICA	N	Media DENSIDAD OPTICA	
<b>5 HORAS</b>	4	0.038	4	0.000	2	0.108	2	0.006	2	0.005	p= 0.000
<b>10 HORAS</b>	4	0.002	4	0.552	2	0.968	2	0.000	2	0.000	p= 0.000
<b>15 HORAS</b>	4	0.000	4	0.820	2	1.029	2	0.000	2	0.000	p= 0.000
<b>20 HORAS</b>	4	0.000	4	0.818	2	0.962	2	0.000	2	0.000	p= 0.000
<b>25 HORAS</b>	4	0.000	4	0.775	2	0.853	2	0.000	2	0.000	p= 0.000
<b>30 HORAS</b>	4	0.000	4	0.562	2	0.756	2	0.000	2	0.000	p= 0.000

P<0.05, significativa  
p>0.05, no significativo

fuelle: Ficha de recolección de datos



### **Interpretación y análisis:**

El cuadro muestra la eficacia antibacteriana del Rocoto en su presentación fresca en comparación con el extracto de Capsaicina a una concentración del 25%, donde respecto al extracto la media de la densidad óptica (DO = 0.038 a las 5 horas) no fue eficaz contra las cepas (productor moderado de biopelícula (cultivo bacteriano)) a partir de las 10 horas hasta las 30 horas mostró eficacia contra las cepas (DO = 0.002 a 0.000 no productores de biopelícula), respecto a la presentación fresca a las 5 horas la densidad óptica fue de 0.000 (no productor de biopelícula) mostrando eficacia contra las cepas a partir de las 10 horas no se mostró eficacia aumentando su densidad óptica a 0.552 (productor fuerte) hasta las 30 horas.

Respecto al control negativo desde las 5 horas hasta las 30 horas no presentó eficacia contra las cepas (DO = 0.108 a 0.756), los controles positivos (clorhexidina 0.12% y azitromicina 500mg) mostraron eficacia contra las cepas desde 5 horas hasta las 30 horas (DO = 0.006 a 0.000 y 0.005 a 0.000 respectivamente).

Como se observa a una concentración del 25% el extracto de Capsaicina mostró eficacia desde las 10 horas, la presentación fresca sólo mostro eficacia a las 5 horas, el control negativo no mostró eficacia, los controles positivos mostraron eficacia desde las 5 horas hasta las 30 horas; al comparar las medias de las densidades ópticas entre los grupos según la prueba estadística ANOVA de un factor se encontró diferencias entre las medias desde las 5 horas hasta las 30 horas  $p=0.00$  ( $p<0.05$ ) quiere decir que las medias son diferentes entre los grupos.

Al comparar las efectividades entre el extracto de Capsaicina y la presentación fresca, la eficacia fue mejor del extracto de Capsaicina con respecto a la presentación fresca ya que esta sólo mostró efectividad a las 5 horas en relación al extracto donde la eficacia fue desde las 10 horas hasta las 30 horas siendo significativa esta diferencia de medias ( $p=0.000$ ).



**CUADRO N° 9: EFICACIA ANTIBACTERIANA *IN VITRO* ENTRE *ROCOTO* (*Capsicum pubescens*) EN COMPARACIÓN CON EL EXTRACTO DE CAPSACINA Y CONTROLES (POSITIVO Y NEGATIVO) AL 25% SOBRE CEPAS DE *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 A LAS 5, 10, 15, 20, 25 Y 30 HORAS MEDIANTE LA PRUEBA DE POST HOC DE TUKEY PARA LA DIFERENCIA ENTRE GRUPOS.**

CONCENTRACIÓN AL 25%					
HSD Tukey			Diferencia de medias (I-J)	Sig.	
5 HORAS	EXTRACTO DE CAPSACINA	FRESCA	.037750*	0.000	
		CONTROL (-)	-.069750*	0.000	
		CLOREXIDINA 0.12%	.031750*	0.000	
		AZITROMICINA 500MG	.032750*	0.000	
	FRESCA	CONTROL (-)	-.107500*	0.000	
		CLOREXIDINA 0.12%	-0.006000	0.422	
		AZITROMICINA 500MG	-0.005000	0.580	
		CLOREXIDINA 0.12%	.101500*	0.000	
	CONTROL (-)	AZITROMICINA 500MG	.102500*	0.000	
		CONTROL (+) CLOREXIDINA 0.12%	AZITROMICINA 500MG	0.001000	0.999
		EXTRACTO DE CAPSACINA	FRESCA	-.550000*	0.000
			CONTROL (-)	-.965500*	0.000
CLOREXIDINA 0.12%	0.002000		1.000		
AZITROMICINA 500MG	0.002000		1.000		
PRESENTACION FRESCA	CONTROL (-)	-.415500*	0.000		
	CLOREXIDINA 0.12%	.552000*	0.000		
	AZITROMICINA 500MG	.552000*	0.000		
	CLOREXIDINA 0.12%	.967500*	0.000		
CONTROL (-)	AZITROMICINA 500MG	.967500*	0.000		
	CONTROL (+) CLOREXIDINA 0.12%	AZITROMICINA 500MG	0.000000	1.000	
	EXTRACTO DE CAPSACINA	FRESCA	-.819500*	0.000	
		CONTROL (-)	-1.029000*	0.000	
CLOREXIDINA 0.12%		0.000000	1.000		
AZITROMICINA 500MG		0.000000	1.000		
FRESCA	CONTROL (-)	-.209500*	0.000		
	CLOREXIDINA 0.12%	.819500*	0.000		
	AZITROMICINA 500MG	.819500*	0.000		
	CLOREXIDINA 0.12%	1.029000*	0.000		
CONTROL (-)	AZITROMICINA 500MG	1.029000*	0.000		
	CONTROL (+) CLOREXIDINA 0.12%	AZITROMICINA 500MG	0.000000	1.000	
	EXTRACTO DE CAPSACINA	FRESCA	-.818250*	0.000	
		CONTROL (-)	-.962000*	0.000	
CLOREXIDINA 0.12%		0.000000	1.000		
AZITROMICINA 500MG		0.000000	1.000		
PRESENTACION FRESCA	CONTROL (-)	-.143750*	0.001		
	CLOREXIDINA 0.12%	.818250*	0.000		
	AZITROMICINA 500MG	.818250*	0.000		
	CLOREXIDINA 0.12%	.962000*	0.000		
CONTROL (-)	AZITROMICINA 500MG	.962000*	0.000		
	CONTROL (+) CLOREXIDINA 0.12%	AZITROMICINA 500MG	0.000000	1.000	
	EXTRACTO DE CAPSACINA	FRESCA	-.775000*	0.000	
		CONTROL (-)	-.853000*	0.000	
CLOREXIDINA 0.12%		0.000000	1.000		
AZITROMICINA 500MG		0.000000	1.000		
PRESENTACION FRESCA	CONTROL (-)	-0.078000	0.160		
	CLOREXIDINA 0.12%	.775000*	0.000		
	AZITROMICINA 500MG	.775000*	0.000		
	CLOREXIDINA 0.12%	.853000*	0.000		
CONTROL (-)	AZITROMICINA 500MG	.853000*	0.000		
	CONTROL (+) CLOREXIDINA 0.12%	AZITROMICINA 500MG	0.000000	1.000	
	EXTRACTO DE CAPSACINA	FRESCA	-.561500*	0.000	
		CONTROL (-)	-.755500*	0.000	
CLOREXIDINA 0.12%		0.000000	1.000		
AZITROMICINA 500MG		0.000000	1.000		
PRESENTACION FRESCA	CONTROL (-)	-.194000*	0.000		
	AZITROMICINA 500MG	.561500*	0.000		
	CLOREXIDINA 0.12%	.755500*	0.000		
	AZITROMICINA 500MG	.755500*	0.000		
CONTROL (-)	AZITROMICINA 500MG	.755500*	0.000		
	CONTROL (+) CLOREXIDINA 0.12%	AZITROMICINA 500MG	0.000000	1.000	

P<0.05, significativa  
p>0.05, no significativo

fuerate: Ficha de recolección de datos



**Interpretación y análisis:**

El cuadro muestra la prueba post hoc de Tukey para la comparación de medias de las densidades ópticas entre los grupos de acuerdo al tiempo donde, respecto a la presentación fresca se encontró eficacia parecida a las 5 horas con la clorhexidina ( $p=0.442$ ), y a las 25 horas con control negativo (0.160). Respecto al extracto de Capsaicina se encontró eficacia parecida desde las 10 horas hasta las 30 horas con la clorhexidina y azitromicina ( $p=1.00$  respectivamente).

Como se observa la eficacia del extracto fue parecida a los controles positivos donde su eficacia fue mejor respecto a la presentación fresca. Además, las medias de sus densidades ópticas fueron diferentes desde las 5 horas hasta las 30 horas ( $p=0.000$ ).