



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

ESCUELA DE POSGRADO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD



TESIS

**EFFECTO INHIBITORIO DE LA ARCILLA *CHACCO* EN EL CRECIMIENTO
DE *Porphyromonas gingivalis*, PUNO 2020**

PRESENTADA POR:

GAELOLD VLADIMIR HUACASI SUPO

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS DE LA SALUD

PUNO, PERÚ

2022



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

ESCUELA DE POSGRADO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD

TESIS

EFFECTO INHIBITORIO DE LA ARCILLA *CHACCO* EN EL CRECIMIENTO DE *Porphyromonas gingivalis*, PUNO 2020

PRESENTADA POR:

GAELOLD VLADIMIR HUACASI SUPO
PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS DE LA SALUD



APROBADA POR EL SIGUIENTE JURADO:

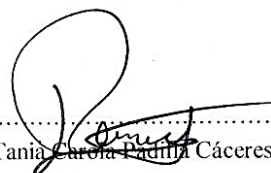
PRESIDENTE


.....
Dr. Jorge Luis Mercado Portal

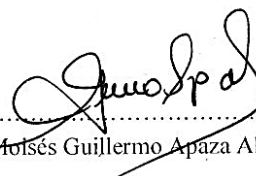
PRIMER MIEMBRO


.....
Dra Mirelia Janeth Talavera Apaza

SEGUNDO MIEMBRO


.....
Dra Tania Carolina Padilla Cáceres

ASESOR DE TESIS


.....
Dr. Molsés Guillermo Apaza Ahumada

Puno, 19 de septiembre de 2022

ÁREA: Ciencias Médicas, Ciencias de la Salud

TEMA: Ciencias de la Salud

LÍNEA: Otras Ciencias Médicas



DEDICATORIA

Para: Diana, mi esposa, compañera y amiga de toda la vida...

A Esmeralda, André y Ángel, las únicas razones de seguir adelante...

A la memoria de Pascual y Cristina, los mejores padres.



AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Moisés Apaza Ahumada, por su orientación y guía permanente.

A la Doctora Mirelia Talavera Apaza, Doctora Tania Padilla Cáceres y al Doctor Jorge Mercado Portal, miembros de jurado dictaminador, mis docentes, colegas y mejores personas, por sus correcciones y aportes en el desarrollo del presente estudio.

Al Licenciado Lorgio Palacios Frisancho, responsable del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNA-Puno por su esforzado trabajo y sus oportunas orientaciones.

Al Doctor Giancarlo Valdez y al Ingeniero Saúl Paredes, por su apoyo en el tratamiento estadístico.

Al Sr. Daniel Durand y Sra. Felicitas Zea, por sus orientaciones y consejos en el uso de la arcilla Chacco.

A la Doctora Fiorela Huanca, por sus consejos y apoyo en momentos difíciles.

A mis queridos y apreciados pacientes, ya que sin su invaluable apoyo y colaboración no hubiera sido posible.



ÍNDICE GENERAL

| | Pág. |
|--------------------|-------------|
| DEDICATORIA | i |
| AGRADECIMIENTOS | ii |
| ÍNDICE GENERAL | iii |
| ÍNDICE DE TABLAS | vi |
| ÍNDICES DE FIGURAS | viii |
| ÍNDICE DE ANEXOS | ix |
| RESUMEN | x |
| ABSTRACT | xi |
| INTRODUCCION | 1 |

CAPÍTULO I

REVISIÓN DE LA LITERATURA

| | |
|----------------------|----|
| 1.1. Marco teórico | 3 |
| 1.1.1. Arcillas | 3 |
| 1.1.2. Periodontitis | 23 |
| 1.2. Antecedentes | 29 |

CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

| | |
|----------------------------------|-----|
| 2.1. Identificación del problema | 35 |
| 2.2. Enunciados del problema | 37 |
| | iii |



| | | |
|--------|-----------------------|----|
| 2.3. | Justificación | 37 |
| 2.4. | Objetivos | 38 |
| 2.4.1. | Objetivo general | 38 |
| 2.4.2. | Objetivos específicos | 38 |
| 2.5. | Hipótesis | 39 |
| 2.5.1. | Hipótesis general | 39 |
| 2.5.2. | Hipótesis específicas | 40 |

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

| | | |
|------|--|----|
| 3.1. | Lugar de estudio | 42 |
| 3.2. | Grupos de estudio: | 42 |
| 3.3. | Método de investigación | 46 |
| 3.4. | Descripción detallada de métodos por objetivos específicos | 46 |

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

| | | |
|--------|---|----|
| 4.1. | Resultados | 53 |
| 4.1.1. | Determinar y comparar el efecto de la arcilla Chacco Azángaro al 12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración en el crecimiento de Porphyromonas gingivalis (cepa nativa), utilizando la técnica de dilución en Agar. | 53 |
| 4.1.2. | Determinar y comparar el efecto de la arcilla Chacco Azángaro al 12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración en el crecimiento de Porphyromonas gingivalis (cepa ATCC® 33277™), utilizando la técnica de dilución en Agar | 56 |



| | |
|--|----|
| 4.1.3. Determinar y comparar el efecto de la arcilla Chacco Azángaro al 12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración en el crecimiento de Porphyromonas gingivalis (cepa nativa), utilizando la técnica difusión en Agar (Discos de sensibilidad) | 59 |
| 4.1.4. Determinar y comparar el efecto de la arcilla Chacco Azángaro al 12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración en el crecimiento de Porphyromonas gingivalis (cepa ATCC® 33277™), utilizando la técnica difusión en Agar (Discos de sensibilidad) | 62 |
| 4.1.5. Determinar y comparar el efecto de la arcilla Chacco Ácora al 12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración en el crecimiento de Porphyromonas gingivalis (cepa nativa), utilizando la técnica de dilución en Agar | 65 |
| 4.1.6. Determinar y comparar el efecto de la arcilla Chacco Ácora al 12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración en el crecimiento de Porphyromonas gingivalis (cepa ATCC® 33277™), utilizando la técnica de dilución en Agar. | 68 |
| 4.1.7. Determinar y comparar el efecto de la arcilla Chacco Ácora al 12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración en el crecimiento de Porphyromonas gingivalis (cepa nativa), utilizando la técnica difusión en Agar (Discos de sensibilidad) | 71 |
| 4.1.8. Determinar y comparar el efecto de la arcilla Chacco Ácora al 12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración en el crecimiento de Porphyromonas gingivalis (cepa ATCC® 33277™), utilizando la técnica difusión en Agar (Discos de sensibilidad) | 74 |
| 4.2. Discusión | 80 |
| CONCLUSIONES | 83 |
| RECOMENDACIONES | 85 |
| BIBLIOGRAFÍA | 86 |
| ANEXOS | 96 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Pág. |
|--|-------------|
| 1. Ubicación geográfica de los principales yacimientos de arcilla Chacco de la Región Puno-Perú | 9 |
| 2. Composición química de variedades de arcilla Chacco de la Región Puno-Perú | 9 |
| 3. Materia orgánica y potencial de hidrogeniones de variedades de arcilla Chacco, de la Región Puno-Perú | 9 |
| 4. Aislamiento e identificación e identificación de <i>Porphyromonas gingivalis</i> provenientes de pacientes con diagnóstico de Periodontitis | 43 |
| 5. Conformación de los grupos experimentales | 45 |
| 6. Efecto de la arcilla Chacco Azángaro en el crecimiento de <i>Porphyromonas gingivalis</i> (cepa nativa) - técnica de dilución en Agar. | 53 |
| 7. Efecto de la arcilla Chacco Azángaro en el crecimiento de <i>Porphyromonas gingivalis</i> (cepa ATCC® 33277™), utilizando la técnica de dilución en Agar. | 56 |
| 8. Efecto de la arcilla Chacco Azángaro en el crecimiento de <i>Porphyromonas gingivalis</i> (cepa nativa), utilizando la técnica difusión en Agar (Discos de sensibilidad). | 59 |
| 9. Efecto de la arcilla Chacco Azángaro crecimiento de <i>Porphyromonas gingivalis</i> (cepa ATCC® 33277™), utilizando la técnica difusión en Agar (Discos de sensibilidad). | 62 |
| 10. La arcilla Chacco variedad de Ácora en diferentes concentraciones sobre el crecimiento de <i>Porphyromonas gingivalis</i> (cepa nativa), utilizando la técnica dilución en Agar. | 65 |
| 11. Efecto de la arcilla Chacco Ácora en el crecimiento de <i>Porphyromonas gingivalis</i> (cepa ATCC® 33277™), utilizando la técnica de dilución en Agar. | 68 |
| 12. Efecto de la arcilla Chacco Ácora en el crecimiento de <i>Porphyromonas gingivalis</i> (cepa nativa), utilizando la técnica difusión en Agar (Discos de sensibilidad). | 71 |



13. Efecto de la arcilla Chacco Ácora en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa ATCC® 33277™), utilizando la técnica difusión en Agar (Discos de sensibilidad). 74
14. Comparación de grupos 77

ÍNDICES DE FIGURAS

| | Pág. |
|--|-------------|
| Figura 1. Clasificación de minerales arcillosos. | 5 |
| Figura 2. Principales yacimientos de arcilla Chacco en la Región Puno-Perú..... | 8 |
| Figura 3. Estructura cristalina de la Montmorillonita. Fuente: Adaptado de De Almeyda 2010 | 11 |
| Figura 4. Hidratación o glicolado. Fuente: Adaptado de Almeyda 2010 | 13 |
| Figura 5. Hidratación de Montmorillonitas. Fuente: Adaptado de Otto (2016). | 14 |
| Figura 6. Superficies de los argilominerales montomorilloníticos | 17 |
| Figura 7. Cepa ATCC® 33277™) de dilución en Agar | 58 |
| Figura 8. CEPA NATIVA- CHACCO DE AZÁNGARO..... | 61 |
| Figura 9. Cepa ATTC - Chacco de Azángaro..... | 64 |
| Figura 10. Chacco Acora - dilución en agar | 67 |
| Figura 11. Cepa ATTCC Acora..... | 70 |
| Figura 12. Cepa Nativa-Chacco Acora - Difusión en agar..... | 73 |
| Figura 13. Cepa ATTCC - Chacco Acora..... | 76 |



ÍNDICE DE ANEXOS

| | Pág. |
|--|-------------|
| ANEXO A. Pruebas estadísticas | 97 |
| ANEXO B. Documentos - evidencia | 124 |
| ANEXO C. Consentimiento informado | 127 |
| ANEXO D. Panel Fotográfico | 129 |
| ANEXO E. Ficha de observación | 134 |

RESUMEN

Arcilla *Chacco* contiene Montmorillonita y Bentonita, que liberan radicales libres y alteran la estructura de algunas especies bacterianas a través de la absorción electrostática a sus superficies, seguida de desactivación por ruptura de la membrana celular. La presente investigación tuvo como objetivo determinar el efecto inhibitorio de la arcilla *Chacco* en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis*. Con esta finalidad utilizamos el método deductivo y la observación, se trata de un estudio experimental in vitro, de tipo cuantitativo, nivel explicativo, de corte transversal y la técnica aplicada fue la observación estructurada. La muestra de estudio estuvo conformada por placas Petri que albergaban *Porphyromonas gingivalis* en su medio de cultivo, cada grupo, control y experimental, estuvo formado por 12 repeticiones, se utilizaron dos cepas diferentes de *Porphyromona gingivalis*, una procedente de pacientes con periodontitis (cepa nativa) y la otra de cultivos estandarizados (CEPA ATCC® 33277TM) (cepa estandarizada), ambas fueron expuestas a diferentes concentraciones de dos variedades de arcilla *Chacco*, ricas en Bentonita, Illita y Montmorillonita, procedentes de dos provincias (Azángaro y Ácora), a concentraciones de 100mg/ml, 75mg/ml, 50mg/ml, 25mg/ml y 12,5mg/ml, se aplicaron dos técnicas microbiológicas para evaluar el crecimiento bacteriano, dilución en Agar y discos de sensibilidad Kirby Bauer con pozos. Se consideró clorhexidina al 0,12% como control positivo y suero fisiológico como control negativo. Los resultados sugieren que la arcilla *Chacco* de Azángaro y Acora, tienen un efecto inhibitorio positivo y estadísticamente significativo, según las pruebas estadísticas de ANOVA y Tukey ($p < 0,00$), así también se obtuvo un efecto inhibitorio más marcado cuando se aplicó arcilla *Chacco* procedente de Ácora en comparación al de Azángaro. Se concluye que, al realizar el aislamiento de *Porphyromonas gingivalis*, ésta es sensible para arcilla *Chacco*.

Palabras claves: Arcilla *Chacco*, Bentonita, Montmorillonita, Periodontitis, Enfermedad periodontal, *Porphyromonas gingivalis*.

ABSTRACT

Chacco clay contains Montmorillonite and Bentonite, which release free radicals and alter the structure of some bacterial species through electrostatic adsorption to their surfaces, followed by deactivation by rupture of the cell membrane. The present investigation was aimed at determining the inhibitory effect of Chacco clay on the growth of *Porphyromonas gingivalis*. For this purpose, we used the deductive method and observation; it is an experimental in vitro study, quantitative, explanatory level, cross-sectional, and the technique applied was structured observation. The study sample consisted of Petri dishes containing *Porphyromonas gingivalis* in its culture medium, each group, control and experimental, consisted of 12 replicates, two different strains of *Porphyromona gingivalis* were used, one from patients with periodontitis (native strain) and the other from standardized cultures (CEPA ATCC® 33277TM) (standardized strain), Both were exposed to different concentrations of two varieties of Chacco clay, rich in Bentonite, Illite and Montmorillonite, from two provinces (Azángaro and Ácora), at concentrations of 100mg/ml, 75mg/ml, 50mg/ml, 25mg/ml and 12.5mg/ml, two microbiological techniques were applied to evaluate bacterial growth, dilution in Agar and Kirby Bauer sensitivity discs with wells. Chlorhexidine 0.12% was considered as positive control and physiological serum as negative control. The results suggest that Chacco clay from Azángaro and Acora, have a positive and statistically significant inhibitory effect, according to ANOVA and Tukey statistical tests ($p < 0.00$), also a more marked inhibitory effect was obtained when Chacco clay from Acora was applied compared to that from Azángaro. It is concluded that, when isolating *Porphyromonas gingivalis*, it is sensitive to Chacco clay.

Key words: Chacco clay, Bentonite, Montmorillonite, Periodontitis, Periodontal disease, *Porphyromonas gingivalis*.

INTRODUCCION

Una de las condiciones patológicas más comunes y que más contribuye en la pérdida de estructuras dentales es la periodontitis. Los pacientes con formas generalizadas de periodontitis demuestran mayor tendencia a presentar mala calidad de vida, sobre todo debido a las importantes consecuencias en la salud física y malestar psicológico (1).

La enfermedad inflamatoria crónica más frecuente en el ser humano es la periodontitis, que afecta a más de la mitad de los adultos en el Reino Unido y Estados Unidos y al 60% de los mayores de 65 años (1), Además, se ha informado que la enfermedad de las estructuras periodontales afecta al 98,5% de los adultos, mientras que la prevalencia de la periodontitis se elevaría al 30% (2).

Offenbacher ha desarrollado un modelo etiopatogénico que ilustra cómo un grupo específico de microorganismos proliferan en el biofilm subgingival y cómo sortean la primera línea de defensa, representada por los polimorfonucleares, desencadenando el mecanismo linfocito-monocito y liberando una variedad de citoquinas y otros mediadores de la reacción inflamatoria que conducen a la pérdida de los tejidos de soporte. Esta proliferación será causada por una susceptibilidad previa del paciente o por factores ambientales(3).

La evaluación diagnóstica de los pacientes con periodontitis incluye una serie de pruebas basadas en parámetros clínicos como el grado de inflamación, la profundidad del sonograma periodontal y el nivel de inserción clínica, así como parámetros radiológicos y microbiológicos como la presencia de crecimiento bacteriano (4). A pesar de ello, estos parámetros tienen limitaciones en su capacidad para caracterizar e identificar los microorganismos presentes en el biofilm subgingival de los pacientes con enfermedad periodontal (5). Por esta razón, ha sido útil desarrollar técnicas bioquímicas y moleculares como la amplificación del ADN bacteriano mediante la reacción de la polimerasa ribosómica del gen 16S ADN, y utilizar la identificación de la secuencia del ADN para catalogarlos adecuadamente para un tratamiento eficaz (6).

Ciertas arcillas tienen propiedades antibacterianas; en particular, las que incluyen metales reducidos solubles y minerales de arcilla expandible que absorben cationes, lo que proporciona la capacidad de liberación prolongada de metales y la generación de radicales



libres tóxicos(7). Se halló que la arcilla de hidralgirita tiene un efecto inhibitor sobre el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* en cepas certificadas por la ATCC(8). Por lo tanto, la arcilla *chacco* puede tener un efecto inhibitorio sobre *Porphyromonas gingivalis* aislada de pacientes con periodontitis (11).

El propósito del estudio fue identificar el efecto de la arcilla *chacco* variedades Azángaro y Acora sobre el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* en cepas nativas y estandarizadas.

El informe de investigación se estructura en tres capítulos; en el capítulo I se revisó la literatura relacionada con la variable arcilla *chacco* y su relación con *Porphyromonas gingivalis*. En el capítulo II se describe la formulación del problema, la justificación de los objetivos y las hipótesis. La metodología empleada, los detalles técnicos, la descripción de los métodos por objetivos específicos y los materiales y dispositivos utilizadas en la investigación se tratan en el Capítulo III. Además de la estrategia de tratamiento de datos empleada. Finalmente se muestran los resultados y la discusión de la investigación en el último capítulo, conjuntamente con sus conclusiones y recomendaciones.

CAPÍTULO I

REVISIÓN DE LA LITERATURA

1.1. Marco teórico

1.1.1. Arcillas

Al humedecerse, el material cristalizado que compone las arcillas -que puede ser limo o depósitos minerales- se convierte en una sustancia fina y granular formada por partículas minúsculas cuyo tamaño oscila entre 2 y 4 micras(9). Los materiales que componen las arcillas son mezclas naturales de silicatos de aluminio hidratados ($Al_2O_3 - 2SiO_2 - H_2O$), que son el producto final de complejos procesos geoquímicos que provocaron la meteorización de las rocas feldspáticas (9)(10). Estos fenómenos son provocados por la interacción entre la presión, la temperatura y la humedad. Normalmente, las arcillas son una mezcla de varias variedades mineralógicas, entre las cuales se mencionan frecuentemente los aluminosilicatos como la bentonita, caolinita, junto con el cuarzo, el feldespato, la esmética, la mica y algunos oxihidróxidos metálicos, además de todo el hierro, el magnesio y el calcio. Aunque la composición química de las arcillas puede ser comparable, su composición mineralógica es muy diversa (10). También son materiales inorgánicos de sílice no metálicos con una estructura de planos superpuestos que, al combinarse con el agua, crean sistemas con distintos grados de plasticidad y resistencia. También adquieren durabilidad y dureza cuando se calientan a altas temperaturas(11).

Estas arcillas suelen proceder de yacimientos hidrotermales que contienen minerales reducidos de arcilla con un contenido de Fe vinculado al proceso de vulcanismo(12). Los depósitos de azufre que se han descubierto a escala mundial están relacionados

con el vulcanismo de la zona de subducción y son potencialmente residentes de arcillas. Pueden ser eficaces para eliminar una amplia gama de patógenos humanos, incluso los que han desarrollado resistencia a los antibióticos(13).

El uso de las arcillas como material se remonta a la prehistoria, y tienen un aspecto macroscópico similar al de las arcillas. Se han utilizado para diversos fines, como la preparación de alimentos (como la adición de salsa a los amaretti), el tratamiento médico (por parte de los naturópatas aimaras para aliviar el dolor y tratar las hemorragias persistentes) y la cerámica (como material de base para fundir cerámica). Otros usos industriales de los materiales esméticos son los blanqueadores en la fabricación de papel, componentes de pintura, absorbentes, colorantes, bandejas de fundición de moldes, productos químicos, productos farmacéuticos y agricultura(11).

1.1.1.1. Clasificación de las arcillas

Se pueden distinguir las siguientes familias o grupos de minerales arcillosos en función de su distribución estructural:

Fibras bidireccionales: Las dos capas que componen los filosilicatos bilaminares -una tetraédrica y otra octaédrica- les dan su nombre, 1:1 o T:O (Tabla 1). Los tetraedros suelen estar formados por silicio y están rodeados de oxígeno; sin embargo, en ocasiones, pueden utilizarse iones de aluminio o hematita en lugar de silicio (10). El aluminio o el magnesio puede ser el ion dominante y el oxígeno o los hidróxidos pueden rodear el octaedro (OH) (11) (12). La lámina resultante se denomina dioctaédrica cuando el aluminio es el elemento principal, y trioctaédrica cuando el magnesio es el elemento dominante. Los distintos iones están conectados de forma que sigue habiendo electronegatividad entre ellos. Una lámina está formada por tapas tetra y octaédricas. En este nivel de clasificación se distinguen dos familias de minerales: la familia de la serpentina (trioctaédrica) y la dioctaédrica (Kandita o Caolinita)(10).

Trifilosilicatos trilaminares: Cada lámina está formada por dos láminas tetraédricas que recubren una lámina octaédrica de aluminio o magnesio; por

ello, se denominan "trilaminares", o 2:1 o T:0: T (12). La ausencia de neutralidad eléctrica en las láminas se debe a la sustitución de unos iones por otros que llevan una carga diferente. El orden de separación de las láminas es consistente en tres familias: micas, minerales fibrosos y minerales de atapulgita (10)(12).

Cloritas: Son una clase de minerales cuyas láminas están compuestas por dos tapas tetraédricas y dos tapas octaédricas, de ahí los nombres 2:1:1 o T:0: T:0 (12)(13). La ausencia de laminaciones eléctricamente neutras se debe a la sustitución de algunos cationes por otros que tienen una carga diferente pero que son aproximadamente equivalentes en tamaño (9). La neutralidad se consigue a través de grupos hidróxidos y cationes interlaminares como sodio, potasio, calcio o magnesio. El número de separaciones de líneas es de 14 o más(10).

| TIPO | | DIOCTAÉDRICOS | | TRIOCTAÉDRICOS |
|-------------------------|-----|---|--|---|
| T:O (Bilaminares) | 1:1 | KANDITAS | Caolinita Nacrita Dickita Halosita Illita Moscovita Paragonita Pirofilita | SERPENTINAS Antigorita Crisolito Lizardita Berthierita Flogopita Biotita Lepidolita Talco |
| T:O:T (Trilaminares) | 2:1 | ESMECTITAS (Expandibles) ATAPULGITAS (Fibroso) | Montmorillonita Beidelita Nontronita Vermiculita Paligorskita | ESMECTITAS Saponita Hectorita Sauconita Sepiolita |
| T:O:T:O 2:1:1 | | CLORITAS | Sudoitas | CLORITAS Clinocloros Procloritas |

Figura 1. Clasificación de minerales arcillosos.

Fuente: Tomada y modificada de García R. E. & Suárez B. M. (2002)

1.1.1.2. Arcilla Chacco

Es una arcilla compuesta principalmente en un 80% de minerales de arcilla, un 10% de minerales de arena fina y un 10% de minerales de limo. La partícula

de arcilla está formada por dos componentes: una parte insoluble conocida como micela o cristal y otra formada por un grupo de cationes intercambiables que se han adsorbido con relativa fuerza (14).

Según la intercambiabilidad de los cationes que pertenecen al grupo de arcillas silicatizadas, como la caolinita, la montmorillonita y la Illita (11).

El *chacco* purificado es el *chacco* tratado; a través de muchas operaciones y procesos, se ha eliminado la arenilla y el limo, dejando que domine la arcilla, que tiene propiedades medicinales (15).

El *chacco* purificado tiene propiedades similares a las de la bentonita y la caolinita, lo que lo convierte en un candidato plausible para sustituir estas sustancias en varias formulaciones farmacéuticas. Cuando se comparan con las formulaciones farmacéuticas elaboradas sin bentonita ni calomel, estas formulaciones presentan similitudes en su uniformidad y estabilidad, en particular cuando se trata de semisolventes o plásticos (15)(17).

Las características geoquímicas de las Esmécticas, también conocidas como Bentonitas, identifican cuatro especies de arcillas: Montmorillonita, Vercullita, Illita y Caolinita, todas ellas minerales laminares de aluminio-sílice (16).

Los llamados minerales de arcilla, de los cuales los siguientes son los principales, conforman arcillas como el *chacco*:

- Bentonita, Caolinita: Al_2O_3 , SiO_2 , y HO_2 .
- Illita: K_2O , MgO , Al_2O_3 , SiO_2 , y H_2O
- Montmorillonita: Al_2O_3 , $(Mg, Ca)_5$, SiO_2 , y nH_2O

Cada uno de estos minerales confiere a la arcilla una cualidad o característica determinada. Como resultado, una arcilla hecha con mucha montmorillonita será muy plástica, como la bentonita (11).

Tanto la bentonita como el carbón son insolubles en agua destilada y en disolventes orgánicos; se combinan con el agua para generar suspensiones hidrocoloides inorgánicas. La bentonita es un intercambiador catiónico que

provoca un desequilibrio en el número de portadores de carga positiva cuando se modifica el pH de la suspensión. El equilibrio se restablece sustituyendo los iones Al^3 por los iones Mg^2 , Fe^2 se recupera el equilibrio agregando iones Ca^2 y Na^1 (17).

El Instituto Geológico, Minero y Metalúrgico (INGEMMET) de Lima analizó tres muestras de "chacco" y encontró que la comunidad de Ccapalla tenía el mayor porcentaje de montmorillonita (56,53%) y el menor porcentaje de Cora (29,58%), así como otros minerales como caolinita, halloysita e illita(18).

Sin embargo, la Universidad Complutense de Madrid y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC) comenzaron a caracterizar la composición mineral de esta arcilla mediante difracción de rayos X, microscopía eléctrica de barra y de transmisión, y descubrieron que se trata de arcillas extremadamente homogéneas y compactas formadas por capas laminares agregadas de menos de 1 mm de espesor. El pequeño tamaño de las partículas y la delaminación (desorden en la dirección de la esméctica lámina) son las causas de la elevada superficie externa de la arcilla (18)(19). La capacidad de adsorción de diversas moléculas orgánicas se explica por la elevada superficie externa con conexiones no saturadas que le permite interactuar con sustancias polares como el agua y las toxinas; además, tiene un gran número de centros de actividad por su carga tetraédrica, lo que potencia su capacidad exclusiva(19).

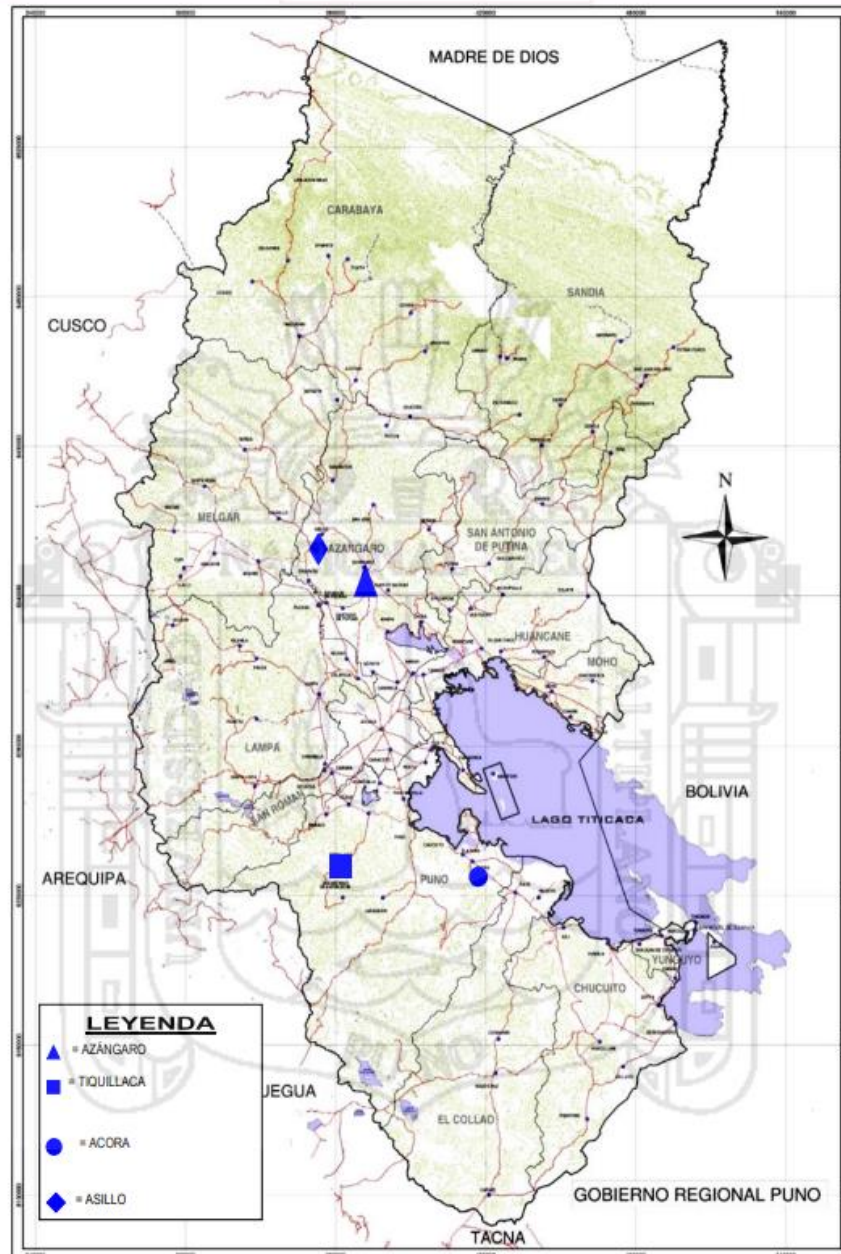


Figura 2. Principales yacimientos de arcilla Chacco en la Región Puno-Perú

Fuente: Adaptado de Roque (2016)

Tabla 1.

Ubicación geográfica de los principales yacimientos de arcilla Chacco de la Región Puno-Perú

| Localidad | Ubicación geográfica | | | |
|-----------|----------------------|-------------|----------------|-------------------|
| | Altitud | Latitud Sur | Longitud Oeste | Subtipo Climático |
| Azángaro | 3,859msnm | 14°54'35'' | 70°11'50" | B |
| Acora | 3,960msnm | 15°5'30" | 69°48'22" | D |

Fuente: Roque en su investigación del 2016

Tabla 2.

Composición química de variedades de arcilla Chacco de la Región Puno-Perú

| ZONA | Fe | Mg | F | Ta | In | Na | Ti | W | I |
|--------------|--------|-------|-------|----|----|----|----|---|---|
| AZANGARO | 9.82c | 1.07 | 6.41 | | | | | | |
| ACORA | 8.58b | 1.07 | | | | | | | |
| PROBABILIDAD | 0.0001 | 0.871 | 0.099 | | | | | | |

Fuente: Roque en su investigación del 2016

Tabla 3.

Materia orgánica y potencial de hidrogeniones de variedades de arcilla Chacco, de la Región Puno-Perú

| Zona | M.O. | pH |
|--------------|-------------|------------|
| Azángaro | 7.00+-1.79a | 6.79+-0.82 |
| Acora | 8.76+-1.33b | 6.38+-0.49 |
| Probabilidad | 0.0001 | 0.103 |

Fuente: Roque en su investigación del 2016

1.1.1.3. Bentonitas y montmorillonitas

La bentonita es el nombre comercial que se da a las arcillas compuestas predominantemente de arcilla montmorillonita, que pertenecen al grupo de las

esmeclitas y cuyas propiedades físico-químicas y tecnológicas se establecen por esta arcilla. El nombre de bentonita tiene su origen en la primera reserva conocida de esta arcilla, situada en Fort Benton, en el Estado de Wyoming (Estados Unidos). Inicialmente se definió por su origen geológico, que comprende las arcillas procedentes de alteraciones de cenizas volcánicas y alteradas in situ (9).

Sin embargo, dada la similitud entre los reticulados cristalinos de diferentes arcillas montmorillonitas y la falta de relación entre el origen de la arcilla y las características que presentará, no hay pruebas de que las propiedades tecnológicas de las bentonitas dependan de su origen. Por lo tanto, si una determinada arcilla tiene especificaciones técnicas iguales o superiores a las requeridas para las bentonitas naturales de uso industrial, no hay ninguna objeción a que se le llame bentonita por igual, independientemente de dónde se obtenga o de su formación (20).

El origen natural, el bajo costo, la alta relación de aspecto (relación entre el tamaño de las partículas, la longitud frente a la anchura), la resistencia a los disolventes y a las altas temperaturas, y el alto grado de delaminación son propiedades que dan a las arcillas bentoníticas un amplio uso industrial. Las bentonitas se utilizan con mayor frecuencia como componente tixotrópico de los fluidos de perforación, como aglutinante de las arenas en los moldes de fundición, en la decoloración de los aceites y en la peletización de los minerales de hierro y manganeso, pero pueden utilizarse en un gran número de aplicaciones industriales muy diversas (16).

El mineral de arcilla predominante o más importante en relación con los constituyentes de las bentonitas es la montmorillonita, un mineral hidratado con una fórmula teórica de $4\text{SiO}_2 \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot n\text{H}_2\text{O}$, aunque tiene una composición muy variable debido a la facilidad de sustitución en la red espacial. Perteneciente al grupo de los filosilicatos con una unidad estructural 2:1, la montmorillonita tiene una estructura formada por dos láminas de sílice tetraédrica (T) que incluyen una lámina octaédrica de alúmina (O), componiendo una capa anisotrópica TOT, representada por la figura 1 (20).

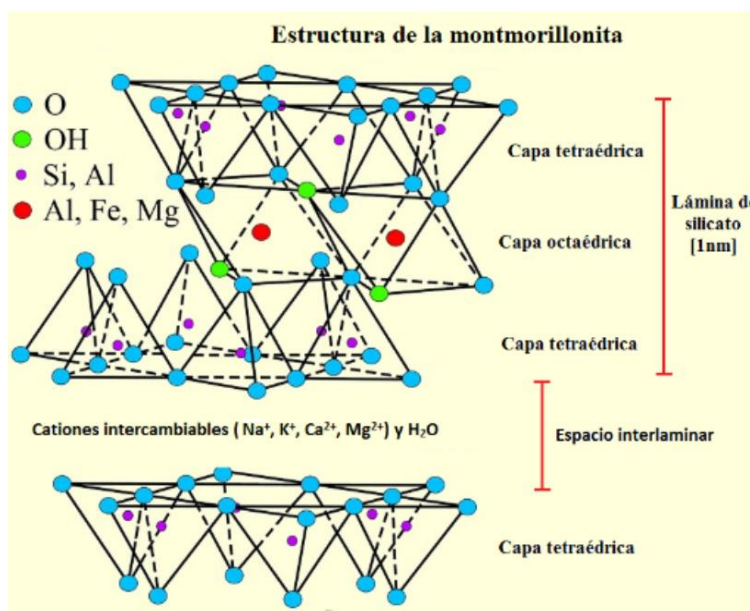


Figura 3. Estructura cristalina de la Montmorillonita. Fuente: Adaptado de De Almeyda 2010

En la estructura cristalina de la montmorillonita, los iones de la posición octaédrica pueden sufrir sustituciones iónicas isomórficas, es decir, pueden ser intercambiados por cationes de menor carga y tamaño similar, por ejemplo, el intercambio de Al³⁺ por Mg²⁺. Estos intercambios eventuales generan un desequilibrio eléctrico en la reticulación cristalina, formando una aparente carga negativa en las superficies de las láminas. Con esto, las capas adyacentes de alúmina tienden a repelerse entre sí, y forman una abertura que permite la penetración de las moléculas de agua. Este espacio se llama el medio interplanar (o interlaminar)(21). La deficiencia de carga se neutraliza por la existencia de cationes intercambiables e hidratados -más comúnmente representados por los iones Na⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺- en el medio interlaminar que, por no estar irreversiblemente fijados a la estructura, pueden propagarse libremente a través del agua intersticial y ser intercambiados por otros iones(7). El espacio interplanar presenta continuidad en las direcciones de los ejes a y b, y en la dirección c, las estructuras están débilmente conectadas por las conexiones de Van der Waals, lo que hace que sus moléculas tiendan a orientarse en láminas paralelas apiladas, para aumentar al máximo la fuerza de

atracción entre ellas por la aproximación de sus átomos. Esta orientación aproximadamente paralela en los planos de los cristales da una estructura laminada a la bentonita(13), lo que hace que su estructura cristalina se entrecruce con una fácil división basal. Este plano cristalográfico también puede utilizarse para clasificar los diferentes tipos de minerales de arcilla esméctica existentes(21). La configuración de una bentonita laminar seca puede describirse según sus tres unidades estructurales y sus disposiciones espaciales: La primera unidad es la capa (partícula cristalina elemental), con espesores de unos 10 Å y de 1 a 2µm de diámetro, visible sólo en las micrografías de transmisión; la segunda unidad se refiere al tactoide, que consiste en el apilamiento de las capas elementales. En aras de la simplicidad, esta unidad también puede ser denominada como "partícula", siguiendo la nomenclatura adoptada ; La tercera unidad es el aglomerado, que consiste en la superposición de los tacos. Los grupos se organizan en grupos observados en micrografías de barrido, e incluyen varias fases accesorias(20).

Las principales características atribuidas a la arcilla montmorillonita son: Están formados por partículas de tamaño coloidal; Tienen un alto grado de desorden en el empaquetamiento de las capas; Tienen una alta área de superficie específica; Tienen láminas de carga moderada; Tienen una alta capacidad de intercambio catiónico, independiente del pH del medio; Tienen una baja capacidad de intercambio aniónico, dependiente del pH del medio; Presentan una separación variable de capas en términos de humedad y predominio de catión interlamilar; Capacidad de algunos grupos (intercambiables Li⁺ y Na⁺) de presentar una alta expansibilidad entre las capas cuando se encuentran en medio acuoso, pudiendo, en condiciones óptimas, proporcionar una disociación completa de sus partículas (delaminación); Presentan el poder de intercalación de sustancias externas, como macromoléculas orgánicas y cationes metálicos de interés(12).

Todas las propiedades enumeradas anteriormente dependen de factores como la constitución química, mineralógica y estructural del mineral de arcilla. Sin embargo, las atribuciones tecnológicas más importantes de las montmorillonitas y bentonitas están especialmente relacionadas con la

naturaleza de sus cationes interplanares predominantes y su caracterización como sodio, calcio o poliaciónicos (22).

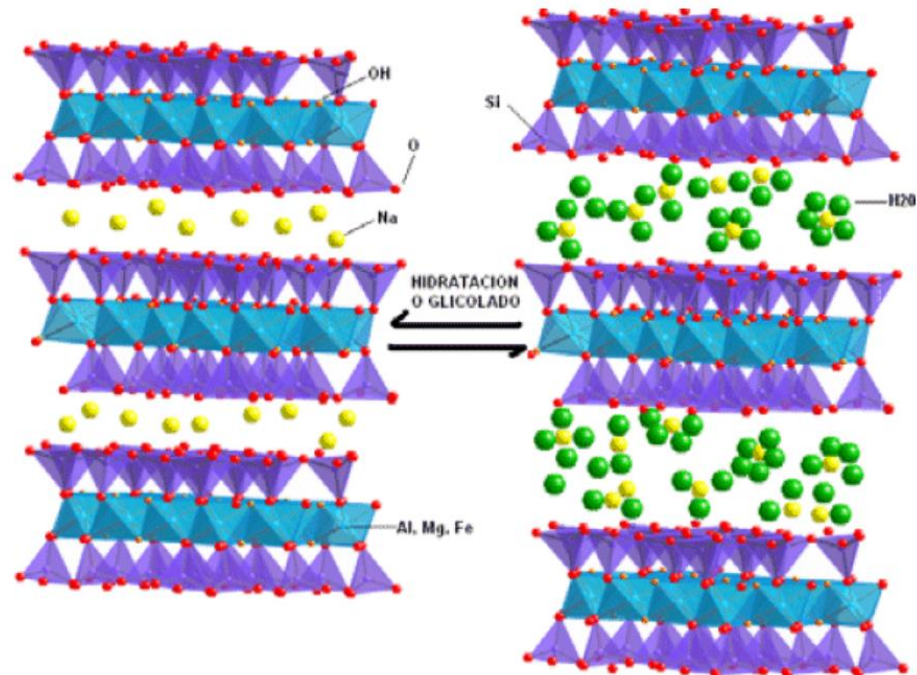


Figura 4. Hidratación o glicolado. Fuente: Adaptado de Almeyda 2010

1.1.1.4. Bentonitas sódicas, cálcicas y poliaciónicas

Como se ha explicado anteriormente, en el espacio entre las láminas de la estructura están presentes las moléculas de agua y los cationes intercambiables de Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} . Estos cationes se adsorben ligeramente a la superficie negativa del argilomineral y pueden ser predominantes para uno de estos iones u ocurrir para todos por igual. La bentonita se llama de calcio cuando la mayoría de los iones de Ca^{2+} se adsorben. Del mismo modo, si el catión predominante es Na^+ , la bentonita se clasifica como de sodio (20). Cuando la presencia de dos o más cationes interplanares está equilibrada, la bentonita se clasifica como intermedia o poliaciónica (las arcillas de magnesio no son comunes). El término intercalación denota tanto la adsorción de la superficie laminar como las reacciones de intercambio interlaminar(23)

Las bentonitas sódicas son las que promueven un mayor interés comercial, ya que tienen una buena capacidad de empleo en aditivos para fluidos de perforación, aglutinantes para moldes de fundición y también en la síntesis de arcillas organofílicas. Sus propiedades más importantes, que al mismo tiempo son más relevantes para el alcance del presente trabajo, son (9):

1.1.1.5. Crecimiento

Una de las características más peculiares de las bentonitas sódicas es su capacidad de expandirse en suspensiones acuosas, lo que se denomina crecimiento o hinchazón. Esta propiedad es pronunciada en las bentonitas de sodio debido al alto poder de hidratación de los cationes monovalentes de sodio, que permite la adsorción de varias moléculas de agua a estos iones, provocando el distanciamiento de las capas laminares de la arcilla, lo que puede significar un aumento de hasta 20 veces sobre el volumen inicial de dispersión(24), como se muestra en la figura 5a. Esta absorción de agua, cuando continúa, puede dispersar las capas estructurales hasta tal punto que las interacciones electrostáticas son demasiado débiles, causando el desprendimiento individualizado de las partículas de arcilla. De esta manera, cada unidad estructural puede dispersarse en el medio líquido como partículas de dimensiones coloidales, cargadas negativamente en sus superficies y equilibradas por la fijación de cationes de sodio, Figura 5b. Sin embargo, después del secado, las partículas se vuelven a apilar para formar los aglomerados, caracterizando los estados reversibles de dispersión y agregación (7).

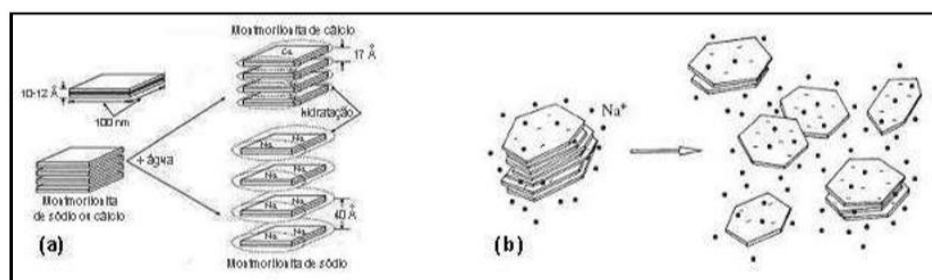


Figura 5. Hidratación de Montmorillonitas. Fuente: Adaptado de Otto (2016).

En el caso de las arcillas de calcio o policatiónicas, la cantidad de agua adsorbida es limitada, lo que hace que las partículas continúen unidas entre sí por interacciones eléctricas y de masa. Esta diferencia se observa fácilmente cuando las arcillas de sodio, calcio y policatiónicas están en medio acuoso. Después de la agitación seguida del reposo, las sódicas se delaminan en un sistema homogéneo con todas sus partículas dispersas en el medio líquido. Además, muestran un aumento bastante considerable de volumen. Las arcillas cálcicas y las policatiónicas, a su vez, son floculadas, con una capa de agua clara sobre la porción de arcilla que se deposita en el fondo del recipiente, luego de ser agitadas (24).

Cada tipo de hinchazón está controlado por un tipo de fuerza y, además de la naturaleza predominante del catión intercambiable, está influenciado por otras propiedades específicas del material, como el grado de pureza, la superficie, la carga de las capas, la distribución de las cargas interlaminares, así como información sobre el sistema, como la cantidad y la actividad del disolvente en la solución o en la atmósfera, la temperatura y otros (16).

1.1.1.6. Intercambio catiónico

Las arcilla-minerales tienen iones fijados en su superficie, entre las capas y dentro de los canales de la estructura cristalina que pueden ser intercambiados por otros iones presentes en una solución circundante a través de interacciones físico-químicas, sin ningún cambio estructural en el retículo cristalino(9). Esta característica se denomina capacidad de intercambio catiónico y consiste en una difusión de doble dirección, según la cual cada equivalente de un catión adsorbido por el argilomineral provoca la liberación de un equivalente catiónico previamente "fijado". El intercambio entre los iones no provoca cambios en la estructura del argilomineral, sino que modifica sus propiedades físico-químicas y tecnológicas según el ión adsorbido(13). La propiedad de intercambio iónico es de fundamental importancia para la eficacia de todos los procesos que utilizan los cationes intercambiables e interplanares como especies sustituibles por iones de interés determinado. La síntesis de arcillas

organofílicas, por ejemplo, se produce mediante la sustitución de iones de sodio, calcio y magnesio por cationes cuaternarios de amonio. El proceso de activación alcalina se produce con el intercambio de iones de sodio por iones de calcio y magnesio. Análogamente, todos los métodos de adsorción e intercalación de cationes metálicos en las montmorillonitas se basan en procesos de intercambio catiónico, ya que la propensión de las montmorillonitas a absorber especies catiónicas de una solución viene dada directamente por ella (25).

Morrison menciona que el intercambio de cationes argilominerales por los cationes de una solución tiene las siguientes características: Reversibilidad; Control por difusión (paso limitante); Estequiometría; Selectividad entre cationes (en la mayoría de los casos) (7).

La física a través de la cinética junto al equilibrio del proceso de intercambio catiónico en los argilominerales se controlan normalmente mediante la difusión, que se produce en dos etapas: en la primera, hay una "difusión en la película", en la que la especie iónica externa transita desde la solución hasta la capa límite alrededor de la partícula arcillosa; en la segunda etapa, hay una "difusión en la partícula", en la que el catión se transporta a los poros de los tactoides, hasta que llega al núcleo de la partícula y reemplaza al catión residente en los sitios(7), también dilucidaron que los procesos de intercambio realizados con una agitación eficiente tenían sus tasas limitadas por la difusión intraparticular, que es promovido por las suspensiones en reposo que ocurre en el intercambio catiónico, en el que el control se hace por difusión en la película. En el caso de las suspensiones diluidas, el proceso de adsorción total se hace más rápido, de modo que el paso limitante se convierte en la sustitución misma de un catión por otro en el sitio de unión aniónico y superficial de la red cristalina (9).

La naturaleza de los iones interplanares también es determinante en el proceso de intercambio catiónico, que también se ve favorecido por la presencia de iones de sodio. Esto ocurre porque el Na^+ es el ion más fácilmente intercambiable (siendo inferior sólo al ión litio), ya que la fuerza que lo une a

la superficie del argilomineral es menor debido a su alto poder de hidratación y baja valencia. Con ello, las bentonitas de sodio proporcionan una mayor capacidad de intercambio iónico, ya que el sodio presenta enlaces más débiles que el calcio y el magnesio, lo que representa una mayor ocurrencia de intercambio entre cationes. Las arcillas montmorillitas naturales tienen un comportamiento muy variable y tienen la capacidad de intercambio catiónico que puede darse dentro de un rango entre 40,0 y 150,0 meq/100g de arcilla(9). Sin embargo, estos valores suelen ser superiores a 80,0 meq/100g cuando se trata de bentonitas compuestas exclusivamente de arcillas montmorillonitas(25).

1.1.1.7. Superficie – área

El área para la superficie total de una arcilla viene dada por la suma de las superficies externas e internas si las hay, de las partículas constituyentes. Figura 6. Las arcillas montmorillonitas tienen una superficie de alrededor de 150,0 a 800,0 m²/g, valores considerados altos, que se originan no sólo en las pequeñas dimensiones de las arcillas que las componen, sino también en la presencia concomitante de áreas externas, internas y finales (11).

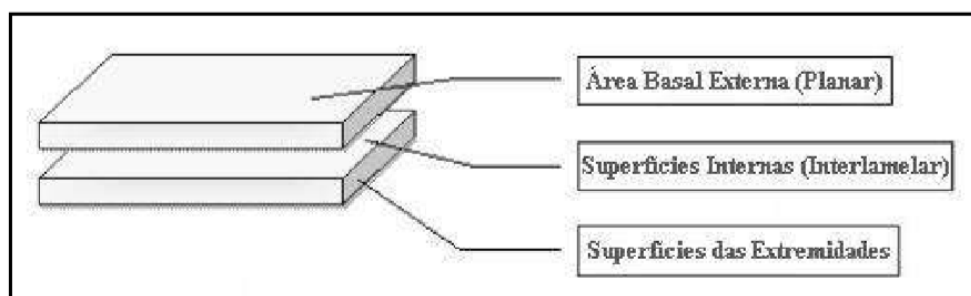


Figura 6. Superficies de los argilominerales montmorilloníticos

Fuente: Adaptado de Otto (2016).

1.1.1.8. Materiales antimicrobianos

En general, los materiales antimicrobianos son compuestos que poseen la facultad de inhibir el crecimiento o matar ciertos microorganismos. Esta propiedad es muy importante en los materiales destinados a los usos más diversos, especialmente los que necesitan la exención o reducción de los

agentes microbiológicos nocivos y las enfermedades causadas por ellos. Estos materiales tienen una amplia aplicación en las industrias alimentarias, los entornos hospitalarios y de laboratorio, los productos farmacéuticos y veterinarios, entre otros. En lo que respecta a la salud pública, en particular, se pueden ahorrar muchos recursos cuando se priorizan las medidas de prevención y control (9). En este contexto, la utilización de productos antimicrobianos eficientes, que tienen por objeto evitar la contaminación causada por hongos, bacterias y otros microorganismos de diferentes especies, puede ser de gran valor. Las bacterias y los hongos han causado epidemias a lo largo de la historia de la vida humana, por lo que los agentes microbicidas se conocen y utilizan desde hace siglos, especialmente en el tratamiento del agua, la conservación de los alimentos y los productos farmacéuticos. Las formas de combatir la acción de estos microorganismos consistían en el uso de tarros de plata y cobre para el almacenamiento de agua hasta el uso de vinagre, vino o cloruro de mercurio en la limpieza de heridas(7). Sin embargo, sólo a mediados del siglo XIX se descubrió el papel de los microorganismos en una variedad de enfermedades infecciosas que habían devastado a la humanidad desde la antigüedad. El primer agente antimicrobiano del mundo fue el salvarsan, un remedio contra la sífilis sintetizado por Ehrlich en 1910. En 1935, Domagk y otros investigadores desarrollaron sulfonamidas, pero estas drogas estaban hechas de compuestos sintéticos y tenían limitaciones en términos de seguridad y eficacia. Sólo en 1928 el Fleming descubrió la penicilina, observando que el crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus* se inhibía en las regiones alrededor de un moho azulado (que correspondía a un hongo del género *Penicillium*) en las placas de cultivo. La penicilina comenzó a usarse en la década de 1940, y se convirtió en uno de los principales salvadores de vidas en la Segunda Guerra Mundial(26). Durante los dos decenios siguientes se desarrollaron nuevas clases de antimicrobianos, cada vez con un espectro más amplio de actividad antimicrobiana. Sin embargo, el uso excesivo de antibióticos y compuestos antimicrobianos comunes, que sólo debería dar lugar a la eliminación de los microorganismos presentes en un sistema, también puede significar una selección indeseable que, en última instancia, favorece la permanencia de los organismos más resistentes a los agentes en cuestión. Con la aparición de cepas

bacterianas y fúngicas que ofrecen resistencia a los microbicidas comunes, haciéndolos obsoletos e ineficaces, se ha intensificado la búsqueda de nuevos materiales con potencial antimicrobiano(13). El tipo de acción antimicrobiana de un material sobre los microorganismos se distingue entre un efecto letal o simplemente inhibitorio y, por lo tanto, puede clasificarse como bactericida o bacteriostático. Los agentes bacteriostáticos son aquellos que inhiben el crecimiento y la reproducción de los microorganismos, impidiendo así su proliferación, pero sin causar una muerte inmediata. Los materiales bactericidas, a su vez, son los que causan daños irreversibles a las células, generando cambios incompatibles con la supervivencia del microorganismo. Un material puede tener un comportamiento totalmente bactericida, o totalmente bacteriostático, o exhibir ambos simultáneamente. La forma de acción más apropiada no siempre es tan obvia como parece, ya que puede ser bastante variable según el microorganismo sobre el que actúe. Esto significa que un agente que es bacteriostático para un organismo puede ser bactericida para otro organismo o para otra cepa del mismo(27).

Los materiales inorgánicos con acción antimicrobiana, a su vez, suelen presentarse en forma de compuestos, con la incorporación de iones metálicos o compuestos orgánicos dentro o fuera de sus estructuras, actuando como un portador o soporte que libera estas sustancias de manera apropiada y controlada. En esta función, las principales características que se esperan de estos materiales son: tiempo de actuación prolongado, estabilidad química y térmica, seguridad, eficacia sobre un amplio espectro de bacterias y hongos, y facilidad de fabricación y procesamiento(21). Los portadores inorgánicos más comunes son las arcillas, las zeolitas, el vidrio, los fosfatos y el carbón activado (23).

1.1.1.9. Mecanismo de acción

La evaluación de casi 100 arcillas muestreadas en todo el mundo ha identificado <10% que son antibacterianas o inhibitoras del crecimiento bacteriano. El pH de las suspensiones acuosas de estas arcillas (50 mg de arcilla/ml de agua) es >10 o <4,5 (13). Las arcillas antibacterianas más eficaces

son las procedentes de los volcanes alterados hidrotermalmente (cenizas y materiales piroclásticos), donde los metales reducidos (por ejemplo, Fe^{2+}) se concentran en las aguas hidrotermales. El aluminio es soluble tanto en el pH alto como en el bajo; por lo tanto, las investigaciones ulteriores se centraron en los metales liberados por los aluminosilicatos y su función en el proceso antibacteriano (7)(14).

Una variedad de procesos físicos y/o químicos pueden hacer que las arcillas sean antibacterianas. El efecto bactericida físico puede ocurrir por la atracción de la superficie entre los minerales de la arcilla y las bacterias, lo que puede obstaculizar la absorción pasiva y activa de nutrientes esenciales, perturbar las envolturas celulares o perjudicar el flujo de metabolitos. Otras arcillas, se han hecho antibacterianas mediante la absorción química de elementos bactericidas conocidos (Ag, Cu, Co, Zn) en ciertos sitios cristalográficos de las superficies minerales. Los óxidos metálicos nanoparticulados y las cerámicas también pueden ser antibacterianas; liberando compuestos tóxicos solubles en proporción a su alta área de superficie específica (13).

1.1.1.10. Correlaciones antibacterianas con la geoquímica

Se utilizaron las tendencias geoquímicas de la eficacia antibacteriana de las arcillas para deducir los controles de las reacciones antibacterianas. La actividad antibacteriana, determinada por las zonas de difusión del disco de inhibición y los métodos de recuento de placas, permitieron un estudio de muestras representativas de cada zona de alteración identificada en el campo. La susceptibilidad antibacteriana se midió tanto en *E. coli* (ATCC 25922) como en *S. epidermidis* (ATCC 14990) y está ligada al pH y al Eh de las soluciones, que se controlan mediante el ensamblaje de minerales cuando se añade agua desionizada para rehidratar la arcilla para su aplicación medicinal. Las pruebas de susceptibilidad antibacteriana contra cepas de bacterias modelo resistentes a los antibióticos (*E. coli* ATCC 35218 y *S. epidermidis* ATCC 35948) produjeron resultados similares (20)(23).

Durante la oxidación de la pirita en la arcilla se producen especies reactivas de oxígeno (ROS), entre ellas el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y especies

radicales (21), siguiendo la conocida serie de reacciones de Fenton. Tanto el O_2 como el Fe^{3+} disueltos pueden oxidar el Fe^{2+} en pirita cuando se hidratan (20). Los radicales hidroxilos reaccionan en nanosegundos con biomoléculas y se sabe que degradan los orgánicos (17). Sin embargo, debido a la corta existencia de especies radicales, el coproducto más estable de las reacciones de Fenton, el H_2O_2 , se suele medir como un indicador de la producción de radicales (17).

Las zonas de inhibición de la *E. coli* gram-negativa y la *S. epidermidis* gram-positiva disminuyen con el aumento del pH, simultáneamente, disminuyen las concentraciones de las principales especies metálicas en solución (Al , Fe^{2+} , Fe^{3+}) y las concentraciones de peróxido de hidrógeno. Las muestras bactericidas tienen todos los valores de $pH < 7$, con concentraciones de Fe^{2+} , Fe^{3+} y Al^{3+} disueltas superiores a 1 mM. Las muestras más antibacterianas provienen de la ubicación de la mina de azufre, que contiene pirita elevada (10-18%), I-S (70-75% de illita; $R > 1$), y jarosita, produciendo zonas de inhibición > 17 mm. Las arcillas azules a cielo abierto contienen menos pirita (4-6 % de peso) y muestran zonas más pequeñas (16).

Las muestras de las zonas de arcilla blanca inhibieron el crecimiento bacteriano cuando se probaron mediante el recuento de placas, pero no produjeron una zona significativa de inhibición en la prueba de difusión de discos. Estas muestras liberaron concentraciones más bajas de metales (< 1 mM) con valores de pH que oscilaban entre 6,2 y 6,7. El crecimiento bacteriano no se ve afectado en las muestras con $pH > 6,7$, en las que la producción de peróxido de hidrógeno es insignificante (7).

Las muestras antibacterianas más efectivas fueron las arcillas negras de la mina de azufre y las arcillas azules de la mina abierta (17).

Las pruebas de susceptibilidad antibacteriana indican que la presencia de pirita por sí sola no prescribe el bactericida, sino que el estado de oxidación de las arcillas portadoras de pirita y el pH amortiguado por el ensamblaje de arcilla controla las reacciones bactericidas. Las arcillas formadas en el ambiente de alta sulfuración documentado en el sitio de la mina de azufre son las más

antibacterianas. El alto contenido de pirita (~19%) y el pequeño tamaño de los cristales (<1 μm) en esta zona promueve la oxidación y la disolución de los minerales, liberando Fe^{2+} , Fe^{3+} y Al^{3+} (>10 mM) mientras que genera peróxido de hidrógeno (H_2O_2 >500 μM), lo que indica una producción de radicales de hidroxilo que conduce al bactericida (7).

Las arcillas Blancas a cielo abierto situadas a lo largo de las fallas no contenían sulfuros de hierro, pero aun así inhiben el crecimiento bacteriano mediante la liberación de Fe^{2+} y Al^{3+} a un pH bajo, y Eh tan bajo como 400mV. Las arcillas blancas pueden liberar Fe^{2+} de los sitios de intercambio en las capas intermedias de esmectita, cuando el agua desionizada interrumpe en el equilibrio geoquímico, conduciendo los cationes de intercambio a la solución. La zona roja oxidada en el Open Pit contiene goethita de la oxidación de la pirita y no es antibacteriana. Cuando la goethita es estable, el estado de oxidación es demasiado alto para la estabilidad del Fe^{2+} acuoso. Las muestras que contienen carbonatos no mostraron actividad antibacteriana, muy probablemente debido a los aumentos de pH que estabilizan los carbonatos, pero las tasas de oxidación de la pirita y la hidrólisis del metal son menores. Las arcillas tienen una carga superficial negativa neta, que permite el libre intercambio de partículas del medio ambiente, incluyendo bacterias, virus, proteínas, ácidos nucleicos y cationes (14).

En los ambientes hidratados, las especies iónicas adsorbidas a las superficies arcillosas pueden intercambiarse con el medio circundante de una manera que depende de la fuerza iónica del medio acuoso y de la selectividad catiónica de la arcilla. Las actividades antibacterianas in vitro de las arcillas naturales están asociadas con la generación de un ambiente de bajo pH y la desorción química de los iones de la superficie de las partículas de arcilla Cunningham. Además, los extractos de mezclas acuosas de arcilla (lixiviados) exhiben actividad antibacteriana (10). Las mezclas antibacterianas de arcilla complementadas con deferoxamina, un quelante de metales que secuestra iones de Fe, Co, Cu, Ni y Zn, rescata a *Escherichia coli* de la matanza por medio de la arcilla. Posteriormente se demostró que estos cinco iones intercambiables eran responsables de la actividad antibacteriana in vitro de las arcillas naturales (12).

1.1.2. Periodontitis

Es una enfermedad de las estructuras periodontales, cursa como un proceso inflamatorio de carácter crónico, que es desencadenada por microorganismos bacterianos, en su historia natural la enfermedad severa provoca la destrucción del aparato de soporte del diente y puede eventualmente conducir a la pérdida del diente. Se desarrolla como resultado de un desequilibrio entre los microorganismos que componen la biopelícula subgingival, que se constituyen el agente etiológico inicial, y el sistema inmunitario del hospedero, que reacciona de manera individual, propia en cada paciente (28). También pueden presentarse otros problemas de salud como dificultad para masticar, inclusive aislamiento social. Al final, la pérdida de dientes se produce por la colonización de microorganismos patógenos y la respuesta autoinmune que provoca la destrucción de los tejidos de inserción dental, como el hueso alveolar, el ligamento periodontal y el cemento radicular (28)(29).

La OMS menciona acerca de las enfermedades de la cavidad bucal, periodontitis y caries dental, tienen una prevalencia del 95 %, y a nivel nacional, datos obtenidos a través del MINSA, con un 86% de prevalencia acerca de la enfermedad en las encías, sin embargo, no existe reportes acerca de la periodontitis, la enfermedad que a partir de los 40 años se manifiesta con mayor magnitud. La OPS menciona que las enfermedades en la cavidad bucal, ocupando una de las principales causas de morbilidad y un segundo lugar en un estado de epidemia, siendo mayor el porcentaje en varones que mujeres, 15.5% y 15.0% respectivamente. En el 2017 en el Perú según el documento técnico acerca de la salud en los adolescentes y jóvenes (18 a 29 años), en los establecimientos de salud en consulta externa fueron los principales problemas un 30%, sobre cavidad oral y problemas dentales (24).

Con un nuevo modelo de patogénesis acerca de la enfermedad, se propuso que esta debe comenzar en una comunidad microbiana sinérgica y disbiótica, que dentro de un ecosistema hacen que estas comunidades se desequilibren, porque son influenciados por las especies microbianas que metabolizan proteínas (29).

La aparición y la progresión de la periodontitis dependen de la presencia de ciertas bacterias anaerobias Gram-negativas en el biofilm subgingival, siendo *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) una de ellas y es considerada un patógeno

"clave" en la aparición de la enfermedad periodontal (28). A pesar de tener una menor abundancia en las zonas enfermas en comparación con el microbiota oral general, esta bacteria es capaz de alterar el microbioma oral y causar disbiosis, lo que puede conducir a la aparición y desarrollo de la periodontitis. Además, *P. gingivalis* es la bacteria que se aísla con mayor frecuencia en pacientes con periodontitis, y se ha relacionado con la progresión de esta enfermedad. Sin embargo, su presencia en individuos sanos no indica la existencia de la enfermedad, por otro lado los mecanismos que utiliza la periodontitis para desarrollarse y/o avanzar aún no se han aclarado del todo (28)(29).

Las formas localizadas y agresivas de periodontitis se asocian con el *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, mientras que las formas crónicas de enfermedad generalizada involucran otras bacterias, se incluyen *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia* (30).

La bacteria altera la homeostasis de la superficie una vez que ha llegado a su hábitat adaptándose al medio para vivir en condiciones de oxidorreducción negativa y produciendo una destrucción continua y agresiva del soporte del diente, llegando a degradar la piel y los tejidos blandos. Esta destrucción dará lugar a síntomas clásicos como el agrandamiento perisulcular, el aumento de la profundidad del surco gingival, la presencia de sangrado y la movilidad gradual que, cuando se combina con la cronicidad de la lesión, puede dar lugar a la pérdida del componente dental (31).

1.1.2.1. *Porphyromonas gingivalis* y su relación con la periodontitis

Porphyromonas gingivalis es un tipo de anaerobio gramnegativo y asacarolítico que se aísla con frecuencia en pacientes con periodontitis, especialmente en adultos. Está reconocido como un patógeno clave en el inicio y la progresión de la enfermedad periodontal. *Porphyromonas gingivalis* tiene la documentación de las bacterias que tiene una mayor profundidad de estudio por su capacidad de causar disbiosis, lo que es importante para comprender la patogenicidad potencial de toda la comunidad microbiana periodontal. También es capaz de invadir localmente los tejidos periodontales y evadir los mecanismos de defensa del huésped, como es el caso de las defensinas (32)(29).

Considerando que su metabolismo asacarolítico, le permitido aprovechar al máximo los nutrientes del medio gracias a que posee esta capacidad. *Porphyromonas gingivalis* destaca por su intensa actividad proteolítica como resultado de la expresión de cisteína-proteasas gingipaínas extracelulares (33).

1.1.2.2. Taxonomía

Con la aplicación de nuevas técnicas de identificación molecular, como la hibridación ADN-ADN, y la investigación de sus características bioquímicas, fue posible identificar un grupo homogéneo de especies derivadas del género *Bacteroides*, ahora conocido como *Porphyromonas*, que en simbiosis es una bacteria que se caracteriza por la disminución de la resistencia sistémica a la infección bacteriana y pueden diferir, llamados *Porphyronomas*, que al inicio se forman por tres especies. *P. endodontales*, *P. gingiviales*, y *P. asaccharolyticus* (34) (35).

Su característica de ser no fermentadora, por la presentación de tipo de especie, para obtener su energía utiliza sustrato al nitrógeno a partir de la peptona y tripticasa. La secuencia de rRNA con sus estudios posteriores de 16Sm, se alejan más del género *Bacteroides* de forma genealógica, actualmente es conocida 12 tipos de especies, habiendo una sacarolítica de la especie *P. Catoniae* (34).

Propuestos de la placa bacteriana Hafajee y Socranski de acuerdo al modelo de colonización pertenecen al complejo rojo, principalmente considerados como tardíos colonizadores, que se relacionan al inicio y progresión de la periodonditis, pero si el paciente presenta una baja prevalencia, éste puede ser aislado. La saliva desempeña un papel crucial en la colonización de este microbio porque la película que forma proporciona puntos de adhesión para las fimbrias, lo que le permite adherirse a las superficies sólidas de la cavidad oral (29).

En el medio ambiente natural, *P. gingivalis* es un constituyente del biofilm multiespecie La bacteria también puede entrar en el epitelio gingival y las células inmunitarias, permanecer viables y capaz de propagarse entre las

células y propagarse sistémicamente a otros tejidos. Varios estudios han demostrado que la *P. gingivalis* está localizada en varios compartimentos subcelulares de las células huéspedes, incluyendo el citoplasma, endosomas y autofagosomas (36).

1.1.2.3. Fisiopatología

P. gingivalis tiene algunos mecanismos de supervivencia que le otorgan la capacidad de evadir la respuesta inmunitaria del huésped. Esta bacteria tiene la capacidad de adherirse a una amplia gama de superficies, entre las que destacan los tejidos dentales duros y mineralizados y las superficies mucosas como la lengua, las mejillas y los labios (37).

P. gingivalis ha evolucionado en respuesta a la amplia gama de superficies que están disponibles para su adhesión, incorporando un repertorio de factores de adaptación, entre los que se encuentran diversas moléculas y estructuras de adhesión que son cruciales para interactuar con el huésped (37)(38).

De acuerdo con los mecanismos de adaptación incorporados en su evolución, *P. gingivalis* cuenta con importantes factores de virulencia, como las adhesinas fimbriales o fimbrias, que participan en la adhesión de la bacteria a diversos soportes y tipos de moléculas orales (36)(37).

P. gingivalis principalmente es considerada un tipo de colonizador secundario, donde crece en la superficie gingival que se transmite por las áreas de las cavidades bucales de las personas infectadas, principalmente a través de la saliva. Su capacidad de adherirse a las superficies, especialmente a través de sus fimbrias peritales de tipo Ib y II, así como de sus células con membrana, hemaglutinina y cápsula, le permite dar el primer paso en la colonización de la superficie. Puede adaptarse e invadir las células epiteliales en unos 20 minutos, replicándose dentro de ellas y extendiéndose a las células de su entorno. Esta capacidad de invadir la célula le da la posibilidad de evitar las defensas del huésped (38).

Además, tienen la capacidad de degradar una variedad de proteínas, incluyendo las que componen el papila gingival, el ligamento periodontal y la cresta

alveolar, además de cambiar la respuesta anfitriona en general. Además de todo esto, existe un componente relacionado con el paciente que, en presencia de esta bacteria, desencadena una serie de respuestas inmunitarias que pueden aumentar el proceso inflamatorio que ya se está produciendo en las encías, acelerando el proceso de destrucción periodontal (39).

Se ha encontrado que *Porphyromona gingivalis* en lugar de transitar por la vía endosómica, transita a las vacuolas de tipo autofagosoma y reside en vacuolas que se asemejan a los autofagosomas tempranos y tardíos, que puede permitir la supervivencia bloqueando la fusión con los lisosomas. El tráfico de bacterias a la vía autofágica permite la protección de la adquisición de nutrientes y los mecanismos de defensa del residente, lo que es especialmente beneficioso para el asacarolítico *P. gingivalis*. Además, las vesículas de la membrana externa producidas por *P. gingivalis* entran en las células humanas a través de una vía endocítica dependiente de la “balsa de lípidos”, se dirigen a las endosomas, y se almacenan en compartimentos lisosómicos. Todos estos datos sugieren que este patógeno tiene la capacidad de invadir las células huésped, que puede ser un mecanismo de escape de las defensas del huésped, favoreciendo la penetración del microorganismo en la corriente sanguínea y por lo tanto actuando sistemáticamente en el cuerpo anfitrión (40).

Las características importantes de la periodontitis mediada por *P. gingivalis* incluyen la capacidad de la bacteria para adherirse e invadir las células huéspedes, se diseminan a través de las células huéspedes y tejidos, y la capacidad de subvertir la vigilancia inmunológica del huésped y mecanismos de defensa. Sin embargo, los determinantes de la virulencia de periodontopatógenos que permiten una eficiente infectividad y promover la sinergia en el aumento de la virulencia aún no están claras (41).

Las gingipainas pueden romperse y degradar el colágeno y la matriz de tejido conectivo bajo condiciones fisiológicas normales. Condiciones de pH y temperatura. Cuando se segregan, pueden destruir los tejidos periodontales, degradar las citoquinas, desactivar los componentes del sistema de complemento del anfitrión, y degradar varios receptores, incluyendo CD14 en

macrófagos y CD4 y CD8 en las células T, inhibiendo así los sistemas de defensa del huésped y facilitando la colonización de *P. gingivalis* (42).

La capacidad de *P. gingivalis* para evadir la respuesta inmune del huésped y obtener los nutrientes está directamente relacionado con su supervivencia, proliferación e infección, y uno de los nutrientes esenciales en el ambiente de acogida es el grupo heme de la proteína hemoglobina. Para adquirir el heme como fuente principal de hierro y protoporfirina IX (PPIX), cepas de *P. gingivalis* han desarrollado sofisticados mecanismos que permiten la absorción de este compuesto. Para adquirir el grupo heme, *P. gingivalis* utiliza hemaglutininas, proteasas (particularmente gingipainas), lipoproteínas y receptores de membrana externa (40).

1.1.2.4. Aislamiento bacteriano

P. gingivalis es una bacteria anaeróbica y específica que se encuentra principalmente en las bolsas periodontales, especialmente en el biofilm subgingival. Por ello, el biofilm subgingival es la fuente de la demostración para su eliminación mediante diversas herramientas, como curetas, cintas y conos de papel. El más popular es el cono de papel número 30 o 40, que se coloca dentro del colgajo o bolsa periodontal durante un periodo de 20 a 60 segundos antes de ser transportado a un vehículo como el Tioglicolato, VMGA-III o BHI (43).

A continuación, se debe untar en medios enriquecidos como el Agar sangre suplementado o el medio antibacteriano selectivo Agar Columbia y se incuba a 37 °C durante 7 a 14 días en condiciones anaeróbicas, lo que puede conseguirse utilizando una Jarra, una cámara o llagas anaeróbicas (31).

La lectura de las colonias en el pasado debe recordar características como su tamaño de 1-2 mm, su forma redonda y convexa, y su pigmentación entre granate y negra. El color de Gram debe ser negativo y mostrar una morfología cocobacilar de 0,5x1-2 um. Para la identificación final se puede utilizar un kit de pruebas bioquímicas específicas, la prueba BANA (Benzoil-DL-Arginina-Naftilamida), pruebas serológicas tipo ELISA y la prueba de fluorescencia-

negativa con UV. El alto porcentaje de especificidad y sensibilidad de las pruebas de biología molecular como la PCR (reacción en cadena de polimerasa) han hecho que sean ampliamente utilizadas en la actualidad (44)

1.2. Antecedentes

Gomes C. et al (2021) Hace especial hincapié en el papel de la propia arcilla, la acción de los metales reducidos situados en la estructura de los minerales arcillosos o externos a ellos como constituyentes de los minerales asociados, y la definición de los mecanismos de acción a partir de los logros encontrados en todos los estudios disponibles que se realizados hasta el momento. El término bactericida se utiliza un mineral de arcilla matan a las bacterias, mientras que el término bacteriostático se utiliza cuando esos minerales detienen el crecimiento y la replicación de las bacterias (67).

Azmi, N. et al (2021) Determinó actividad antibacteriana de las arcillas contra los patógenos de origen alimentario *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. Se llevó a cabo un ensayo de agotamiento de arcillas antibacterianas seleccionadas tras 6 horas de exposición. El cribado reveló que las arcillas Munchong y Carey inhiben significativamente *S. aureus* ($7,63 \text{ mm} \pm 0,48 \text{ mm}$) y la *Salmonella typhimurium* ($11,00 \text{ mm} \pm 0,71 \text{ mm}$), respectivamente. Sus resultados sugieren que la toxicidad de los iones metálicos es responsable de la actividad antibacteriana de estas arcillas (68).

Qin et. al. (2018) La eficiencia de desactivación bacteriana fue del $92 \pm 0,64\%$ cuando se mezcló un efluente de aguas residuales con montmorillonita saturada con Fe^3+ durante 30 min, y se mejoró aún más, hasta $97 \pm 0,61\%$ después de 4 horas. Los resultados del recuento de colonias bacterianas sugirieron que la montmorillonita saturada con Fe^3+ desactivó las bacterias en las aguas residuales a través de dos etapas posibles: la absorción electrostática de las células bacterianas a las superficies de la montmorillonita saturada con Fe^3+ , seguida por la desactivación bacteriana debida al mismo descabalamiento de la membrana celular bacteriana catalizada por la superficie mineral por la superficie absorbida por Fe^{3+} (25).

Ito, Okabe & Mori (2018) Incubó *Microcystis aeruginosa* con muestras de arcilla, donde se observó la tasa de crecimiento durante y después de la fase exponencial tardía, y obtuvo

una disminución en dos tercios. La muestra de arcilla adsorbió el amoníaco y el fósforo a pH neutro. Estos resultados sugieren que la reducción del crecimiento de *Microcystis* se debió a un efecto combinado del silicato y otros compuestos químicos de la muestra de arcilla (45).

Caflish (2018) Este estudio evaluó los efectos de una arcilla recientemente identificada, OMT Blue Arcilla, contra estafilococos, estreptococos, enterobacterias y bacilos gramnegativos no fermentadores. Para el estudio la arcilla y su lixiviado mostraron actividad bactericida contra todas las cepas analizadas, con la excepción de lixiviados contra *S. aureus* IDRL-6169 y los lixiviados contra *S. aureus* USA300. Todas las cepas tratadas con suspensión de arcilla y lixiviados resultaron en un biofilm reducido estadísticamente significativo de población en comparación con los controles, ($p \leq 0.05$) excepto *S. aureus* USA300 y *S. aureus* IDRL-6169 (23).

Zárate (2017) Investigó sobre las propiedades antimicrobianas de una arcilla con aditivos de cuarzo, feldespatos y calcita, así como Fe expuesta u oculta (en capas en las regiones internas). Sobre la base de las curvas de crecimiento (fase logarítmica) de seis bacterias resistentes a los antibióticos (4 gram negativas y 2 gram positivas), se concluyó que la arcilla actuaba como un bacteriostático; sin embargo, la arcilla solo fue activa contra las bacterias gramnegativas (excepto por la *Klebsiella neumonía* resistente). El modo de acción bacteriostático se evidenció por la falta inicial de Unidades Formadoras de Colonias en placas de agar con crecimiento registrado después de 24 h. (46).

Morrison, Williams & Williams (2017) La actividad antibacteriana es mayor en las arcillas que contienen piritita, pero las arcillas blancas que no contienen sulfuro también inhiben crecimiento bacteriano. Cuando las arcillas antibacterianas se rehidratan en agua desionizada (100 mg / ml), el pH (<4.5) impulsa la disolución de minerales y la hidrólisis del metal para producir Fe^{2+} , Al^{3+} y Radicales hidroxilo que matan las bacterias. El pH y Eh de la arcilla hidratada es importante para estabilizar estos reactivos acuosos, por lo tanto, no encontramos ningún efecto antibacteriano cuando los carbonatos o la goetita son estables (9).

Wang et al (2017) Evaluaron el papel de una arcilla con contenido de Fe (II) en la producción de OH a un pH neutro en el proceso antibacteriano. *E. coli*, una bacteria modelo, se expuso a rNAu-2 en suspensión. La actividad antibacteriana de rNAu-2 fue

dependiente de pH y concentración de Fe (II), donde *E. coli* se destruyeron completamente a pH 6, pero sobrevivieron a pH 7 y 8. (21).

Morrison et. al. (2016) Los patógenos denominados ESKAPE (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter* y *Pseudomonas aeruginosa*) causan un número creciente de infecciones nosocomiales. Este estudio informa sobre la actividad antibacteriana de la arcilla Kisameet, un mineral de arcilla natural de la Columbia Británica, Canadá, contra un grupo de cepas ESKAPE resistentes a múltiples fármacos. Los resultados sugieren que esta arcilla natural podría desarrollarse al ser escogida como alternativa de tipo terapéutica, llevando un régimen constante para infecciones graves causados por los mencionados patógenos principales (7).

Sanchez y Erika (2016) Se eligieron cinco colonias de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, respectivamente, de las placas de cultivo. A continuación, se preparó una suspensión en 5 mL de cloruro salino-peptona calentada a 35°C. Se tomaron 100 mg de esta suspensión de aproximadamente 108 UFC/ML y se inyectaron en 5 cubetas, obteniéndose concentraciones de 50, 25, 12, 5 y 6, 25 mg/mL. Concluyo que la arcilla "Chacco" tiene un efecto antibacteriano significativo.(47).

Otto, Kilbourne & Haydel (2016) en su estudio se probaron cuatro arcillas naturales (una arcilla illita, dos arcillas montmorillonita y una arcilla caolinita) y tres arcillas antibacterianas de intercambio iónico para comprobar su actividad antibacteriana in vivo contra las infecciones cutáneas superficiales por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) en ratones. Durante siete días, se aplicó una cataplasma de arcilla hidratada dos veces al día sobre las heridas infectadas, y después se observaron variaciones sustanciales en la actividad antibacteriana in vivo de las distintas arcillas (24).

Adusumilli & Haydel (2016) Evaluó la eficacia in vivo de las arcillas hidratadas aplicadas tópicamente sobre el avance de la úlcera de Buruli en ratones infectados por *M. ulcerans*, así como la actividad antibacteriana de un panel de combinaciones de arcillas y sus lixiviados generados contra *M. ulcerans*. *M. ulcerans* fue susceptible a los efectos bactericidas de las arcillas tras 7, 14, 21 y 28 días de incubación. Además, el crecimiento de *M. ulcerans* in vitro se vio inhibido y afectado bacteriostáticamente por los lixiviados de arcilla (48).

Huacasi (2016) en la investigación que se examinó el impacto de la arcilla hidralgiritita en el crecimiento de *Porphyromona gingivalis* ATCC 33277 en cultivos in vitro utilizando la técnica de dilución en Agar sangre enriquecido, a concentraciones del a 2.5%, 1%, 0.5% 0.25%. A partir de una concentración del 0,5%, la arcilla hidralgiritita tuvo un impacto favorable en el control del crecimiento in vitro (8).

Roque (2016) Para evaluar las propiedades físicas y químicas de las arcillas naturales, se realizó un estudio. Se utilizó el MEB para determinar los componentes químicos de las arcillas de cuatro yacimientos (Azángaro, Tiquillaca, Acora y Asillo) en dos presentaciones (natural y purificada por sedimentación). Los resultados muestran que las propiedades químicas de las arcillas naturales y purificadas difieren entre sí. La conclusión es que la filtración reduce el tamaño de las partículas, pero el pH se mantiene constante (49).

Sohrabnezhad, Rassa & Mohammadi (2016) En este estudio se prepararon haluros de plata en montmorillonita (MMT) por el método de dispersión en oscuridad. AgNO₃ se utilizó como un precursor de plata. Mediante el método de difusión en pozo, se examinó la actividad antibacteriana de los nanocompuestos contra bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* y *Micrococcus luteus*, así como contra bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* y *Escherichia coli* son menos resistentes a los agentes antibacterianos en el siguiente orden AgBr-MMT > AgI-MMT > AgCl-MMT(50).

Londono & Williams (2016) Investigaron una arcilla natural de la Amazonía colombiana (AMZ) conocida por los nativos de Uitoto. Comparación de las características físicas y químicas de la arcilla AMZ con materiales de referencia comunes. Se utilizaron microorganismos Gram-negativos (*Escherichia coli* ATCC # 25922) y Gram-positivos (*Bacillus subtilis* ATCC # 6633). Los resultados muestran que un único tratamiento con 250 mg/ml de arcilla AMZ provocó una disminución de 4 a 6 veces de la viabilidad bacteriana. (12).

Maryan & Montzaer (2015) Evaluaron las actividades antibacterianas de Montmorillonitas naturales, organo-montmorillonita y arcilla mineral, en polvo y formas coloidales, contra *S. aureus* y *E. coli* provenientes de AATCC. Las formas naturales y organo-Montmorillonita en polvo y coloide indicaron buenas actividades antibacterianas.

Además, la cinética de la destrucción de bacterias siguió el modelo de Chick-Watson. La montmorillonita natural indicó una menor citotoxicidad en comparación con las formas modificadas de Montmorillonita(26).

Castillo y Contreras (2015) Se habló de los elementos físico-químicos de la composición del chacco, que presenta la capacidad de adsorber diversas moléculas orgánicas como resultado de su importante superficie exterior y su carga tetraédrica, que le hacen interactuar con sustancias polares como el agua y los venenos. Para prevenir las molestias dispépticas o los síntomas ácido-pépticos, el chacco, una arcilla medicinal comestible, se suspende en agua(51).

Haydel, Remenih, & Williams (2011) Estos autores han comparado los ambientes de deposición, las mineralogías y las químicas de las arcillas que tienen propiedades antibacterianas contra diversas enfermedades humanas, incluidas las resistentes a los antibióticos. Las arcillas antibacterianas naturales contienen illita-esmectita a nano escala (<200 nm), y fases reducidas de hierro. El papel de los minerales de arcilla en el proceso bactericida es amortiguar el pH acuoso y el estado de oxidación a condiciones que promueven la solubilidad de Fe^{2+} (22).

Prapaipong y Poret (2011) Determinaron que las arcillas antibacterianas naturales contienen illita-esmectita, a nanoescala (<200 nm) y fases reducidas de hierro. El papel de los minerales de arcilla en el proceso bactericida es amortiguar el pH acuoso y el estado de oxidación a condiciones que promueven la solubilidad de Fe^{2+} . Los análisis químicos de *E. coli* muertos por lixiviados acuosos de una arcilla antibacteriana muestran que las concentraciones intracelulares de Fe y P están elevadas en relación con los controles.(13).

Williams y Haydel (2010) Evaluaron la aplicación práctica de la arcilla verde francesa rica en esmectita para el tratamiento de la fascitis necrotizante inducida por *Mycobacterium ulcerans*. Para compararlas con las arcillas no antibacterianas, examinaron la composición química y mineralógica de las arcillas antibacterianas. Descubrieron que los lixiviados acuosos de las arcillas eliminan con éxito las bacterias. Llegaron a la conclusión de que el pH de las superficies minerales es clave para controlar la química de la solución y las reacciones relacionadas que ocurren en la pared celular bacteriana(52).



Haydel et al. (2008) Evaluaron dos minerales de arcilla, en cultivos de bacterias patógenas resistentes a los antibióticos. Encontraron que un mineral específico, CsAg02, que demostró actividad bactericida contra *Escherichia coli* patógena, *Pseudomonas aeruginosa* y *Mycobacterium marinum* y un efecto bacteriostático/bactericida combinado contra *S. aureus* resistente a la penicilina (PRSA). La fracción $<0.2 \mu\text{m}$ de CsAg02 y CsAg02 calentada a 200°C o 550°C retuvo la actividad bactericida. Concluyeron que los productos minerales específicos tienen propiedades antibacterianas intrínsecas y termoestables.(22).

CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1. Identificación del problema

La relación entre la salud bucodental y la general es indivisible, y el mantenimiento de una buena higiene bucodental depende de la salud del individuo (53), se ha comprobado que el cepillado regular de los dientes reduce la acumulación de placa y de la gingivitis (54). Una buena higiene bucal ayuda a mantener los dientes y a prevenir la caries, infecciones y lesiones alrededor de los dientes o en la mucosa bucal, especialmente en pacientes comprometidos sistémicamente. Los dientes profundamente dañados, las prótesis dentales sueltas, los objetos extraños y otros problemas con la boca y las membranas mucosas orales suponen un riesgo, especialmente en las siguientes áreas; en pacientes con diabetes, artritis reumatoide, pacientes con cáncer, pacientes que reciben medicamentos esteroideos, o para el tratamiento de la hipoxia (55). En este sentido, las enfermedades bucodentales son un grave problema de salud pública mundial que tiene una gran prevalencia y una influencia perjudicial en las personas a nivel individual, en las comunidades y en la sociedad en su conjunto. Se calcula que entre 3.000 y 5.000 millones de personas en todo el mundo padecen trastornos bucodentales crónicos y avanzados que comienzan en la infancia y se prolongan hasta la adolescencia y la madurez. Debido a sus estrechos vínculos con la posición socioeconómica, así como a las influencias sociales y comerciales, los trastornos bucodentales, en particular las enfermedades periodontales, tienen un impacto desproporcionadamente negativo en los miembros más pobres y marginados de la sociedad (56).

Las enfermedades periodontales tienen las principales causas por un microbiota patógeno en el subgingival biofilm, que incluye *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* y *Porphyromonas gingivalis* que desencadenan respuestas inmunitarias innatas, inflamatorias y adaptativas. Estos procesos resultan en la destrucción de los tejidos que rodean y sostienen a los dientes y eventualmente en la pérdida de tejido blando, hueso y dientes (57), *Porphyromonas gingivalis* inhibe la proliferación e induce la apoptosis de las células epiteliales gingivales humanas (58), las quimiocinas y citoquinas producidas en los tejidos gingivales expuestos a microorganismos como *Porphyromona gingivalis* y sus productos en la placa dental, provocan inflamación local y daño tisular que se observa en la enfermedad periodontal (59), también se encontró presencia de *Porphyromona gingivalis* y *Agregatibacter actinomitencomitans* en muestras de sangre después del cepillado interproximal de piezas dentarias con diagnóstico de periodontitis (60); se reportó un caso extremadamente raro de *Porphyromonas gingivalis* que causa absceso cerebral en un paciente con periodontitis recurrente. El paciente presentaba hemianopsia homónima derecha y hemiparesia derecha. Se realizó un drenaje quirúrgico urgente y se administraron antibióticos. *P. gingivalis* se identificó a partir del cultivo anaeróbico del absceso. El curso clínico del paciente mejoró con la recuperación completa del déficit neurológico (61).

La periodontitis incrementa la movilidad y pérdida de los dientes (62), al igual que en otros microbiomas, los cambios en el ambiente local, pueden incluir mediadores de respuesta inflamatoria o virus, que conspiran para provocar disbiosis y crear una biopelícula que apoye a las especies patógenas propagando enfermedades (63), a su vez, las bacterias periodontopatógenas y los herpesvirus en la periodontitis desarrollan una serie de mecanismos de defensa para evitar o interrumpir las reacciones inmunitarias protectoras del huésped. La respuesta inmunitaria periodontal incluye respuestas celulares y humorales innatas y adaptativas superpuestas que, junto con los microorganismos orales nativos, tienen como objetivo controlar los patógenos invasores (64); Por otro lado, la periodontitis es también la enfermedad inflamatoria crónica más prevalente que se observa en las personas; en el Reino Unido y Estados Unidos, afecta a más de la mitad de los adultos y al 60% de las personas mayores de 65 años (1). Según una investigación epidemiológica de 1990, la prevalencia de la enfermedad periodontal en el Perú era del 85%, según el Ministerio de Salud(65), *Porphyromonas gingivalis* está profundamente

involucrada en la patogénesis de la periodontitis, y recientemente se ha consolidado su papel como un patógeno importante y único, esta bacteria es capaz de desarrollar su virulencia a nivel de la placa dental subgingival (biofilm) y también en el interior de las células gingivales (66) (27).

Las arcillas con metales solubles reducidos y los minerales arcillosos expandibles, que actúan absorbiendo cationes del medio circundante y proporcionan una capacidad de liberación prolongada de metales y de formación de radicales hidroxilos nocivos, son agentes antibacterianos especialmente eficaces (7). La actividad antibacteriana de la montmorillonita saturada con Fe^{3+} se investigó utilizando los efluentes de aguas residuales. Los resultados del recuento de colonias bacterianas sugirieron que la montmorillonita desactivó las bacterias en las aguas residuales a través de dos etapas posibles: la absorción electrostática de las células bacterianas a las superficies de la montmorillonita saturada con Fe^{3+} , seguida por la desactivación bacteriana debido a la ruptura de la membrana celular catalizada por la superficie saturada por Fe^{3+} (25). Además, examinaron la eficacia in vivo de las arcillas hidratadas aplicadas tópicamente sobre la progresión de la úlcera de Buruli en ratones infectados con *M. ulcerans* e investigaron la actividad antibacteriana in vitro de un panel de combinaciones de arcillas y sus lixiviados generados contra *M. ulcerans*. *M. ulcerans* fue susceptible a los efectos bactericidas de las arcillas tras 7, 14, 21 y 28 días de incubación. Además, *M. ulcerans* in vitro fue inhibido y afectado bacteriostáticamente por los lixiviados de arcilla (48). En ese sentido se evaluará el efecto in vitro de una arcilla nativa conocida como “Chacco”, en su forma natural, en cepas autóctonas de *Porphyromonas gingivalis* aisladas de pacientes con periodontitis y también en cepas estandarizadas de la ATCC®.

2.2. Enunciados del problema

a. Problema general

- ¿Cuál es el efecto de la arcilla *Chacco*, variedades Azángaro y Ácora, en el crecimiento de cepas nativas y estandarizadas de *Porphyromona gingivalis*?

2.3. Justificación

La razón principal para realizar este estudio es que existen escasos estudios similares y comparables que se hayan establecido en nuestro entorno sobre la interacción de las

variables investigadas, y existen pocos antecedentes de investigación destacables que utilicen metodologías actuales y especializadas.

También es conocido el uso tradicional que se ha dado a la arcilla *Chacco* en el tratamiento de algunas dolencias en el ser humano, sin embargo, es necesario investigar sobre un soporte científico que pueda justificar su adecuado uso en las personas.

El tratamiento de la Periodontitis es complejo, ya que involucra la participación activa del paciente en el cuidado de su higiene oral aplicando una correcta técnica de cepillado dental y el uso de elementos coadyuvantes como las pastas dentales y enjuagues bucales, es ahí que el uso de la arcilla *Chacco* podría tener una aplicación clínica, sin embargo, es necesario previamente realizar estudios in vitro que justifiquen posteriores aplicaciones de esa naturaleza.

Dado que los componentes del estudio, las herramientas de laboratorio y los empleados formados para su correcta manipulación están asegurados en cantidad y calidad para el avance del presente trabajo, también se ha tenido en cuenta la viabilidad del estudio.

2.4. Objetivos

2.4.1. Objetivo general

- Determinar el efecto antibacteriano de la arcilla *Chacco*, variedades Azángaro y Ácora, en el crecimiento de cepas nativas y estandarizadas de *Porphyromonas gingivalis*

2.4.2. Objetivos específicos

- Determinar y comparar el efecto de la arcilla *Chacco* Azángaro al 12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa nativa), utilizando la técnica de dilución en Agar.
- Determinar y comparar el efecto de la arcilla *Chacco* Azángaro al 12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa ATCC® 33277™), utilizando la técnica de dilución en Agar.

- Determinar y comparar el efecto de la arcilla *Chacco* Azángaro al 12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa nativa), utilizando la técnica difusión en Agar (Discos de sensibilidad).
- Determinar y comparar el efecto de la arcilla *Chacco* Azángaro al 12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa ATCC® 33277™), utilizando la técnica difusión en Agar (Discos de sensibilidad).
- Determinar y comparar el efecto de la arcilla *Chacco* Ácora al 12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa nativa), utilizando la técnica de dilución en Agar.
- Determinar y comparar el efecto de la arcilla *Chacco* Ácora al 12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa ATCC® 33277™), utilizando la técnica de dilución en Agar.
- Determinar y comparar el efecto de la arcilla *Chacco* Ácora al 12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa nativa), utilizando la técnica difusión en Agar (Discos de sensibilidad).
- Determinar y comparar el efecto de la arcilla *Chacco* Ácora al 12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa ATCC® 33277™), utilizando la técnica difusión en Agar (Discos de sensibilidad).

2.5. Hipótesis

2.5.1. Hipótesis general

- Ha. La arcilla *Chacco*, variedades Acora y Azángaro, tienen efecto inhibitorio en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis*.

- Ho: La arcilla *Chacco*, variedades *Acora* y *Azángaro*, no tienen efecto inhibitorio en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis*.

2.5.2. Hipótesis específicas

- La arcilla *Chacco Azángaro* a 12,5mg/ml, 25mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración tiene efecto inhibitorio en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa nativa) utilizando la técnica de dilución en Agar, teniendo un mejor efecto en las concentraciones de 12,5mg/ml y 50mg/ml.
- La arcilla *Chacco Azángaro* a 12,5mg/ml, 25mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración tiene efecto inhibitorio en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa ATCC® 33277™), utilizando la técnica de dilución en Agar, teniendo un mejor efecto en las concentraciones de 12,5mg/ml y 75mg/ml
- La arcilla *Chacco Azángaro* a 12,5mg/ml, 25mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración tiene efecto inhibitorio en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa nativa), utilizando la técnica de difusión en Agar (Discos de sensibilidad), teniendo un mejor efecto a una concentración de 12,5mg/ml.
- La arcilla *Chacco Azángaro* a 12,5mg/ml, 25mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración tiene efecto inhibitorio en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa ATCC® 33277™) utilizando la técnica de difusión en Agar (Discos de sensibilidad), teniendo un mejor comportamiento en las concentraciones de 12,5mg/ml y 25mg/ml.
- La arcilla *Chacco Ácora* a 12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración tiene efecto inhibitorio en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa nativa) utilizando la técnica de dilución en Agar, teniendo un mejor efecto a una concentración de 50mg/ml
- La arcilla *Chacco Ácora* a 12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración tiene efecto inhibitorio en el crecimiento de

Porphyromonas gingivalis (cepa ATCC® 33277™) utilizando la técnica de dilución en Agar, teniendo un mejor efecto a concentraciones de 25mg/ml y 50mg/ml.

- La arcilla *Chacco Ácora* a 12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración tiene efecto inhibitorio en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa nativa) utilizando la técnica difusión en Agar (Discos de sensibilidad), teniendo un mejor efecto a concentraciones de 25mg/ml y 50mg/ml.

- La arcilla *Chacco Ácora* al 12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración tiene efecto inhibitorio en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa ATCC® 33277™) utilizando la técnica difusión en Agar (Discos de sensibilidad).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de estudio

Puno, el quinto departamento más grande del Perú por superficie, está situado en las playas del lago Titicaca, en el extremo sureste del país, entre los 13°00'00" y 17°17'30" de latitud sur y los 71°06'57" y 68°48'46" de longitud oeste del meridiano de Greenwich. Limita al norte con la zona de Madre de Dios, al este con el país de Bolivia, al sur con la región de Tacna y al oeste con las regiones de Moquegua, Arequipa y Cusco.

La investigación se llevó a cabo en los laboratorios de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Altiplano, sirviendo de geolocalización las siguientes coordenadas: 15°49'29"S 70°00'56"W.

La importancia de realizar el presente estudio en este lugar se debe a que la arcilla Chacco constituye un recurso natural accesible y de uso frecuente por la población para aliviar varias dolencias y además por la disponibilidad de los recursos y equipamiento necesarios, por otro lado, existe afluencia de pacientes con problemas periodontales.

3.2. Grupos de estudio:

Se incluyeron dos cepas diferentes de *Porphyromonas gingivalis*, una procedente de pacientes con periodontitis (cepa nativa) y la otra de cultivos estandarizados (CEPA ATCC® 33277TM) (cepa estandarizada). Se consideraron criterios de inclusión y exclusión.

Se consideraron microorganismos que cumplan los criterios macroscópicos, microscópicos y bioquímicos.

- Microorganismos que satisfacen la contrastación bioquímica.

- Placas de Petri debidamente codificadas y verificadas.

No incluidos en la muestra

- Medios de cultivo que hayan sido contaminados.

- Placas de Petri que modifiquen o dificulten la lectura de los datos.

Tabla 4. Aislamiento e identificación e identificación de *Porphyromonas gingivalis* provenientes de pacientes con diagnóstico de Periodontitis

| Bolsa periodontal | Aislamiento de <i>Porphyromonas gingivalis</i> |
|-------------------|--|
| 1 | negativo |
| 2 | positivo |
| 3 | positivo |
| 4 | negativo |
| 5 | negativo |
| 6 | positivo |

Fuente: Matriz de datos.

La tabla 4 muestra el resultado del cultivo de las muestras del contenido de bolsas periodontales provenientes de pacientes con diagnóstico de periodontitis estadio III, quienes fueron informados y dieron su consentimiento por escrito, así se obtuvo que, de las 6 bolsas periodontales muestreadas, solo en 3 (50%) fue posible aislar *Porphyromonas gingivalis*, en 2(33,33%) de los casos los cultivos mostraron otras especies bacterianas no compatibles con *Porphyromonas gingivalis*, y en 1(16,67%) caso el cultivo resulto contaminado con bacterias aerobias.

Habiéndose caracterizado la bacteria de estudio, de manera aleatoria se procedió a seleccionar una de las placas Petri conteniendo *Porphyromonas gingivalis* (cepa nativa)

para realizar los repiques necesarios y proceder con la aplicación de la arcilla chacco a diferentes concentraciones, así también se procedió con la cepa *Porphyromona gingivalis* 33277TM (cepa estandarizada), obteniéndose las unidades para el análisis

Unidades de análisis:

Estuvo dado por las placas Petri que albergaban las bacterias *Porphyromonas gingivalis*, en su medio de cultivo.

El número de las repeticiones por grupo de estudio fue establecido de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$n = (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 S^2 / (X_1 - X_2)^2$$

Donde:

n = Número de repeticiones para grupo de estudio

$Z_{\alpha/2} = 1,96$ para un $\alpha = 0,05$

$Z_{\beta} = 0,84$ para un $\beta = 0,20$

$S = 0,86(X_1 - X_2)$ Valor asumido.

Resultando: $n = 12$

Significa que, en cada grupo de estudio se consideraron 12 repeticiones para cada grupo de estudio.

Tabla 5. Conformación de los grupos experimentales

| | | | 100mg/ml | 75mg/ml | 50mg/ml | 25mg/ml | 12.50mg/ml | |
|---------------------|---------------------|----------------|----------------|---------------|---------|---------|------------|----|
| Dilución en agar | Chacco | CEPA NATIVA | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | |
| | | Azángaro | CEPA ATTCC | 12 | 12 | 12 | 12 | |
| | Chacco | CEPA NATIVA | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | |
| | | Acora | CEPA ATTCC | 12 | 12 | 12 | 12 | |
| | Difusión en agar | Chacco | CEPA NATIVA | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| | | | Azángaro | CEPA ATTCC | 12 | 12 | 12 | 12 |
| Chacco | | CEPA NATIVA | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | |
| | | Acora | CEPA ATTCC | 12 | 12 | 12 | 12 | |

Fuente: Matriz de datos.

Se evidencia en la tabla 5 el número de repeticiones y distribución de unidades de análisis para los grupos experimentales de acuerdo a las concentraciones de arcilla chacco, para la técnica de cultivo dilución en agar se utilizaron 12 placas Petri para cada concentración de arcilla chacco, así también se utilizaron 12 placas Petri como control positivo, para cual se aplicó al 0,12% de Clorhexidina y 12 placas Petri para realizar un negativo control donde únicamente se preparó el medio de cultivo.

Con respecto a la técnica de cultivo difusión en agar fueron utilizadas 4 placas Petri para cada concentración de arcilla Chacco, se instalaron 3 discos de sensibilidad en cada placa Petri, obteniendo finalmente 12 discos de sensibilidad por cada concentración de arcilla Chacco, de la misma manera se utilizaron 12 discos de sensibilidad impregnados al 0.12% de Clorhexidina como control positivo y 12 discos de sensibilidad impregnados en suero fisiológico como control negativo.

Se aislaron cepas nativas de la bacteria *Porphyromonas gingivalis* a partir de muestras de bolsas periodontales no menores a 5mm. *Porphyromonas gingivalis* que son cepas estandarizadas siendo obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC 33277TM)

Se aplicó dos técnicas de crecimiento bacteriano: dilución en agar y discos de sensibilidad (difusión en agar) utilizando 2 variedades de arcilla Chacco, a diferentes concentraciones, 12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml y 100mg/ml

3.3. Método de investigación

Método: Se utilizó el método deductivo, la observación, estudio experimental in vitro, tipo de investigación cuantitativa, nivel relacional, de corte transversal.

Técnica: Observación estructurada.

3.4. Descripción detallada de métodos por objetivos específicos

Realizar el aislamiento y la identificación de Porphyromonas gingivalis a partir de muestras de bolsas periodontales no menores a 5mm, provenientes de pacientes con diagnóstico de Periodontitis.

Procedimientos para la obtención de Cepas Nativas:

- En el presente estudio se recolectaron muestras de placa subgingival de 06 pacientes previamente seleccionados con diagnóstico de periodontitis estadio III, la periodontitis se consideraba generalizada cuando estaba presente en el 30% o más de los lugares examinados. La pérdida de hueso alveolar se evaluó con radiografías periapicales obtenidas con técnica de paralelismo y posicionador de cono. Una vez seleccionados los pacientes, se procedió a explicar el protocolo de investigación y se solicitó la participación voluntaria en el estudio, firmando un documento de consentimiento informado.
- Los pacientes no tenían antecedentes de trastornos sistémicos y presentaban síntomas clínicos de inflamación relacionada con la periodontitis, como sangrado

durante el sondeo, enrojecimiento del periodonto protector, edema y una bolsa periodontal con pérdida de inserción y dientes móviles.

- Se muestrearon 06 bolsas periodontales con profundidades mayor o igual a 5mm. Previamente se obtuvieron registros clínicos y se midieron seis sitios por diente con sondas OMS (Hu-Friedy Corp., Chicago IL, EE.UU.). No se incluyeron pacientes con tratamiento periodontal previo, aquellos con medicación antibiótica dentro de los últimos 6 meses, pacientes con enfermedades sistémicas y pacientes que estuviesen usando colutorios.
- Toma de muestras de placa dental subgingival: La muestra se tomó según el protocolo de Ramos; se eligieron los dientes para la toma de muestras, se realizó el aislamiento relativo con hisopos de algodón estériles, se eliminó cuidadosamente la placa supragingival, se secó la zona con una gasa estéril y se obtuvo una muestra biológica del fondo de las bolsas periodontales no menores de 5 mm con conos de papel estéril nº 40. (Maillefer, Suiza), que permanecieron entre 20 a 30 segundos, adicionalmente se realizó un curetaje de la pared blanda de la bolsa periodontal con curetas Gracy estériles (Hu-Friedy Corp., Chicago IL, EE.UU.) (32).
- Las muestras obtenidas fueron llevadas a medios de transporte estéril VMGA-III a una temperatura de 4°C en tubos Eppendorf y luego fueron llevados al laboratorio microbiológico de la Universidad del Altiplano Nacional-Facultad de Medicina de Puno para ser procesado a más tardar tres horas después de la recolección.

Procedimientos para la obtención de Cepas Estandarizadas:

- En esta investigación, nos pusimos en contacto con el laboratorio GenLab del Perú SAC, encargado de la importación de las bacterias, y les suministramos las especificaciones (códigos bacterianos) de *Porphyromonas gingivalis* 33277TM para recibir las cepas estandarizadas de *Porphyromonas gingivalis* (Microbiologics, Minnesota, USA, importadas por Genlab del Perú SAC).
- De acuerdo con las recomendaciones del laboratorio, se almacenaron a -2° después de ser recibidas antes de ser activadas.

- Siguiendo los procedimientos de bioseguridad para evitar la contaminación bacteriana, se añadió la cepa 33277TM de *Porphyromona gingivalis* al contenido de los tubos que contenían una solución tampón proporcionada por el laboratorio Microbiologics, Minnesota, EE.UU., con el fin de activar las bacterias.
- Previamente, se elaboró agar sangre de acuerdo con las recomendaciones del laboratorio Microbiologics, de Minnesota (EE.UU.).

Preparación de Medio de Cultivo

- Medimos lo siguiente en una balanza analítica: 0,8 g de base de agar, 0,04 g de Tripticasa de soja (que representa el 5%), 5% de sangre de cordero estéril, 5 g de hemina/ml y 1 g de vitamina K/ml por cada 20 ml de agua destilada en tubos de ensayo graduados. A continuación, se procedió a colocar los componentes mencionados en 02 matraces Erlenmeyer y se calentaron en una cocina eléctrica
- Los componentes del agar sangre se disolvieron, se autoclavaron a 120°C durante 20 minutos para esterilizarlos y licuarlos, y luego se dejaron enfriar a 45-50°C antes de dispersarlos en placas Petri. Se utilizaron placas de Petri de plástico desechables de tamaño estándar, guardadas y cerradas herméticamente en una bolsa estéril (Diproquim S.A., Lima, Perú).

Siembra de microorganismos

- En el laboratorio las muestras se agitaron en vórtex durante 30 segundos previa a la siembra. Luego se hicieron diluciones seriadas y se sembraron homogéneamente en agar sangre suplementado.
- Se tomó cada placa y se le agregó a la muestra solubilizada una cantidad de 100 ul y esparciendo con un asa de Drigalski de vidrio.
- Se incubaron a 37°C en condiciones de anaerobiosis durante 14 días, y se aislaron aquellos morfológicamente compatibles con *Porphyromonas gingivalis* y se pasaron a una segunda incubación. Basándose en las características

macroscópicas de las colonias y en los resultados de la tinción de Gram, las bacterias se clasificaron primero como cocos grampositivos, cocos gramnegativos, bacilos grampositivos y bacilos gramnegativos.

Identificación de *Porphyromonas gingivalis*.

- Para crear colonias de cepas consistentes, las colonias se multiplicaron en placas de agar sangre durante 14 días en condiciones anaeróbicas. Para caracterizar la estructura morfológica de las bacterias y confirmar la pureza de la cepa, las colonias resultantes se tiñeron con la tinción de Gram. La resiembra se realizó en los casos de contaminación con otras bacterias. Siguiendo las instrucciones del fabricante, las bacterias aisladas y purificadas se identificaron utilizando las galerías del sistema API 20A (BioMérieux, Francia). Las galerías se incubaron anaeróbicamente durante 48 horas a 37 °C.
- Para identificar correctamente las bacterias investigadas, las colonias resultantes se sometieron a procedimientos de tinción de apoyo (tinción de Gram) y a ensayos bioquímicos (catalasa, oxidasa, coagulasa, citrato de Simons, hierro de triple azúcar, urea, lisina, sulfuro, indol, motilidad, nitrato).

Determinar y comparar el efecto de la arcilla Chacco Azángaro al 12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración en el crecimiento de Porphyromonas gingivalis (cepa nativa), utilizando la técnica de difusión en agar (discos de sensibilidad).

Obtención de las muestras de arcilla chacco.

- Para obtener la muestra se registró las características del área donde se realizó el muestreo.
- En Azángaro y Puno se obtuvieron las muestras que fueron provenientes de yacimientos de Archilla de *Chacco* – en el departamento de Puno.
- Se obtuvieron muestras de arcilla *Chacco* provenientes de yacimientos de las provincias de Ácora y Azángaro de la región Puno.

- El muestreo representativo de un lote es esencial para obtener datos válidos. Se muestreó en zigzag y al azar.
- Se utilizó una pala para una recolección superficial (0-10 cm), se homogenizaron bien en una bolsa estéril y obtiene una muestra de unos 200 a 500 gramos.
- Se depositaron las muestras en una bolsa plástica nueva estéril, sellada y rotulada adecuadamente con el fin de evitar confusiones.
- Colocaron las muestras en lugar fresco (cooler) para evitar pérdida de humedad y modificaciones de temperatura y se enviaron a laboratorio lo más pronto posible.

Preparación de soluciones de Arcilla *Chacco*:

- Se realizó el secado a temperatura ambiente por 48 horas, luego se procedió a pesar una muestra de 80 gramos de cada variedad de arcilla y proceder a triturar la muestra utilizando un mortero de laboratorio.
- Una muestra de 50 gramos de cada arcilla triturada se esterilizó a calor húmedo a 120°C por 40 minutos, luego se procedió a diluir en 100 ml de agua bidestilada y llevada a agitador por 15 minutos.
- Luego se procedió preparar las diluciones agregado a cada subgrupo agua bidestilada hasta obtener soluciones con concentraciones de 12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml.

Medición de crecimiento bacteriano mediante técnica de difusión en Agar

- Identificada la bacteria posteriormente se realizó diferentes pruebas de sensibilidad aplicando el método de difusión en Kirby-Bauer (Kirby y Bauer, 1966). Se procedió a realizar un repique a partir de las placas donde previamente se haya observado crecimiento de la bacteria en estudio, Inoculación de cantidades estandarizadas de microorganismos en solución salina (0,5 en la escala de McFarland). A los 15 minutos de la preparación, los inóculos se sembraron con hisopos estériles utilizando agar sangre enriquecido.

- Para garantizar una buena distribución uniforme del inóculo y que las zonas de inhibición sean uniformemente circulares, la siembra se realizó por agotamiento en tres direcciones. Después de cinco minutos, se utilizaron pinzas estériles para instalar discos de sensibilidad de tamaño estándar (6 mm de diámetro) impregnados con concentraciones conocidas de arcilla *Chacco* Azángaro y Ácora (12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml% y 100mg/ml). Para los controles se utilizaron Clorhexidina al 0,12% y suero fisiológico.
- Las placas que contenían ambas cepas de *Porphyromonas gingivalis* se cultivaron durante 14 días a 37 °C en anaerobiosis al 20% de CO₂. Se midieron los halos de inhibición en mm y se interpretaron de acuerdo con las tablas del NCCLS. Se utilizó la escala de Duraffourd para evaluar la susceptibilidad de los microorganismos a las distintas concentraciones y variedades de arcilla Chacco: Nula de 0 a 8 mm, sensible de 9 a 14 mm, muy sensible de 15 a 19 mm y extremadamente sensible de 20 a más de 20mm.
- Para el análisis de los resultados se aplicaron estadísticas descriptivas e inferenciales. Mediante el programa estadístico SPSS 23 para Windows 10, se utilizaron las pruebas ANOVA y TUKEY para comprobar las hipótesis.
- Se procedió de la misma manera para todos los objetivos donde la técnica de cultivo fue la difusión en Agar.

Determinar y comparar el efecto de la arcilla Chacco Azángaro al 12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración en el crecimiento de Porphyromonas gingivalis (cepa nativa), utilizando la técnica de dilución en Agar.

Medición de crecimiento bacteriano mediante técnica de dilución en Agar

- Identificada la bacteria se procedió a realizar las pruebas de sensibilidad por el método de dilución en Agar, se procedió a realizar repeticiones de los cultivos a partir de las placas donde previamente se haya observado crecimiento de la bacteria en estudio, se inoculó una cantidad estandarizada de bacterias en solución salina (0.5 de la escala de McFarland).

- En la etapa de preparación del cultivo previo a la homogenización y esterilización se adicionó soluciones predeterminadas de arcilla Chacco Azángaro y Ácora (12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml% y 100mg/ml). Para los controles se añadieron volúmenes de Clorhexidina al 0,12% y suero fisiológico.
- Habiéndose obtenido el medio de cultivo Agar sangre suplementado conteniendo la arcilla Chacco en concentraciones preestablecidas, se realizó el repique proveniente de placas donde se había caracterizado la bacteria en estudio, el sembrado se realizó por agotamiento en tres direcciones asegurando una buena distribución uniforme del inóculo.
- Las placas fueron incubadas por 14 días a 37 °C en anaerobiosis de CO₂ al 20% para ambas cepas de *Porphyromonas gingivalis* y se contabilizaron las unidades formadoras de colonias, interpretándolos de acuerdo a las tablas del Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS).
- Para el análisis de los resultados se utilizó estadística descriptiva e inferencial, la prueba de hipótesis se realizó aplicando la prueba de ANOVA y TUKEY, utilizando el programa estadístico SPSS 23 para Windows 10.
- Se procedió de la misma manera para todos los objetivos donde la técnica de cultivo fue la difusión en Agar

Instrumento de recolección de datos: Se utilizó una ficha de recolección de datos, posteriormente se confeccionó una matriz de datos para el procesamiento estadístico. El instrumento se detalla en el Anexo E.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Resultados

4.1.1. Determinar y comparar el efecto de la arcilla *Chacco Azángaro* al 12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa nativa), utilizando la técnica de dilución en Agar.

Tabla 6. Efecto de la arcilla Chacco Azángaro en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa nativa) - técnica de dilución en Agar.

| Concentración | N | Media x10 ⁴ UFC/ml | Desv. Desviación | Desv. Error | IC | |
|---------------|----|----------------------------------|---------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| | | | | | Límite inferior | Límite superior |
| Control (+) | 12 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 100mg/ml | 12 | 2.60 | 0.10 | 0.04 | 2.47 | 2.72 |
| 75mg/ml | 12 | 3.08 | 0.11 | 0.04 | 2.94 | 3.21 |
| 50mg/ml (a) | 12 | 4.01 | 0.07 | 0.03 | 3.91 | 4.10 |
| 25mg/ml | 12 | 4.89 | 0.15 | 0.06 | 4.70 | 5.07 |
| 12.5mg/ml (b) | 12 | 6.07 | 0.14 | 0.06 | 5.89 | 6.24 |
| Control (-) | 12 | 7.38 | 0.10 | 0.04 | 7.24 | 7.51 |

Fuente: Matriz de datos

ANOVA p-valor = 0.000

Se muestra en la tabla N°6 los datos de la aplicación de la arcilla *Chacco* variedad de Azángaro a concentraciones desiguales sobre el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa nativa) utilizando la técnica de cultivo dilución de agar.

A una concentración de 100mg/ml la media fue 2,60 x 10⁴ UFC/ml, a 75mg/ml (3,08 x 10⁴ UFC/ml), 50mg/ml (4,01 x 10⁴ UFC/ml), 25mg/ml (4,89 x 10⁴ UFC/ml) y una

concentración 12,5mg/ml la media fue $6,07 \times 10^4$ UFC/ml. El control positivo (Clorhexidina 0,12%) no presentó crecimiento alguno, mientras que el control negativo presentó una media de $7,37 \times 10^4$ UFC/ml.

De los datos se desprende que la aplicación de arcilla chacco proveniente de Azángaro tiene un efecto inhibitorio en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* provenientes de pacientes con periodontitis, las diferentes gradientes de concentración de la arcilla chacco muestran una tendencia inversamente proporcional al crecimiento de la bacteria, es decir a mayor concentración del estímulo se evidencia un menor crecimiento en el número de unidades formadoras de colonias al aplicar la metodología de dilución en agar. Los datos mostraron una distribución normal, por lo que se aplicó la prueba de ANOVA donde se obtuvo un valor de $p=0.000$ lo que indica que al menos la media de uno de los tratamientos es diferente.

La prueba post hoc de Tukey donde se realizó la comparación y presenta un mejor comportamiento respecto de la media cuando la concentración fue a 50mg/ml y 12.5mg/ml. respectivamente.

Los resultados tienen similitud a los que obtuvo Ito et al. (2018) quienes encontraron diferencias significativas en el crecimiento bacteriano en ausencia y presencia de arcillas naturales como la bentonita que es componente principal de la arcilla *chacco* (47).

Así también Caflish (2018) encontró que la arcilla y su lixiviado acuoso fueron evaluados contra las bacterias en biofilm y estados planctónicos. Para el estudio la arcilla y su lixiviado mostraron actividad bactericida contra todas las cepas analizadas (24).

Sin embargo, Azmi et al. (2021) mostró que la arcilla Carey sin tratar y todas las arcillas Munchong resultaron ineficaces como antibacterianos. Las arcillas modificadas o enriquecidas mostraron mejores resultados, encontrando que la toxicidad de los iones metálicos es responsable de la actividad antibacteriana de estas arcillas (68).

Por lo expuesto aceptamos la hipótesis específica, y señalamos que la bacteria *Porphyromonas gingivalis* es sensible a arcilla Chacco variedad Azángaro.

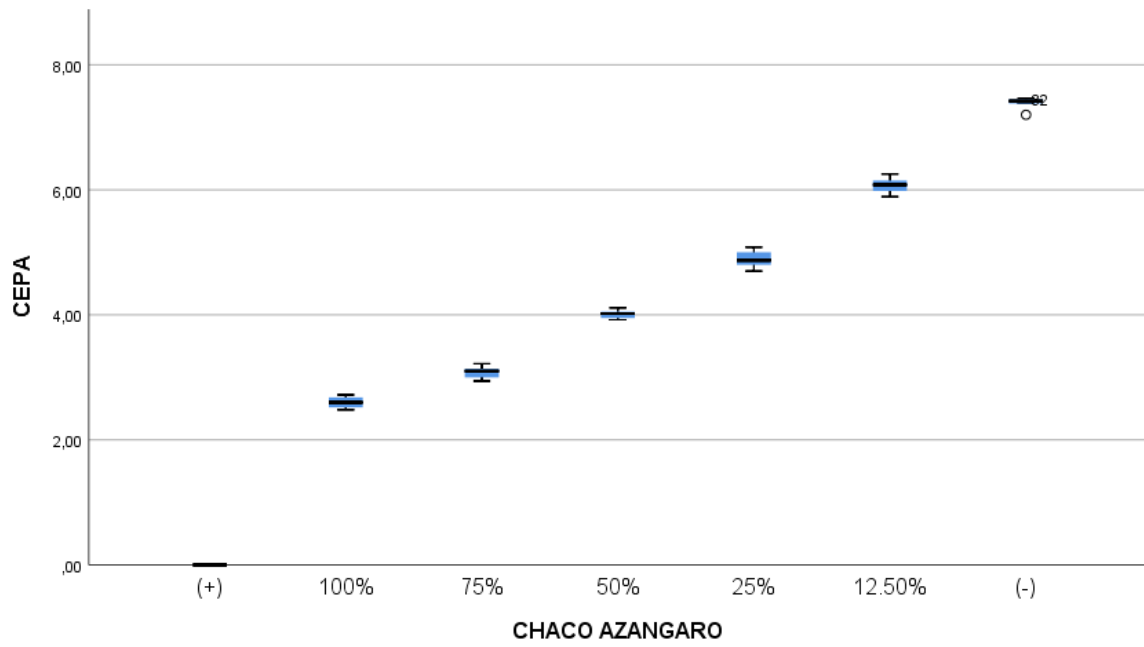


Figura 6. Chacco Azángaro - Ceba Nativa

4.1.2. Determinar y comparar el efecto de la arcilla *Chacco Azángaro* al 12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa ATCC® 33277™), utilizando la técnica de dilución en Agar

Tabla 7. Efecto de la arcilla Chacco Azángaro en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa ATCC® 33277™), utilizando la técnica de dilución en Agar.

| Concentración | N | Media | Desv. Desviación | Desv. Error | IC | |
|-----------------|----|-------|---------------------|-------------|-----------------|-----------------|
| | | | | | Límite inferior | Límite superior |
| Control (+) | 12 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 100 mg/ml | 12 | 2.58 | 0.17 | 0.08 | 2.36 | 2.79 |
| 75 mg/ml (a) | 12 | 3.52 | 0.15 | 0.07 | 3.33 | 3.70 |
| 50 mg/ml | 12 | 4.72 | 0.11 | 0.05 | 4.58 | 4.85 |
| 25 mg/ml | 12 | 5.49 | 0.14 | 0.06 | 5.32 | 5.66 |
| 12.50 mg/ml (b) | 12 | 5.95 | 0.08 | 0.04 | 5.85 | 6.05 |
| Control (-) | 12 | 7.38 | 0.10 | 0.04 | 7.24 | 7.51 |

Fuente: Matriz de datos

ANOVA p= 0.000

Se aprecia en la tabla N°7 los datos de la aplicación de la arcilla *Chacco* de Azángaro en diferentes concentraciones sobre el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa ATCC® 33277™) siguiendo la técnica de cultivo dilución en agar.

A una concentración del 100mg/ml la media fue $2,58 \times 10^4$ UFC/ml, 75mg/ml ($3,52 \times 10^4$ UFC/ml), 50mg/ml ($3,5252 \times 10^4$ UFC/ml), 25mg/ml ($4,7252 \times 10^4$ UFC/ml), y una concentración 12,5mg/ml la media fue $5,95 \times 10^4$ UFC/ml. El control positivo (Clorhexidina 0,12%) no presentó crecimiento, mientras que el control negativo presentó una media de $7,38 \times 10^4$ UFC/ml.

El análisis de los datos señala que el incremento de las gradientes de concentración de la arcilla Chacco proveniente de Azángaro muestran una tendencia inversamente

proporcional al crecimiento de la bacteria, es decir a mayor concentración del estímulo se evidencia una menor cantidad en el número de unidades formadoras de colonias de acuerdo a la metodología de dilución en agar, siendo así, la aplicación de arcilla *Chacco* variedad de Azángaro posee acción inhibitoria en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* en la cepa CTTCC 33277™.

Los datos mostraron una distribución normal, aplicando la prueba ANOVA, se obtuvo un valor de $p=0.000$ y la prueba pos hoc Tukey la cual realizó las comparaciones de las concentraciones, mostró mejores resultados cuando la concentración se dio a 75mg/ml y 12.5mg/ml.

Los resultados coinciden con los hallazgos de Qin et. al. (2018) en referente a la actividad antibacteriana de la montmorillonita saturada (la misma que pertenece al grupo de las arcillas) donde la eficiencia de desactivación bacteriana fue del $92 \pm 0,64\%$ y hasta $97 \pm 0,61\%$ después de 4horas, se propone que la desactivación bacteriana es debida a la ruptura de la membrana celular bacteriana catalizada por la superficie mineral por la superficie absorbida por Fe^{3+} (26).

También se coincide con Márquez (2016) donde obtuvo efectos significativos al utilizar Bentonita conocida comúnmente como *chacco*, con un efecto antibacteriano en el tratamiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 un tipo de cepa, a diferentes concentraciones como 50 mg/mL - 25 mg/mL - 12,5 mg/mL.

Caflish (2018) señala también que el tipo de arcilla denominada OMT Blue Arcilla, contra las bacterias en biofilm y estados planctónicos, han mostrado actividad bactericida contra todas las cepas analizadas, con la excepción de lixiviados contra *S. aureus* IDRL-6169 y los lixiviados contra *S. aureus* USA300. Todas las cepas tratadas con suspensión de arcilla y lixiviados resultaron en un biofilm reducido estadísticamente significativo de población en comparación con los controles. (24)

Por lo expuesto aceptamos la hipótesis específica, y señalamos que *Porphyromonas gingivalis* (CEPA CTTCC 33277™) es sensible a los compuestos que contiene la arcilla *Chacco* variedad Azángaro.

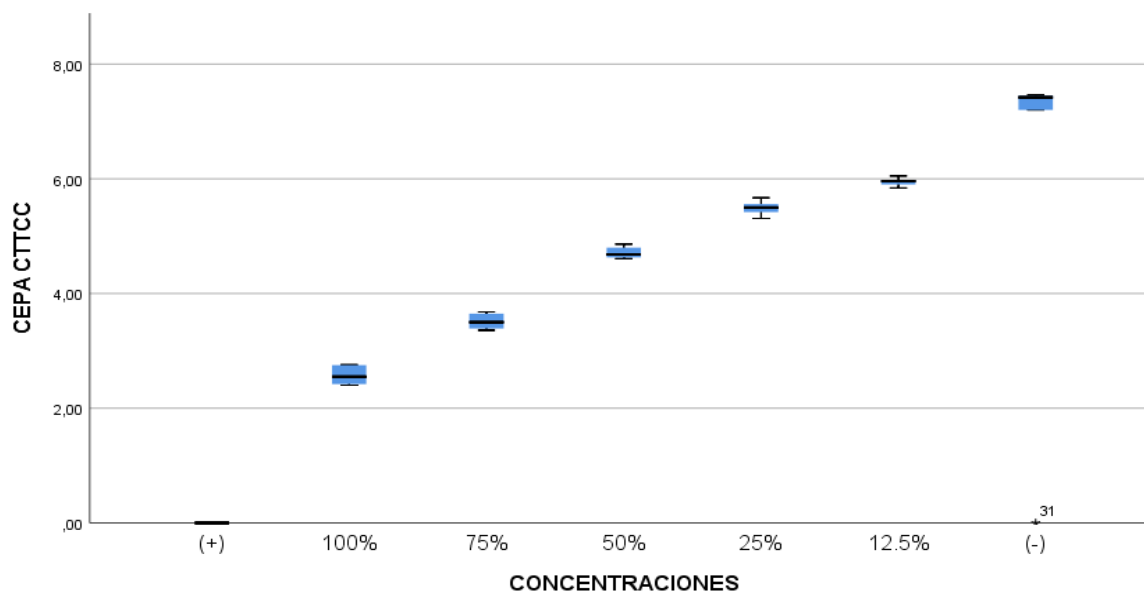


Figura 7. Ceba ATCC® 33277™ de dilución en Agar

4.1.3. Determinar y comparar el efecto de la arcilla *Chacco Azángaro* al 12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa nativa), utilizando la técnica difusión en Agar (Discos de sensibilidad)

Tabla 8. Efecto de la arcilla Chacco Azángaro en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa nativa), utilizando la técnica difusión en Agar (Discos de sensibilidad).

| Concentración | N | Media/mm | Desv. Desviación | Desv. Error | IC | |
|----------------|----|----------|---------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| | | | | | Límite inferior | Límite superior |
| control (-) | 12 | 6 | 0 | 0 | 6 | 6 |
| 12.50mg/ml (a) | 12 | 10.63 | 0.16 | 0.046 | 10.53 | 10.73 |
| 25 mg/ml | 12 | 11.55 | 0.23 | 0.066 | 11.4 | 11.69 |
| 50 mg/ml | 12 | 12.18 | 0.22 | 0.063 | 12.04 | 12.32 |
| 75 mg/ml | 12 | 12.93 | 0.33 | 0.096 | 12.72 | 13.14 |
| 100 mg/ml | 12 | 13.46 | 0.26 | 0.077 | 13.29 | 13.63 |
| control (+) | 12 | 16.89 | 0.48 | 0.138 | 16.59 | 17.2 |

Fuente: Matriz de datos

ANOVA p= 0.000

Se evidencia en la tabla N°8 los resultados de la aplicación de la arcilla *Chacco* variedad de Azángaro en diferentes concentraciones frente al crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa nativa) utilizando la técnica de cultivo difusión en agar (discos de sensibilidad).

A una concentración del 100mg/ml la media del halo de inhibición fue de 13.46mm, 75mg/ml(12.93mm), 50mg/ml(12.18mm), 25mg/ml(11.55mm) y a una concentración de 12,5mg/ml la media fue 10,6mm. El control positivo (Clorhexidina 0,12%) presento una media de 16.89mm de halo de inhibición, mientras en el halo de inhibición no fue presentado en el control negativo manteniendo la medida del diámetro del disco de sensibilidad de 6mm.

Las diferentes concentraciones de la arcilla *chacco* proveniente de Azángaro muestran una tendencia directamente proporcional al diámetro del halo inhibitorio del crecimiento de la bacteria, es decir a mayor concentración del estímulo se evidencia un mayor halo de inhibición en la superficie del medio de cultivo de acuerdo a la metodología de cultivo difusión en agar (discos de sensibilidad), lo que indica que la aplicación de arcilla *Chacco* proveniente de Azángaro en la *Porphyromonas gingivalis* tiene un efecto inhibitorio en el crecimiento de la cepa proveniente de pacientes con periodontitis.

Los datos mostraron una distribución normal, aplicando la prueba de ANOVA donde se obtuvo un valor de $p=0.000$ y la prueba pos hoc Tukey la cual realizó las comparaciones de las concentraciones mostró un mejor efecto a 12mg/ml.

Coincidiendo con Ito, Okabe & Mori (2018) quien aplicó muestras de arcilla natural, donde se observó que la tasa de crecimiento durante y después de la fase exponencial tardía, y obtuvo una disminución en dos tercios en comparación con la de *Microcystis* incubada sin una muestra de arcilla. La muestra de arcilla adsorbió el amoníaco y el fósforo a pH neutro. Estos resultados sugieren que la reducción del crecimiento de *Microcystis* se debió a un efecto combinado del silicato y otros compuestos químicos de la muestra de arcilla (47).

Así también coinciden con Azmi, N. et al (2021) quien determinó la actividad antibacteriana de las arcillas contra los patógenos de origen alimentario *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. Se llevó a cabo un ensayo de agotamiento de arcillas antibacterianas seleccionadas tras 6 horas de exposición. El cribado reveló que las arcillas Munchong y Carey inhiben significativamente *S. aureus* (7,63 mm \pm 0,48 mm) y la *Salmonella typhimurium* (11,00 mm \pm 0,71 mm), respectivamente. Sus resultados sugieren que la toxicidad de los iones metálicos es responsable de la actividad antibacteriana de estas arcillas (68).

Estos resultados se explican, como lo señala Gomes C. et al (2021), por la acción de los metales reducidos situados en la estructura de los minerales arcillosos o externos a ellos como constituyentes de los minerales asociados, y la definición de los mecanismos de acción a partir de los logros encontrados en todos los estudios disponibles que se realizaron hasta el momento (67).

Por lo expuesto aceptamos la hipótesis específica, y señalamos que la bacteria *Porphyromonas gingivalis* es sensible a los compuestos que contiene la arcilla Chacco variedad Azángaro.

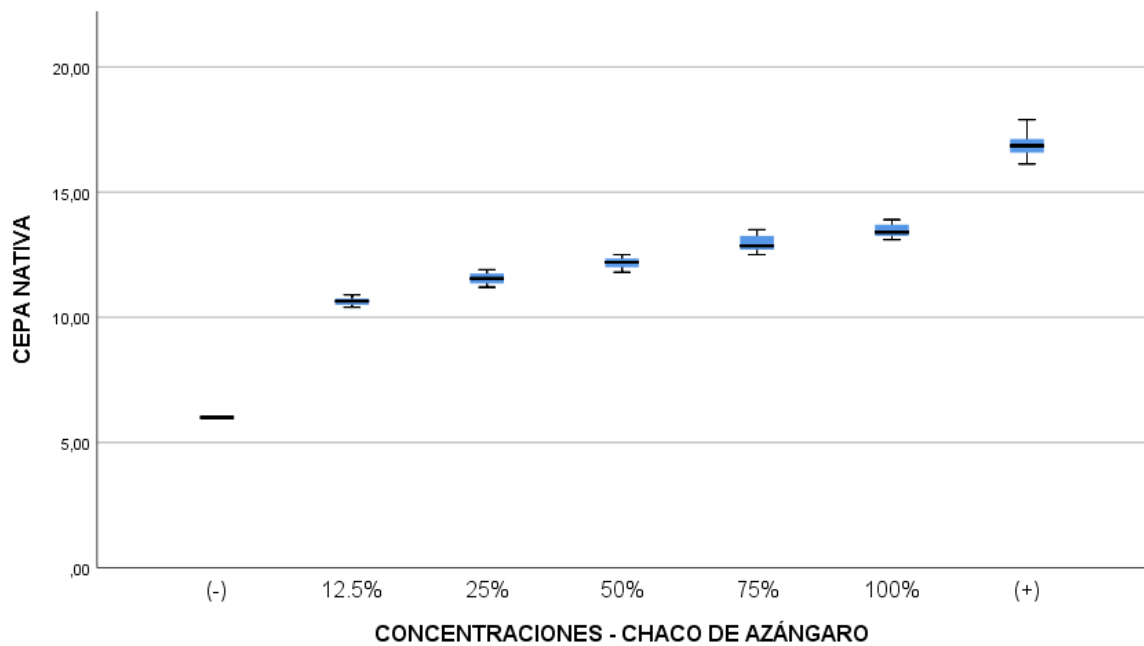


Figura 8. CEPA NATIVA- CHACCO DE AZÁNGARO

4.1.4. Determinar y comparar el efecto de la arcilla *Chacco Azángaro* al 12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa ATCC® 33277™), utilizando la técnica difusión en Agar (Discos de sensibilidad)

Tabla 9. Efecto de la arcilla Chacco Azángaro crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa ATCC® 33277™), utilizando la técnica difusión en Agar (Discos de sensibilidad).

| Concentración | N | Media | IC | | | | Mínimo | Máximo |
|----------------|----|-------|------------------|-------------|-----------------|-----------------|--------|--------|
| | | | Desv. Desviación | Desv. Error | Límite inferior | Límite superior | | |
| control (-) | 12 | 6.00 | 0.00 | 0.00 | 6.00 | 6.00 | 6.00 | 6.00 |
| 12.50mg/ml (b) | 12 | 11.50 | 0.21 | 0.06 | 11.36 | 11.63 | 11.20 | 11.80 |
| 25mg/ml (a) | 12 | 11.60 | 0.14 | 0.04 | 11.51 | 11.68 | 11.40 | 11.80 |
| 50mg/ml | 12 | 12.40 | 0.14 | 0.040 | 12.31 | 12.48 | 12.20 | 12.60 |
| 75mg/ml | 12 | 13.45 | 0.25 | 0.07 | 13.29 | 13.61 | 13.10 | 13.90 |
| 100mg/ml | 12 | 14.10 | 0.35 | 0.10 | 13.88 | 14.33 | 13.60 | 14.60 |
| control (+) | 12 | 16.91 | 0.38 | 0.11 | 16.66 | 17.15 | 16.34 | 17.54 |

Fuente: Matriz de datos

ANOVA $p=0.000$

Se evidencia en la tabla N° 9 los datos de la aplicación de la arcilla *Chacco* variedad de Azángaro, en diferentes concentraciones, sobre el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* cepa ATCC® 33277™ en la técnica de cultivo difusión de agar en discos de sensibilidad.

A una concentración del 100mg/ml la media fue 14.10mm, 75mg/ml(13,45mm), 50mg/ml(12,40mm), 25mg/ml(11,60mm) y a una concentración 12,5mg/ml la media fue 11,50mm. El control positivo (Clorhexinina 0,12%) presento un halo de crecimiento con una media de 16.91mm, mientras no se presentó halo de inhibición al utilizar el control negativo manteniendo la medida del diámetro del disco de sensibilidad de 6mm.

El incremento en las concentraciones de la arcilla *chacco* proveniente de Azángaro muestran una tendencia directamente proporcional al diámetro del halo de inhibición en el crecimiento de la bacteria, es decir a mayor concentración del estímulo se evidencia un mayor halo de inhibición en la superficie del medio de cultivo de acuerdo a la metodología de cultivo difusión en agar (discos de sensibilidad), lo que indica que la aplicación de arcilla *Chacco* proveniente de Azángaro en cultivos de *Porphyromonas gingivalis* muestra un efecto inhibitorio para el crecimiento de la cepa ATCC.

Los datos mostraron una distribución normal, aplicando la denominada prueba de ANOVA donde se obtuvo un valor de $p=0.000$ y la prueba pos hoc Tukey la cual realizó las comparaciones de las concentraciones y presentaron relación estadísticamente significativa en las concentraciones de 12.5mg/ml y 25mg/ml.

Coincidiendo con Caflish (2018) menciona que la arcilla y su lixiviado mostraron actividad bactericida contra todas las cepas analizadas, con la excepción de lixiviados contra *S. aureus* IDRL-6169 y los lixiviados contra *S. aureus* USA300. Todas las cepas tratadas con suspensión de arcilla y lixiviados resultaron en un biofilm reducido estadísticamente significativo de población en comparación con los controles, excepto *S. aureus* IDRL-6169 y *S. aureus* USA300 ($p \leq 0.05$) (24)

Coincidiendo con el uso de la arcilla, pero difiriendo de la técnica con Turpo (2018) se utilizó Arcilla Chacco, pero a diferencia del método de Turpo (2018), que obtuvo resultados por dilución en caldo, estos nuevos datos demuestran que a medida que aumenta la concentración también presenta un mayor halo de inhibición. La Arcilla Chacco tuvo un efecto inhibitorio a bajas concentraciones, como el 7 por ciento, y un efecto bactericida a altas concentraciones, como el 9 y el 10 por ciento.

Por lo expuesto aceptamos la Hipótesis específica, y señalamos que la bacteria *Porphyromonas gingivalis* es sensible a los compuestos que contiene la arcilla chacco variedad Azángaro, aplicando la técnica de discos de sensibilidad.

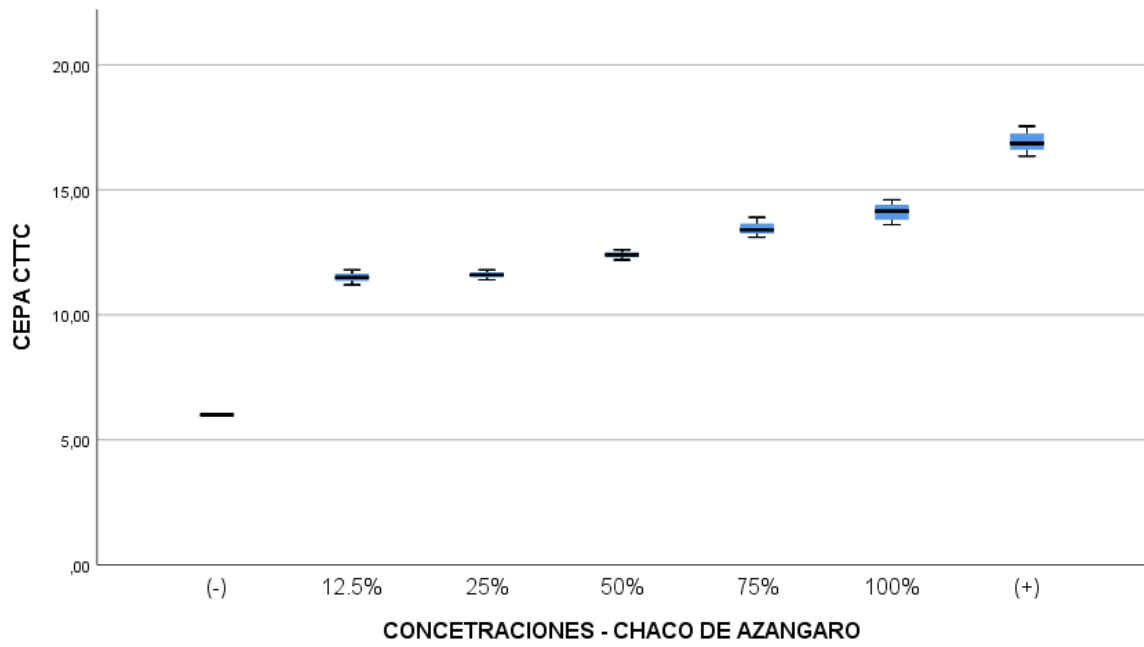


Figura 9. Cepa ATTC - Chacco de Azángaro

4.1.5. Determinar y comparar el efecto de la arcilla *Chacco Ácora* al 12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa nativa), utilizando la técnica de dilución en Agar

Tabla 10. La arcilla Chacco variedad de Ácora en diferentes concentraciones sobre el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa nativa), utilizando la técnica dilución en Agar.

| Concentración | N | Media/ $\times 10^4$ UFC/ml | Desv. Desviación | Desv. Error | IC | |
|---------------|----|--------------------------------|---------------------|-------------|-----------------|-----------------|
| | | | | | Límite inferior | Límite superior |
| Control (+) | 12 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 100mg/ml | 12 | 2.52 | 0.17 | 0.08 | 2.31 | 2.74 |
| 75mg/ml | 12 | 3.02 | 0.09 | 0.04 | 2.91 | 3.13 |
| 50mg/ml (a) | 12 | 3.76 | 0.14 | 0.06 | 3.59 | 3.93 |
| 25mg/ml | 12 | 4.78 | 0.10 | 0.04 | 4.66 | 4.89 |
| 12.50mg/ml | 12 | 5.14 | 0.09 | 0.04 | 5.03 | 5.25 |
| Control (-) | 12 | 7.38 | 0.10 | 0.04 | 7.24 | 7.51 |

Fuente: Matriz de datos

ANOVA $p= 0.000$

Se evidencia en la tabla N° 10 los datos de la aplicación de la arcilla *Chacco* variedad de Ácora en diferentes concentraciones sobre el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa nativa) aplicando la técnica de crecimiento dilución de Agar.

A una concentración del 100mg/ml la media fue $2,52 \times 10^4$ UFC/ml, 75mg/ml($3,02 \times 10^4$ UFC/ml), 50mg/ml($3,75 \times 10^4$ UFC/ml), 25mg/ml($4,78 \times 10^4$ UFC/ml) y una concentración 12,5mg/ml la media fue 5.14×10^4 UFC/ml. utilizando la técnica de cultivo difución en agar. El control positivo (Clorhexidina 0,12%) no presento crecimiento, mientras que el control negativo presento una media de 7.38×10^4 UFC/ml,

De los datos se desprende que la aplicación de arcilla chacco proveniente de Ácora tiene un efecto inhibitorio en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* provenientes de pacientes con periodontitis, las diferentes gradientes de concentración de la arcilla chacco muestran una tendencia inversamente proporcional al crecimiento de la bacteria, es decir a mayor concentración del estímulo se evidencia un menor crecimiento en el número de unidades formadoras de colonias al aplicar la metodología de dilución en agar.

Los datos mostraron una distribución normal, la prueba de ANOVA obtuvo un valor de $p=0.000$ y la prueba pos hoc Tukey la cual se realizó las comparaciones de las concentraciones, presentó diferencia estadísticamente significativa la concentración de 50mg/ml.

Coincidiendo con Zárate (2017) donde la arcilla actuaba como un bacteriostático; sin embargo, la arcilla solo fue activa contra las bacterias gramnegativas (excepto por la *Klebsiella neumonía* resistente). El modo de acción bacteriostático se evidenció por la falta inicial de Unidades Formadoras de Colonias en placas de agar con crecimiento registrado después de 24 h, y puede explicarse debido a las interacciones entre los lipopolisacáridos de membrana y las superficies de siloxano de la arcilla (48).

Así también con Castillo y Contreras (2015) quienes manifiestan que los elementos físico-químicos de la composición del *chacco*, presenta la capacidad de adsorber diversas moléculas orgánicas como resultado de su importante superficie exterior y su carga tetraédrica, que le hacen interactuar con sustancias polares como el agua y otros compuestos. (51). Teran (2021) investigó el *Chacco* (Montchack) como pasta preventiva en la eliminación del biofilm dental, demostrando que el *Chacco* (Montchack) es eficaz en esta capacidad. Según los resultados, todos los pacientes tenían un índice de O'leary inadecuado antes de la intervención.

Por lo expuesto aceptamos la hipótesis específica, y señalamos que la bacteria *Porphyromonas gingivalis* es sensible a los compuestos que contiene la arcilla Chacco variedad Ácora.

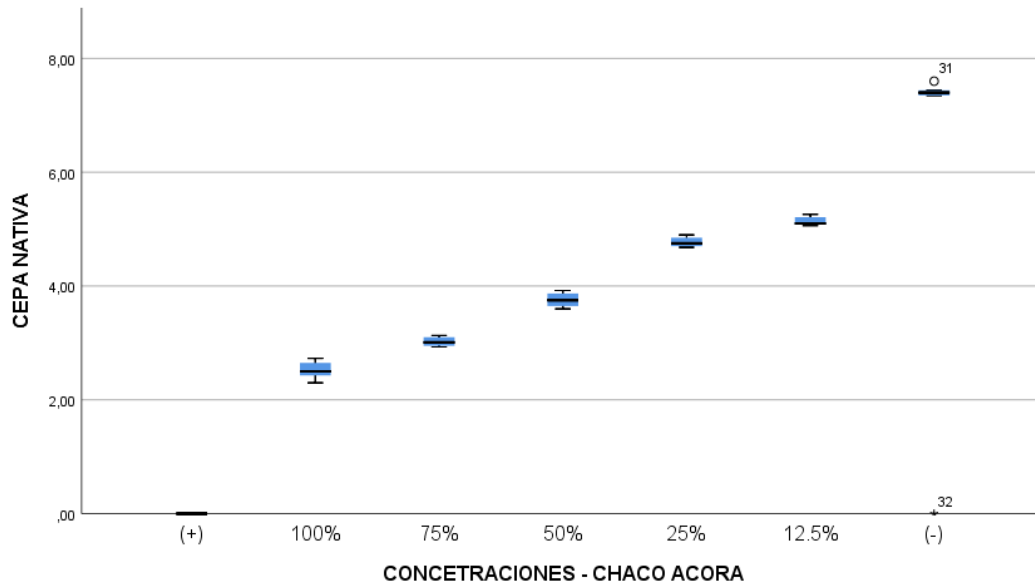


Figura 10. Chacco Acora - dilución en agar

4.1.6. Determinar y comparar el efecto de la arcilla *Chacco Ácora* al 12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa ATCC® 33277™), utilizando la técnica de dilución en Agar.

Tabla 11. Efecto de la arcilla Chacco Ácora en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa ATCC® 33277™), utilizando la técnica de dilución en Agar.

| Concentración | N | Media | Desv. Desviación | Desv. Error | IC | |
|---------------|----|-------|---------------------|-------------|-----------------|-----------------|
| | | | | | Límite inferior | Límite superior |
| Control (+) | 12 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 100mg/ml | 12 | 2.20 | 0.15 | 0.07 | 2.01 | 2.38 |
| 75mg/ml | 12 | 2.86 | 0.14 | 0.06 | 2.69 | 3.03 |
| 50mg/ml (b) | 12 | 3.76 | 0.17 | 0.08 | 3.55 | 3.98 |
| 25mg/ml (a) | 12 | 4.23 | 0.18 | 0.08 | 4.00 | 4.45 |
| 12.50mg/ml | 12 | 4.79 | 0.15 | 0.07 | 4.60 | 4.98 |
| Control (-) | 12 | 7.38 | 0.10 | 0.04 | 7.24 | 7.51 |

Fuente: Matriz de datos

ANOVA p= 0.003

Se evidencia en la tabla N°11 los datos de la aplicación de la arcilla *Chacco* variedad de *Ácora*, en diferentes concentraciones, frente al crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* cepa ATCC® 33277™ respecto de la técnica de crecimiento bacteriano dilución de agar. A una concentración del 100mg/ml la media fue 2.20×10^4 UFC/ml, 75mg/ml(2.86×10^4 UFC/ml), 50mg/ml(3.76×10^4 UFC/ml), 25mg/ml(4.23×10^4 UFC/ml)y una concentración 12,5mg/ml la media fue 4.79×10^4 UFC/ml. utilizando la técnica dilución en agar. El control positivo (Clorhexinina 0,12%) no presento crecimiento, mientras que el control negativo presento una media de 7.38×10^4 UFC/ml.

El análisis de los datos señala que el incremento de las gradientes de concentración de la arcilla Chacco proveniente de Ácora muestran una tendencia inversamente proporcional al crecimiento de la bacteria, es decir a mayor concentración del estímulo se evidencia una menor cantidad en el número de unidades formadoras de colonias de acuerdo a la metodología de dilución en agar, por lo que la aplicación de arcilla *Chacco* variedad de Ácora posee acción inhibitoria en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* en la cepa CTTCC 33277™.

Los datos mostraron una distribución normal, aplicando la prueba de ANOVA donde se obtuvo un valor de $p=0.003$ y la prueba pos hoc Tukey la cual se realizó las comparaciones de las concentraciones, presentando una diferencia estadísticamente significativa las concentraciones de 50mg/ml y 25mg/ml.

Coincidiendo con los hallazgos de Morrison et al. (2017) quienes observaron que las arcillas antibacterianas que se rehidratan en agua desionizada (100 mg / ml), el pH (<4.5) impulsa la disolución de minerales y la hidrólisis del metal para producir Fe^{2+} , Al^{3+} y Radicales hidroxilo que matan las bacterias. El pH y Eh de la arcilla hidratada es importante para estabilizar estos reactivos acuosos, por lo tanto, no encontramos ningún efecto antibacteriano cuando los carbonatos o la goetita son estables. En consecuencia, el efecto antibacteriano disminuye con la profundidad del entierro (metros) donde el Eh es demasiado bajo para impulsar la oxidación de la piritita (10).

Según Rojas (2020) La pasta de dientes de arcilla blanca, salvia y aceite de coco, a veces conocida como pasta de dientes A.S.A., ha demostrado ser beneficiosa para eliminar la placa bacteriana en los jóvenes. Si bien difiere del tipo de investigación, pero concuerda con el uso de la Arcilla para la eliminación de las bacterias coincidiendo como la arcilla tiene efectividad para la eliminación de bacterias. Ya que anteriormente solo se usaba para tratamiento a nivel del sistema digestivo (67).

Por lo expuesto aceptamos la hipótesis específica, y señalamos que la bacteria *Porphyromonas gingivalis* es sensible a los compuestos que contiene la arcilla *Chacco* variedad Ácora.

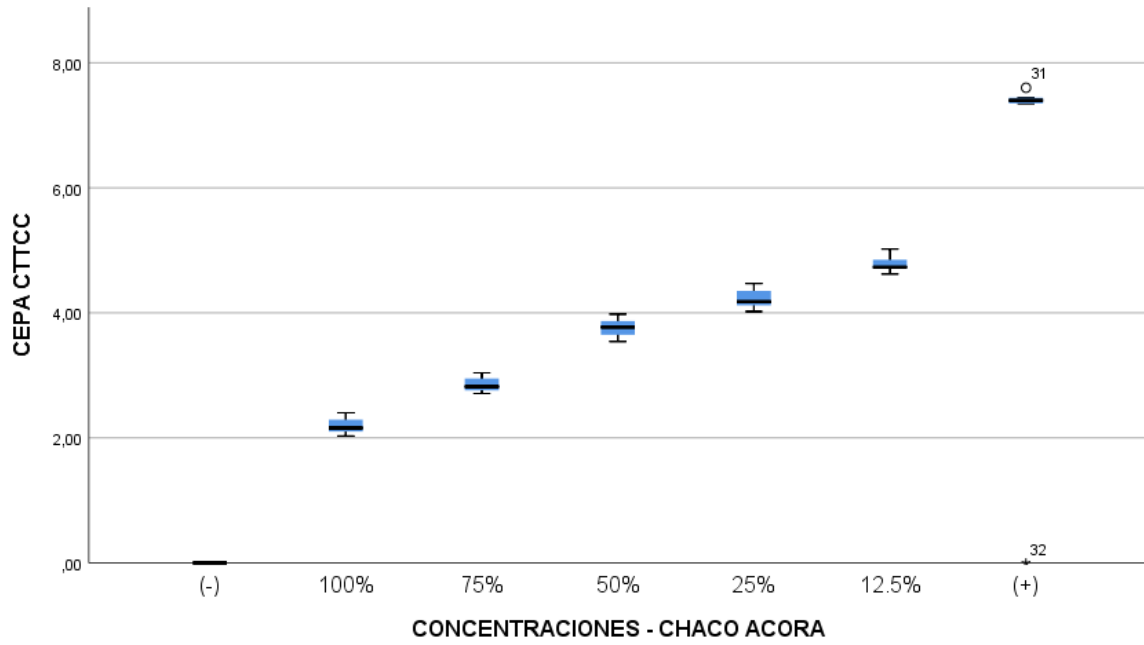


Figura 11. Cepa ATTCC Acora

4.1.7. Determinar y comparar el efecto de la arcilla Chacco Ácora al 12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa nativa), utilizando la técnica difusión en Agar (Discos de sensibilidad)

Tabla 12. Efecto de la arcilla Chacco Ácora en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa nativa), utilizando la técnica difusión en Agar (Discos de sensibilidad).

| Concentración | N | Media | IC | | | | Mínimo | Máximo |
|---------------|----|-------|------------------|-------------|-----------------|-----------------|--------|--------|
| | | | Desv. Desviación | Desv. Error | Límite inferior | Límite superior | | |
| Control (-) | 12 | 6.00 | 0.00 | 0.00 | 6.00 | 6.00 | 6.00 | 6.00 |
| 12.50mg/ml | 12 | 11.45 | 0.19 | 0.05 | 11.33 | 11.58 | 11.20 | 11.90 |
| 25mg/ml (b) | 12 | 11.85 | 0.19 | 0.05 | 11.73 | 11.98 | 11.60 | 12.30 |
| 50mg/ml (a) | 12 | 12.52 | 0.14 | 0.04 | 12.43 | 12.61 | 12.30 | 12.80 |
| 75mg/ml | 12 | 13.22 | 0.14 | 0.04 | 13.13 | 13.31 | 13.00 | 13.50 |
| 100mg/ml | 12 | 14.11 | 0.18 | 0.05 | 14.00 | 14.23 | 13.80 | 14.40 |
| control (+) | 12 | 16.36 | 0.21 | 0.06 | 16.22 | 16.50 | 16.00 | 16.75 |

Fuente: Matriz de datos

ANOVA p= 0.000

La tabla N°12 muestra los datos de la aplicación de la arcilla *Chacco* de Ácora en diferentes concentraciones sobre el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa nativa) aplicando la técnica de cultivo de difusión en agar (discos de sensibilidad).

A una concentración del 100mg/ml la media del halo de inhibición fue 14.1mm, 75mg/ml(13.22mm), 50mg/ml(12.52mm), 25mg/ml(11,85mm) y a una concentración de 12,5mg/ml la media del halo de inhibición fue de 11.54mm. utilizando la técnica difusión en agar. El control positivo (Clorhexinina 0,12%) presento un halo de inhibición con una

media de 16.36mm, mientras que el control negativo no presentó halo de inhibición manteniendo el diámetro del disco de 6mm.

Las diferentes concentraciones de la arcilla *chacco* proveniente de Ácora muestran una tendencia directamente proporcional al diámetro del halo inhibitorio del crecimiento de la bacteria, es decir a mayor concentración del estímulo se evidencia un mayor halo de inhibición en la superficie del medio de cultivo de acuerdo a la metodología de cultivo difusión en agar (discos de sensibilidad), lo que indica que la aplicación de arcilla *Chacco* proveniente de Ácora tiene un efecto inhibitorio en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* en la cepa proveniente de pacientes con periodontitis.

Los datos mostraron una distribución normal, aplicando la prueba de ANOVA donde se obtuvo un valor de $p=0.003$ y la prueba pos hoc Tukey la cual realizó las comparaciones de las concentraciones mostrando diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de 50mg/ml y 25mg/ml.

Coincidiendo con Sanchez y Erika (2016) quienes eligieron cinco colonias de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, respectivamente, de las placas de cultivo. A continuación, se preparó una suspensión en 5 mL de cloruro salino-peptona calentada a 35°C. Se tomaron 100 mg de esta suspensión de aproximadamente 108 UFC/MI y se inyectaron en 5 cubetas, obteniéndose concentraciones de 50, 25, 12, 5 y 6, 25 mg/mL. Concluyo que la arcilla "*Chacco*" tiene un efecto antibacteriano significativo.(47).

Así también con Huacasi (2016) en la investigación que examinó el impacto de la arcilla hidralgiritita en el crecimiento de *Porphyromona gingivalis* ATCC 33277 en cultivos in vitro utilizando la técnica de dilución en Agar sangre enriquecido, a concentraciones del a 2.5%, 1%, 0.5% 0.25%. A partir de una concentración del 0,5%, la arcilla hidralgiritita tuvo un impacto favorable en el control del crecimiento in vitro (8). Y con Cafilish (2018) quién demostró que la arcilla y su lixiviado mostraron actividad bactericida contra todas las cepas analizadas, con la excepción de lixiviados contra *S. aureus* IDRL-6169 y los lixiviados contra *S. aureus* USA300. Todas las cepas tratadas con suspensión de arcilla y lixiviados resultaron en un biofilm reducido estadísticamente significativo de población en comparación con los controles, excepto *S. aureus* IDRL-6169 y *S. aureus* USA300

($p \leq 0.05$) (24). Por lo expuesto aceptamos la hipótesis específica, y señalamos que la bacteria *Porphyromonas gingivalis* es sensible a arcilla Chacco variedad Ácora.

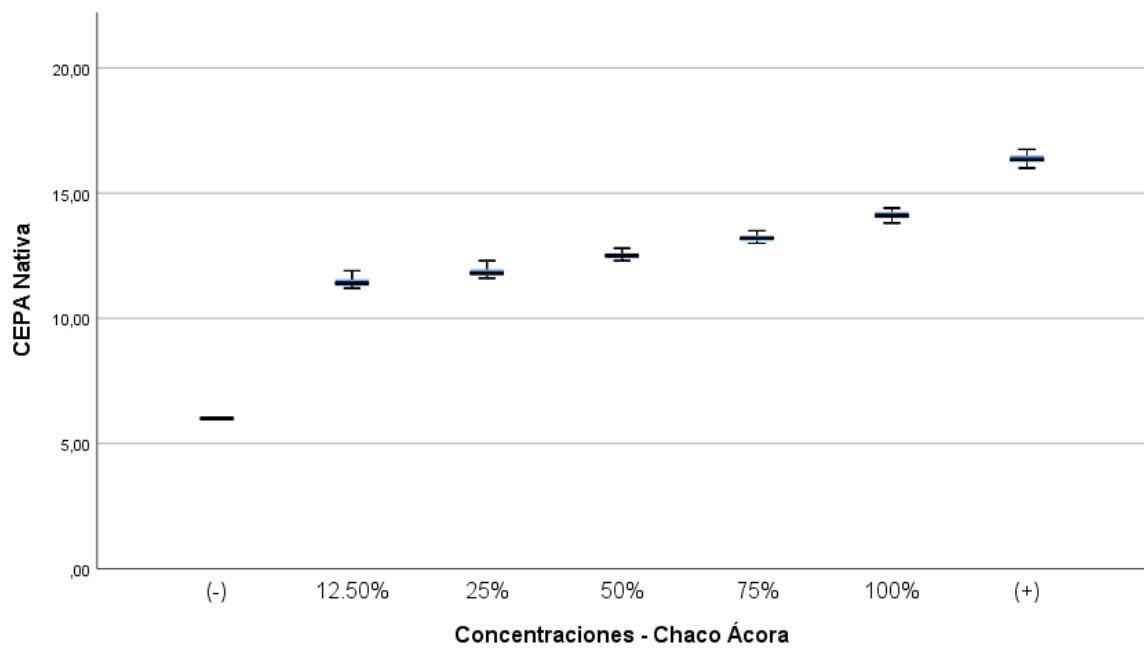


Figura 12. Cepa Nativa-Chacco Acora - Difusión en agar

4.1.8. Determinar y comparar el efecto de la arcilla *Chacco Ácora* al 12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml y 100mg/ml de concentración en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa ATCC® 33277™), utilizando la técnica difusión en Agar (Discos de sensibilidad)

Tabla 13. Efecto de la arcilla *Chacco Ácora* en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (cepa ATCC® 33277™), utilizando la técnica difusión en Agar (Discos de sensibilidad).

| Concentración | N | Media | Desv. Desviación | Desv. Error | IC | | Mínimo | Máximo |
|---------------|----|-------|------------------|-------------|-----------------|-----------------|--------|--------|
| | | | | | Límite inferior | Límite superior | | |
| Control (-) | 12 | 6.00 | 0.00 | 0.00 | 6.00 | 6.00 | 6.00 | 6.00 |
| 12.50mg/ml | 12 | 11.99 | 0.21 | 0.06 | 11.85 | 12.12 | 11.70 | 12.30 |
| 25 mg/ml | 12 | 12.49 | 0.21 | 0.06 | 12.35 | 12.62 | 12.20 | 12.80 |
| 50 mg/ml | 12 | 12.93 | 0.25 | 0.07 | 12.77 | 13.09 | 12.60 | 13.30 |
| 75 mg/ml | 12 | 13.63 | 0.25 | 0.07 | 13.47 | 13.79 | 13.30 | 14.00 |
| 100 mg/ml | 12 | 14.33 | 0.23 | 0.06 | 14.18 | 14.48 | 13.90 | 14.60 |
| control (+) | 12 | 16.75 | 0.17 | 0.05 | 16.63 | 16.86 | 16.40 | 17.00 |

Fuente: Matriz de datos

ANOVA p= 0.000

La tabla N°13 muestra los datos de la aplicación de la arcilla *Chacco* variedad de *Ácora* en diferentes concentraciones sobre el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* cepa ATCC® 33277™ respecto a la técnica de cultivo de difusión de agar (discos de sensibilidad).

A una concentración del 100mg/ml la media del halo inhibitorio fue de 14,33mm, 75mg/ml(13.63mm), 50mg/ml(12.93mm), 25mg/ml (12,49mm) y una concentración 12,5mg/ml la media fue 11,99mm. utilizando la técnica difusión en agar. El control positivo (Clorhexidina 0,12%) presento un halo inhibitorio con una media de 16.75mm,

mientras no presente halo de inhibición al utilizar el control negativo manteniendo 6mm de diámetro correspondiente al disco de sensibilidad.

El incremento en las concentraciones de la arcilla *chacco* proveniente de Ácora muestran una tendencia directamente proporcional al diámetro del halo de inhibición en el crecimiento de la bacteria, es decir a mayor concentración del estímulo se evidencia un mayor halo de inhibición en la superficie del medio de cultivo de acuerdo a la metodología de cultivo difusión en agar (discos de sensibilidad), lo que indica que la aplicación de arcilla *Chacco* proveniente de Ácora tiene un efecto inhibitorio en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* cepa ATCC.

Los datos mostraron una distribución normal, aplicando la prueba de ANOVA donde se obtuvo un valor de $p=0.000$ y la prueba pos hoc Tukey la cual se realizó las comparaciones de las concentraciones y no presentaron una diferencia estadística significativa.

Coincidiendo con los hallazgos de Ito, Okabe & Mori(2018) quienes incubaron *Microcystis aeruginosa* con discos de arcilla, donde se observó la tasa de crecimiento durante y después de la fase exponencial tardía y obtuvo una disminución en dos tercios en comparación con la de *Microcystis* incubada sin discos de arcilla. El disco de arcilla adsorbió el amoníaco y el fósforo a pH neutro. Estos resultados sugieren que la reducción del crecimiento de *Microcystis* se debió a un efecto combinado del silicato y otros compuestos químicos de la arcilla(47). También son similares a Londono & Williams (2016) que investigaron una arcilla natural de la Amazonía colombiana (AMZ) conocida por los nativos de Uitoto. Comparación de las características físicas y químicas de la arcilla AMZ con materiales de referencia comunes. Se utilizaron microorganismos Gram-negativos (*Escherichia coli* ATCC # 25922) y Gram-positivos (*Bacillus subtilis* ATCC # 6633). Los resultados muestran que un único tratamiento con 250 mg/ml de arcilla AMZ provocó una disminución de 4 a 6 veces de la viabilidad bacteriana. (12). Por lo expuesto aceptamos la hipótesis específica, y señalamos que la bacteria *Porphyromonas gingivalis* es sensible a arcilla Chacco variedad Ácora.

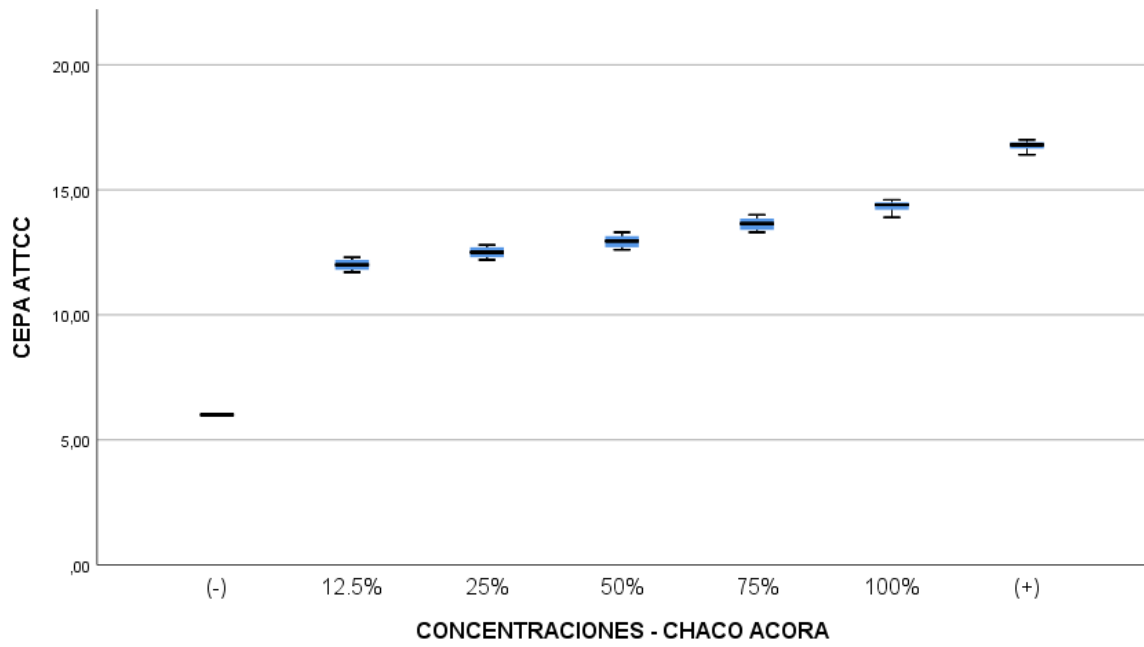


Figura 13. Cepa ATTCC - Chacco Acora

Prueba de Hipótesis

Tabla 14. Comparación de grupos

| | | control (+) | 100mg/ml | 75mg/ml | 50mg/ml | 25mg/ml | 12.50mg/ml | control (-) | | |
|------------------|------------------|-----------------|-------------|---------|---------|---------|------------|-------------|-------|------|
| Dilución en agar | Chacco Azángaro | CEPA NATIVA | 0 | 2.6 | 3.08 | 4.01 | 4.89 | 6.07 | 7.38 | |
| | | CEPA ATTCC | 0 | 2.58 | 3.52 | 4.72 | 5.49 | 5.95 | 7.38 | |
| | Chacco Ácora | CEPA NATIVA | 0 | 2.52 | 3.02 | 3.76 | 4.78 | 5.14 | 7.38 | |
| | | CEPA ATTCC | 0 | 2.20 | 2.86 | 3.76 | 4.23 | 4.79 | 7.38 | |
| | Difusión en agar | Chacco Azángaro | CEPA NATIVA | 16.12 | 13.46 | 12.93 | 12.18 | 11.55 | 10.63 | 6.00 |
| | | | CEPA ATTCC | 16.91 | 14.10 | 13.45 | 12.40 | 11.60 | 11.50 | 6.00 |
| Chacco Ácora | | CEPA NATIVA | 16.36 | 14.11 | 13.22 | 12.52 | 11.85 | 11.45 | 6.00 | |
| | | CEPA ATTCC | 16.75 | 14.33 | 13.63 | 12.93 | 12.49 | 11.99 | 6.00 | |

Fuente: Matriz de datos.

ANOVA $p=0,000$

La inhibición del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* favorece el control de la Periodontitis, y consecuentemente mejora el pronóstico del caso.

Hipótesis Nula: La arcilla Chacco variedad Azángaro no tiene efecto inhibitorio en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis*.

Hipótesis Alterna: La arcilla Chacco variedad Azángaro tiene efecto inhibitorio en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis*.

Estadístico de prueba: Prueba ANOVA

Nivel de significancia: 0,05

p valor: 0,0017

Decisión: Se rechaza la hipótesis nula.

Hipótesis Nula: La arcilla Chacco variedad Ácora no tiene efecto inhibitorio en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis*.

Hipótesis Alterna: La arcilla Chacco variedad Ácora tiene efecto inhibitorio en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis*.

Estadístico de prueba: Prueba ANOVA

Nivel de significancia: 0,05

p valor: 0,0009

Decisión: Se rechaza la hipótesis nula.

Así respecto a la técnica de dilución en agar se observa que *Porphyromonas gingivalis* cepa ATCC® 33277™ presenta mayor sensibilidad a la arcilla Chacco variedad Ácora, debido a que se evidenció un menor crecimiento bacteriano en todas las concentraciones en comparación a *Porphyromonas gingivalis* cepa nativa, dado que ésta tuvo una mejor resistencia al estímulo y un mayor crecimiento, así también se observa que *Porphyromonas gingivalis* cepa ATCC® 33277™ es más sensible a la arcilla Chacco variedad Azángaro en concentraciones de 100mg/ml y 12.5mg/ml, sin embargo no tiene el mismo resultado en concentraciones de 75mg/ml, 50mg/ml y 25 mg/ml, donde resultaron más sensibles *Porphyromonas gingivalis* cepa nativa, es decir aquellas bacterias provenientes de pacientes con diagnóstico de Periodontitis estadio III.

Para la técnica de cultivo bacteriano de dilución en agar, se evidencia un comportamiento más regular en su efecto inhibitorio por parte de la arcilla *Chacco* proveniente de Ácora en comparación a la variedad proveniente de Azángaro, esto se explicaría por el pH que muestra la variedad Ácora que es más ácido en comparación a la variedad Azángaro.

Respecto a la técnica de difusión en agar (discos de sensibilidad) se puede evidenciar que *Porphyromonas gingivalis* cepa ATCC® 33277™ es más sensible que *Porphyromonas gingivalis* cepa nativa, frente a las diferentes concentraciones de arcilla *Chacco*,

independientemente de la variedad, ya que en todos los casos y concentraciones se aprecia que *Porphyromonas gingivalis* cepa nativa muestra un menor diámetro en los halos de inhibición, lo que también implica que la arcilla *Chacco* variedad Ácora muestra un mejor efecto inhibitorio cuando se aplica la técnica de difusión en agar (discos de sensibilidad).

El efecto inhibitorio en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* por parte de la arcilla de Chacco provenientes de Azángaro y Acora, de debe a su estructura molecular, ya que cuando es mezclado con agua manifiesta polaridad, por lo que esta propiedad le permite adsorber y absorber los productos bacterianos y la propia bacteria, además de la liberación de iones que afectan la membrana celular bacteriana, provocando finalmente una afectación importante en el crecimiento bacteriano.

Los resultados muestran consistentemente en ambas técnicas de cultivo, por dilución y difusión en agar, que existe un efecto inhibitorio de la arcilla *Chacco*, variedades Azángaro y Ácora, en el crecimiento de cepas nativas y estandarizadas de *Porphyromona gingivalis*.

Morrison et al. (2016) realizaron hallazgos similares, al descubrir que las arcillas antibacterianas naturales, cuando se hidratan y se aplican tópicamente, matan a los patógenos humanos. Lo hicieron porque el Fe^{2+} provoca la oxidación de la membrana y entra en el citoplasma, donde ataca a las proteínas intracelulares y al ADN con radicales hidroxilos. El Al^{3+} , por su parte, dobla las proteínas de la membrana celular. Al aumentar el daño biomolecular, los óxidos de Fe^{3+} se precipitan por la reacción fatal (8).

Wang et al (2017) menciona que la actividad antibacteriana de rNAu-2 fue dependiente de pH y concentración de Fe (II), donde *E. coli* se destruyeron completamente a pH 6, pero sobrevivieron a pH 7 y 8. Las imágenes in situ revelaron daño de una membrana lipídica, cardiolipina, en la región polar de las células de *E. coli*, y el Fe lábil redox activo se enriqueció. Estos resultados demostraron que el Fe estructural (II) es la fuente principal de OH, que daña la cardiolipina, y desencadena la afluencia de Fe^{2+} soluble en la célula, y en última instancia conduce a la muerte celular(22).

4.2. Discusión

El objetivo del presente estudio es la determinación del efecto inhibitorio de la arcilla *Chacco* en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis*, utilizando dos variedades de arcillas una proveniente de la provincia de Azángaro y otra de la provincia de Ácora, ambos ubicados en la región Puno, aplicando dos técnicas de cultivo bacteriano, dilución en Agar y difusión en Agar (discos de sensibilidad Kirby Bauer con pozos). Morrison en el 2016 plantea que ciertas arcillas tienen propiedades antibacterianas, dado principalmente por la liberación de radicales metálicos y minerales de arcilla que absorben cationes durante su interacción con el agua (7), así también Gomes en 2021 hace hincapié en señalar que la acción de metales reducidos presentes en los minerales arcillosos o en su superficies externas como minerales asociados son los responsables para que las arcillas naturales tengan propiedades bactericidas y bacteriostáticas (67), de manera similar Cancapa en el 2016 señala que a medida que haya un incremento en el pH de suspensiones acuosas de estas arcillas con propiedades bacteriostáticas se tendrá un menor efecto(14), en ese mismo sentido Morrison, Williams & Williams en el 2017 mostraron que la actividad antibacteriana es mayor en las arcillas que contienen pirita, las arcillas blancas que no contienen sulfuro también inhiben el crecimiento bacteriano (9).

Los resultados encontrados en la presente investigación muestran que para la técnica de dilución en Agar, existe una relación inversamente proporcional entre las gradientes de concentración de la arcilla Chacco (12,5 mg/ml , 25 mg/ml, 50mg/ml, 75 mg/ml y 100mg/ml) y la cantidad de unidades formadoras de colonias de *Porphyromonas gingivalis*, sin embargo estos resultados distan de los obtenidos para el control positivo dado por Clorhexidina al 0,12%, cabe señalar que este comportamiento se observo para ambas variedades de arcilla Chacco.

Por otro lado los resultados al aplicar la técnica de cultivo bacteriano de difusión en agar, discos de sensibilidad Kirby Bauer con pozos, señalan que existe una relación directamente proporcional entre las gradientes de concentración de la arcilla Chacco (12,5 mg/ml , 25 mg/ml, 50mg/ml, 75 mg/ml y 100mg/ml) y el diámetro del halo de inhibición en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis*, es decir que a mayor concentración del estímulo se observa un diámetro mayor del halo inhibitorio. En este caso también los resultados alcanzados distan significativamente de los expuestos por Clorhexidina al

0,12%. Destaca, sin embargo, el efecto de la arcilla Ácora que muestra un comportamiento más marcado en la actividad inhibitoria del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis*, esto probablemente al pH ligeramente más ácido en comparación a la variedad Azángaro, que fueron caracterizadas por Roque en el 2016 (49).

No se encontraron antecedentes que vinculen las variables estudiadas, sin embargo, Azmin en 2021 halló que el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 fueron inhibidos significativamente al ser expuestos a lixiviados de arcillas naturales, aplicando la técnica de discos de sensibilidad K-B y sugiere que la toxicidad de los iones metálicos es responsable de la actividad antibacteriana (68). No obstante, Caflish en 2018 evaluó los efectos de la arcilla OMT blue, sobre especies de estafilococos, estreptococos, enterobacterias y bacilo gramnegativos no fermentadores, aplicando arcilla y sus lixiviados, encontrando un biofilm reducido estadísticamente significativo en comparación a los controles, excepto para *Staphylococcus aureus* USA300 y *Staphylococcus aureus* IDRL-6169 (23). Zárate en 2017 investigó las propiedades antibacterianas de una arcilla natural con aditivos de cuarzo, feldespatos y calcita, ricas en Hierro, frente a 6 especies bacterianas 4 gram negativas y 2 gram positivas en curvas de crecimiento de fase logarítmica, encontrando que la arcilla evaluada sólo fue activa en bacterias gram negativas excepto *Klebsella neumonía*, utilizando la técnica de dilución en agar (46). También Quin en el 2018 encontró una desactivación bacteriana del 92 +/- 0,64% cuando mezcló muestras de un afluyente de aguas residuales con lixiviados de Montmorillonita saturadas con Fe+3, en un periodo de 30 minutos. Ito, Okabe & Mori cuando incubaron *Microcystis aeruginosa* con muestras de arcilla ricas en Illita y Montmorillonita, obteniendo una reducción de dos tercios del crecimiento bacteriano (25).

Los antecedentes y sus paralelos con la presente investigación, evidencian aspectos similares en el efecto de la exposición de diversas especies bacterianas a los componentes de las arcillas naturales y saturadas con otros compuestos aplicando diferentes técnicas de cultivo bacteriano, sin embargo tal como manifiestan Gómez, Sánchez, Ocampo & Restrepo en el 2012, que aunque la composición química de las arcillas pueda ser comparable, su composición mineralógica y por tanto sus propiedades químicas y físicas son diversas (47), lo que explicaría el por qué algunas muestras de arcillas son efectivas



frente a una especie en particular y otras aunque de naturaleza similar no muestran ningún efecto. Aspectos puntuales, como el pH, Eh, concentración de radicales libres entre otros, pueden ser determinantes en presencia de microorganismos bacterianos.

Cabe señalar que existieron limitaciones de orden logístico y metodológico en el desarrollo de la presente investigación por el contexto de emergencia sanitaria por COVID-19, debido a las restricciones implementadas por las autoridades de salud.

CONCLUSIONES

- Primero:** La arcilla Chacco variedad Azángaro inhibe el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* cepa nativa, al utilizar la técnica de cultivo dilución en Agar, siendo las concentraciones de 50mg/ml y 12.5mg/ml las que tuvieron un mejor desempeño.
- Segundo:** La arcilla Chacco variedad Azángaro tiene un efecto inhibitorio positivo en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* cepa ATCC® 33277™, utilizando la técnica de cultivo dilución en Agar; Las concentraciones de 75mg/ml y 12.5mg/ml tuvieron un mejor desempeño.
- Tercero:** La arcilla Chacco variedad Azángaro tiene un efecto inhibitorio en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* cepa nativa, utilizando la técnica de discos de sensibilidad. Existiendo un mejor desempeño al 12.5mg/ml.
- Cuarto:** La arcilla Chacco variedad Azángaro tiene un efecto inhibitorio positivo en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™, utilizando la técnica de cultivo difusión en Agar (discos de sensibilidad). Mostrando un mejor desempeño las concentraciones de 25mg/ml y 12.5mg/ml.
- Quinto:** La arcilla Chacco variedad Ácora inhibe el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* cepa nativa, utilizando la técnica de cultivo dilución en Agar. Existiendo un mejor comportamiento a la concentración de 50mg/ml.
- Sexto:** La arcilla Chacco variedad Ácora inhibe el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* cepa ATCC® 33277™, utilizando la técnica de cultivo dilución en Agar. Mostrando mejores efectos a las concentraciones de 50mg/ml y 25mg/ml.
- Septimo:** La arcilla Chacco Ácora, inhibe el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* cepa nativa, utilizando la técnica de cultivo difusión en Agar (discos de sensibilidad). Mostrando mejores efectos a las concentraciones de 50mg/ml y 25mg/ml.
- Octavo:** La arcilla Chacco Ácora, inhibe el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* cepa ATCC® 33277™, utilizando la técnica de cultivo difusión en Agar



(discos de sensibilidad). Las concentraciones no presentaron diferencias significativas.

Noveno: La arcilla Chacco variedades Azángaro y Ácora inhiben el crecimiento de *Porphyromonas* gingivales, en sus cepas nativa y ATCC® 33277™, al aplicar las técnicas de cultivo bacteriano de dilución en agar y difusión en agar, además la arcilla chacco variedad Ácora muestra un mejor efecto que la variedad Azángaro.

RECOMENDACIONES

- Primero:** A los docentes y estudiantes del programa académico de odontología, que realicen estudios in vitro con otras variedades y concentraciones de arcilla de Chacco y su efecto en otro tipo de microorganismos.
- Segundo:** A los docentes y estudiantes del programa de odontología, que realicen estudios y ensayos clínicos con otras variedades y concentraciones de arcilla de Chacco en el tratamiento de enfermedades periodontales.
- Tercero:** A los futuros investigadores, que realicen estudios para evaluar la citotoxicidad de las diferentes variedades de arcilla chacco, en células epiteliales, tejido conectivo y tejido óseo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Carvajal P. Enfermedades periodontales como un problema de salud pública: el desafío del nivel primario de atención en salud. *Rev Clínica Periodoncia, Implantol y Rehabil Oral*. 2016;9(2):177–83. Disponible en: <https://www.scielo.cl/pdf/piro/v9n2/art16.pdf>.
2. Morales A, Bravo J, Baeza M, Werlinger F, Gamonal J. Las enfermedades periodontales como enfermedades crónicas no transmisibles: cambios en los paradigmas. *Rev Clínica Periodoncia, Implantol y Rehabil Oral [Internet]*. 2016;9(3):284. disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0718539116300684>
3. Offenbacher S, Beck JD. Commentary: Changing Paradigms in the Oral Disease–Systemic Disease Relationship. *J Periodontol [Internet]*. 2014;85(6):761–4. Available from: <http://www.joponline.org/doi/10.1902/jop.2014.140115>
4. Botero JE, Bedoya E. Determinantes del Diagnóstico Periodontal. *Rev Clínica Periodoncia, Implantol y Rehabil Oral [Internet]*. 2010;3(2):94–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0718539110700495>
5. Boutaga K, Van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Savelkoul PHM. Periodontal pathogens: A quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005;45(2):191–9, disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1591188>.
6. Sakamoto M, Umeda M, Benno Y. Molecular analysis of human oral microbiota. *J Periodontal Res*. 2005;40(3):277–85, Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15853975/>.
7. Morrison KD, Misra R, Williams LB. Unearthing the Antibacterial Mechanism of Medicinal Clay: A Geochemical Approach to Combating Antibiotic Resistance. *Sci Rep [Internet]*. 2016;6(January):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep19043>
8. Huacasi G. Efecto de la arcilla de Hidralgiritita y de la Clorhexidina en el crecimiento de *Porphyromona gingivalis*, e Identificación Molecular en pacientes

- con Periodontitis Crónica de la Especialidad de Periodoncia e Implantología UCSM. Arequipa, 2016 [Internet]. Universidad Católica de Santa María; 2016. disponible en: <http://tesis.ucsm.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/UCSM/5785/2O.0290.SE.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
9. Morrison KD, Williams SN, Williams LB. The anatomy of an antibacterial clay deposit: A new economic geology. *Econ Geol.* 2017;112(7):1551–70. disponible en: <https://www.segweb.org/pdf/brian-j-skinner-award/2017-morrison-p1551.pdf>
 10. Gómez J, Sánchez J, Ocampo A, Restrepo J. Aplicación de redes neuronales en la clasificación de arcillas. *Rev EIA.* 2012;(17):183–91. disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/eia/n17/n17a14.pdf>.
 11. Ticona W. Caracterización química mineralógica estructural de dos arcillas bolivianas. *Rev Boliv Química.* 2006; Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?scrip=sci_arttext&pid=S0250-54602006000100014.
 12. Londono SC, Williams LB. Unraveling the antibacterial mode of action of a clay from the Colombian Amazon. *Environ Geochem Health.* 2016;38(2):363–79. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10653-015-9723-y>.
 13. Williams LB, Metge DW, Eberl DD. What Makes a Natural Clay Antibacterial? *NIH Public Access.* 2011;45(8):3768–73. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21413758/>.
 14. Cancapa VA. Análisis comparativo del efecto citoprotector y terapéutico de la monoterapia y tratamiento combinado con ch'aqo (silicato de aluminio hidratado) y sangre de grado (croton lechleri), en unidades experimentales inducidas a gastritis aguda, arequipa, 2016. universidad nacional de sanagustin, arequipa-peru; 2016. Disponible en: <https://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/1856>.
 15. García R.E. Arcillas_Comestibles.pdf. *Rev AGRONOTICIAS.* 2007;327–8. Disponible en: https://eprints.ucm.es/id/eprint/13455/1/2007_arcillas_comestibles
 16. Bernal I, Cabezas H, Espitia C, Mojica J, Quintero J. Análisis Próximo de Arcillas

- Para Cerámica. Rev Acad Colomb Cienc [Internet]. 2003;XXVII(105):569–78. Available from: <https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/33343322/7-ANALISIS.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1504828021&Signature=mMJnEp%2B%2BDuJjbsImlrPdCUBD%2Bw%3D&response-content-disposition=inline%3B>
17. Largo D, Villamarin K. Caracterización y activación química de arcilla tipo bentonita para su evaluación en la efectividad de remoción de fenoles presentes en aguas residuales. 2013;55–60. Available from: <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/3838/55361L322.pdf;sequence=1>
 18. Fern EP, Aranibar MJ. La arcilla ch'aqo, conocimiento andino, características físico químicas y su efecto en la productividad de gallinas de postura [Internet]. Vol. 01, Revista Ciencia Animal. 2016. Available from: <http://www.revistaepgunapuno.org/index.php/canibal/article/view/580/150>
 19. Roque L. Caracterización físico – química y grado de conocimiento de los consumidores y comercializadores de las arcillas comestibles (cha'qo) de la región de Puno. repositorio institucional UNA-Puno. Universidad Nacional del Altiplano escuela de posgrado programa de doctorado, doctorado en ciencia, tecnología y medio ambiente; 2016. Disponible en: <https://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/6208/EPG877-00877-01.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
 20. De Almeida J. Obtenção de material antimicrobiano a partir de bentonita nacional tratada com prata [internet]. vol. 60, Universidade Federal de Santa Catarina centro tecnológico departamento de engenharia química. 2010. Disponible en: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/93718/287037.pdf?Sequence=1&isAllowed=y>.
 21. Wang X, Dong H, Zeng Q, Xia Q, Zhang L, Zhou Z. Reduced Iron-Containing Clay Minerals as Antibacterial Agents. Environ Sci Technol. 2017;51(13):7639–47. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.est.7b00726>.
 22. Haydel S, Remenih C, Williams L. Broad Spectrum In- Vitro Antibacterial Activities of clay minerals against Antobiotic- Susceptible Antibiotic Resistant

- bacterial pathogens, NIH Public Access. 2011;61(2):353–61. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2413170/pdf/nihms-48645.pdf>.
23. Caflisch KM, Schmidt-Malan SM, Mandrekar JN, Karau MJ, Nicklas JP, Williams LB, et al. Antibacterial activity of reduced iron clay against pathogenic bacteria associated with wound infections. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2018;52(5):692–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.07.018>
24. Otto CC, Kilbourne J, Haydel SE. Natural and ion-exchanged illite clays reduce bacterial burden and inflammation in cutaneous methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in mice. *J Med Microbiol*. 2016;65(1):19–27. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4756756/>
25. Qin C, Chen C, Shang C, Xia K. Fe³⁺-saturated montmorillonite effectively deactivates bacteria in wastewater. *Sci Total Environ* [Internet]. 2018;622–623:88–95. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.302>
26. Maryan AS, Montazer M. Natural and organo-montmorillonite as antibacterial nanoclays for cotton garment. *J Ind Eng Chem* [Internet]. 2015;22:164–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2014.07.005>
27. How KY, Song KP, Chan KG, Caldwell CC. *Porphyromonas gingivalis*: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Front Microbiol*. National Library of Medicine, 2016;7(February):1–14. Disponible en: <https://>
28. Díaz L. Susceptibilidad de *porphyromonas gingivalis* proveniente de pacientes con periodontitis crónica a los péptidos catiónicos polimixina b y beta defensinas humanas-1, -2, -3, y -4 y el posible papel del lipopolisacárido en su resistencia. [Internet]. Universidad de Chile; 2016. Available from: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/142374/Esteres-de-los-acidos-protocatecuico-y-gentisico-con-tropismo-mitocondrial.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
29. Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: The polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease



- etiology. *Mol Oral Microbiol.* 2012;27(6):409–19. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3653317/>.
30. Badanian A, Bueno L, Papone V. Análisis bacteriano comparativo de cuadros de Periodontitis Crónica y Agresiva en una población muestra de Uruguay. *Odontoestomatología.* 2019;21(33):5–13. Disponible en: http://scielo.edu.uy/scielo.php?scrip=sci_arttex&pid=S1688-93392019000100005
31. Ramos Perfecto D, Moromi Nakata H, Martinez Cadillo E. *Porphyromonas gingivalis*: patógeno predominante en la periodontitis crónica. *Odontol ...* [Internet]. 2011;14(1):34–8. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/odont/article/view/2907>
32. Cugini C, Klepac-Ceraj V, Rackaityte E, Riggs JE, Davey ME. *Porphyromonas gingivalis*: Keeping the pathos out of the biont. *J Oral Microbiol.* 2013;5(2013):1–10. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3617648/>.
33. Jayaprakash K, Khalaf H, Bengtsson T. Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* play a significant role in induction and regulation of CXCL8 in THP-1 cells. *BMC Microbiol.* 2014;14(1):1–9. Disponible en: <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25037882/>.
34. Olsen I, Shah HN, Gharbia SE. Taxonomy and biochemical characteristics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol* 2000. 1999;20(1):14–52. Disponible en: <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10522221/>.
35. Shah HN, Collins MD. Proposal for Reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a New Genus, *Porphyromonas*. *Int J Syst Bacteriol* [Internet]. 1988;38(1):128–31. Disponible en: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-38-1-128>

36. Guyodo H, Meuric V, Le Pottier L, Martin B, Faili A, Pers JO, et al. Colocalization of Porphyromonas gingivalis with CD4+ T cells in periodontal disease. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012;64(2):175–83. Disponible en: <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22066676/>.
37. Ebersole JL, Dawson D, Emecen-Huja P, Nagarajan R, Howard K, Grady ME, et al. The periodontal war: microbes and immunity. *Periodontol* 2000. 2017;75(1):52–115. Disponible en: <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28758303/>.
38. Feng Z, Weinberg A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontol* 2000. 2006;40(1):50–76. Disponible en: <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16398685/>.
39. Falotico, G.; Farias F. El surco gingival aspectos clinicos y anatomofisiomicrobiológicos. *Odous Cient* [Internet]. 2006;VII(2). Available from: <http://servicio.bc.uc.edu.ve/odontologia/revista/v7n2/7-2-3.pdf>
40. Carvalho-Filho P, Meyer R, Olczak T, Xavier MT, Trindade SC. Role of Porphyromonas gingivalis HmuY in Immunopathogenesis of Chronic Periodontitis. *Mediat Inflammation.* 2016;2016. Disponible en: <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27403039/>.
41. Orrego-Cardozo M, Muñoz-Guarín E, Fandiño-Henao V. Porphyromonas gingivalis y enfermedades sistémicas. *CES Odontol* [Internet]. 2015;28(1):57–73. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-971X2015000100006&lng=en&nrm=iso&tlng=es
42. Sochalska M, Potempa J. Manipulation of neutrophils by Porphyromonas gingivalis in the development of periodontitis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7(MAY):1–15. Disponible en: <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PCMC5440471/>.
43. Slots J, Reynolds HS. Long-wave UV light fluorescence for identification of black-pigmented Bacteroides spp. *J Clin Microbiol.* 1982;16(6):1148–51. Disponible en: <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7161378/>.

44. Riep B, Edesi-Neuß L, Claessen F, Skarabis H, Ehmke B, Flemmig TF, et al. Are putative periodontal pathogens reliable diagnostic markers? *J Clin Microbiol.* 2009;47(6):1705–11. Disponible en: <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19386852/>.
45. Ito T, Okabe K, Mori M. Growth reduction of *Microcystis aeruginosa* by clay ball elution solution. *Appl Clay Sci* [Internet]. 2018;162(November 2017):223–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2018.06.018>
46. Zarate-Reyes L, Lopez-Pacheco C, Nieto-Camacho A, Palacios E, Gómez-Vidales V, Kaufhold S, et al. Antibacterial clay against gram-negative antibiotic resistant bacteria. *J Hazard Mater* [Internet]. 2018;342:625–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.08.078>
47. Sanchez M, Erika G. Actividad antibacteriana del “ chacco ” (bentonita) en cepas de *pseudomonas aeruginosa* y *staphylococcus aureus* , LIMA - 2016. 2016; Universidad Alas Peruanas, 2016. Disponible en: <https://civ.uap.edu.pe/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=50334#:~:text=Se%20concluye%20que%20el%20Chacco%20C2%9D%20%28Bentonita%29%20tienen%20un,ATCC%209027%20no%20presenta%20actividad%20inhibitoria%20ni%20bactericida>.
48. Adusumilli S, Haydel SE. In vitro antibacterial activity and in vivo efficacy of hydrated clays on *Mycobacterium ulcerans* growth. *BMC Complement Altern Med* [Internet]. 2016;16(1):1–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s12906-016-1020-5>
49. Roque L. Caracterización físico - química y grado de conocimiento de los consumidores y comercializadores de las arcillas comestibles (cha'qo) de la región de Puno. Repos Inst UNA-PUNO. 2016. Disponible en: <http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/6208/EPG877-00877-01.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
50. Sohrabnezhad S, Rassa M, Mohammadi Dahanesari E. Spectroscopic study of silver halides in montmorillonite and their antibacterial activity. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2016;163:150–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.08.018>

51. Castillo Contreras O, Frisancho Velarde O. El “chacco”: arcilla medicinal comestible del altiplano peruano y sus propiedades en la patología digestiva. *Rev gastroenterol Perú* [Internet]. 2015;35(1):97–9. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292015000100013
52. Williams LB, Haydel SE. Evaluation of the medicinal use of clay minerals as antibacterial agents. *Int Geol Rev.* 2010;52(7–8):745–70. 51. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2904249/>
53. Razak PA, Richard KMJ, Thankachan RP, Hafiz KAA, Kumar KN, Sameer KM. Geriatric Oral Health : A Review Article. 2014;6(August):110–6.. Disponible en: [https://www.ispcd.org/userfiles/rishabh/27_JIOFI_6\(6\)j29_RA.pdf](https://www.ispcd.org/userfiles/rishabh/27_JIOFI_6(6)j29_RA.pdf)
54. Kumar S. Evidence - Based Update on Diagnosis and Management of Gingivitis and Periodontitis. *Dent Clin NA.* 2 018; 51. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30447793/>
55. Andersen BM. Prevention and Control of Infections in Hospitals. *Oral Hyg.* 2019;265–72. Disponible en: https://books.google.com.pe/books/about/Prevention_and_Control_of_Infections_in.html?id=Nh2KDwAAQBAJ&redir_esc=y
56. Peres MA, Macpherson LMD, Weyant RJ, Daly B, Venturelli R, Mathur MR, et al. Series Oral health 1 Oral diseases : a global public health challenge. *Lancet.* 2019;394(10194):249–60.
57. Silva N, Abusleme L, Bravo D, Dutzan N, Garcia-sesnich J, Hernández M, et al. Host response mechanisms in periodontal diseases. *J Appl Oral Sci.* 2015;23(3):329–55. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4510669/>
58. Zhao J, Jiang L, Zhu Y, Feng X. Advances in Medical Sciences Effect of Lactobacillus acidophilus and Porphyromonas gingivalis on proliferation and apoptosis of gingival epithelial cells. *Adv Med Sci.* 2019;64(1):54–7. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1896112618300683>

59. Abhyankar VP, Bates AM, Fischer CL, Johnson GK, Guthmiller JM, Progulske-fox A, et al. Chemokine and cytokine responses of multi-cell cultures treated with *Porphyromonas gingivalis* hemagglutinin B. *Data Br.* 2019;22:964-70. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30740479/>
60. Ambrosio N, Marín MJ, Laguna E, Flerrera D, Sanz M, Figuero E. Detection and quantification of *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in bacteremia induced by interdental brushing in periodontally healthy and periodontitis patients. *Arch Oral Biol.* 2018. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30503977/>
61. Rae J, Taek S, Kim M, Sub C, Ree Y. Anaerobe *Porphyromonas gingivalis* causing brain abscess in patient with recurrent periodontitis. *Anaerobe.* 2016;39:165-7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27085200/>
62. Rajeshwari FIR, Dhamecha D, Jagwani S, Rao M, Jadhav K, Shaikh S, et al. *Journal of Controlled Release. J Control Release.* 2019. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31255689/>
63. Meyle & I Chapple. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000.* 2015;69:7-17. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26252398/>
64. Slots J. Periodontitis : facts, fallacies and the future. *Periodontol 2000.* 2017;75:7— 23. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28758294/>
65. MINSA. Salud Bucal MINSA. Programa de Salud Bucal. 2016. Disponible en: <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/417747/449169276618748992120191106-32001-Is5ebb3.pdf?v=1573077606>
66. Sakanaka A, Takeuchi H, Kuboniwa M, Amano A. Dual lifestyle of *Porphyromonas gingivalis* in bio film and gingival cells. *Microb Pathog.* 2015; 1-6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26456558/>
67. Gomes C. et al trazar una panorámica sobre los conocimientos actuales sobre las arcillas naturales bacteriostáticas y bactericidas. 2021.



68. Azmi, N. et al Actividad antibacteriana de las arcillas contra los patógenos de origen alimentario *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 Y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028: 2021. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27085200/>



ANEXOS

ANEXO A. Pruebas estadísticas

Chacco Azángaro CEPA CTTCC

| Pruebas de normalidad | | | | | | |
|---|---------------------------------|----|-------|------------------|----|-------|
| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro- Wilk | | |
| | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | | |
| CEPA ATTCC | 0.115 | 30 | ,200* | 0.955 | 30 | 0.236 |
| CHACCO AZÁNGARO | 0.139 | 30 | 0.142 | 0.910 | 30 | 0.015 |
| <p>*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.</p> <p>a. Corrección de significación de Lilliefors</p> | | | | | | |

Prueba de ANOVA

| ANOVA | | | | | |
|--------------|----------------------|----|---------------------|-------|-------|
| CEPA CTTCC | | | | | |
| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
| Entre grupos | 47.737 | 5 | 9.547 | 5.208 | 0.002 |

| | | | | | |
|------------------|--------|----|-------|--|--|
| Dentro de grupos | 44.000 | 24 | 1.833 | | |
| Total | 91.736 | 29 | | | |

DIFUSIÓN EN AGAR

CEPA NATIVA

| Correlaciones | | | | |
|--|--------------------|-----------------------------|--------------------|---------------|
| halo de inhibición | | | chacco de Azángaro | CEPAS NATIVAS |
| Rho de Spearman | chacco de Azángaro | Coefficiente de correlación | 1.000 | ,242* |
| | | Sig. (bilateral) | | 0.026 |
| | | N | 84 | 84 |
| | cepas nativa | Coefficiente de correlación | ,242* | 1.000 |
| | | Sig. (bilateral) | 0.026 | |
| | | N | 84 | 84 |
| *. La correlación es significativa en el nivel 0,05 (bilateral). | | | | |

ANOVA

| CEPA NATIVA | | | | | |
|------------------|-------------------|----|------------------|----------|-------|
| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
| Entre grupos | 780.948 | 6 | 130.158 | 1681.076 | 0.000 |
| Dentro de grupos | 5.962 | 77 | 0.077 | | |
| Total | 786.910 | 83 | | | |

DIFUSIÓN EN AGAR

CEPA ACTTC – CHACCO DE AZÁNGARO

| Correlaciones | | | | |
|-----------------|----------|-----------------------------|----------|------------------|
| | | | CEPACTTC | CHACCODEAZANGARO |
| Rho de Spearman | CEPACTTC | Coefficiente de correlación | 1.000 | ,977** |
| | | Sig. (bilateral) | | 0.000 |
| | | N | 84 | 84 |

| | | | | |
|--|------------------|----------------------------|--------|-------|
| | CHACCODEAZANGARO | Coeficiente de correlación | ,977** | 1.000 |
| | | Sig. (bilateral) | 0.000 | |
| | | N | 84 | 84 |
| ** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral). | | | | |

| ANOVA | | | | | |
|------------------|-------------------|----|------------------|----------|-------|
| CEPACTTC | | | | | |
| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
| Entre grupos | 800.671 | 6 | 133.445 | 2227.558 | 0.000 |
| Dentro de grupos | 4.613 | 77 | 0.060 | | |
| Total | 805.284 | 83 | | | |

DILUCIÓN EN AGAR

CHACCO ACORA

| Pruebas de normalidad | | | | | | |
|--|---------------------------------|----|-------|------------------|----|-------|
| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro- Wilk | gl | Sig. |
| | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | | |
| CEPANATIVA | 0.193 | 25 | 0.017 | 0.898 | 25 | 0.016 |
| CHACHOACORA | 0.156 | 25 | 0.120 | 0.893 | 25 | 0.013 |
| a. Corrección de significación de Lilliefors | | | | | | |

| ANOVA | | | | | |
|------------------|-------------------|----|------------------|---------|-------|
| CEPANATIVA | | | | | |
| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
| Entre grupos | 24.905 | 4 | 6.226 | 426.039 | 0.000 |
| Dentro de grupos | 0.292 | 20 | 0.015 | | |
| Total | 25.197 | 24 | | | |

DILUCIÓN DE AGAR

CEPA ATTCC – CHACCO ACORA

| Pruebas de normalidad | | | | | | |
|--|---------------------------------|----|-------|--------------|----|-------|
| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
| | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | |
| CEPA ATTCC | 0.142 | 30 | 0.127 | 0.927 | 30 | 0.042 |
| Chacco Acora | 0.139 | 30 | 0.142 | 0.910 | 30 | 0.015 |
| a. Corrección de significación de Lilliefors | | | | | | |

| ANOVA | | | | |
|------------|--|--|--|--|
| CEPA ATTCC | | | | |

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-------------------|----|------------------|-------|-------|
| Entre grupos | 45.595 | 5 | 9.119 | 4.873 | 0.003 |
| Dentro de grupos | 44.916 | 24 | 1.871 | | |
| Total | 90.511 | 29 | | | |

DIFUSIÓN EN AGAR

CEPA NATIVA – CHACCO ACORA

| Correlaciones | | | | |
|-----------------|--------------|-----------------------------|--------------------|--------------|
| | | | difusioncepanativa | ChaccoAcoras |
| Rho de Spearman | CEPA NATIVA | Coefficiente de correlación | 1.000 | ,989** |
| | | Sig. (bilateral) | | 0.000 |
| | | N | 84 | 84 |
| | Chacco Acora | Coefficiente de correlación | ,989** | 1.000 |
| | | Sig. (bilateral) | 0.000 | |
| | | N | 84 | 84 |

| | | | | | |
|-----|---|--|--|--|--|
| **. | La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral). | | | | |
|-----|---|--|--|--|--|

| ANOVA | | | | | |
|--------------------|-------------------|----|------------------|----------|-------|
| CEPA NATIVA | | | | | |
| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
| Entre grupos | 735.535 | 6 | 122.589 | 4331.043 | 0.000 |
| Dentro de grupos | 2.179 | 77 | 0.028 | | |
| Total | 737.714 | 83 | | | |

DIFUSIÓN EN AGAR

CEPA ATTCC – CHACCO ACORA

| Correlaciones | | | | |
|----------------------|--|--|------------|--------------|
| | | | Cepa ATTCC | Chacco Acora |
| | | | | |

| | | | | |
|---|--------------|----------------------------|--------|--------|
| Rho de Spearman | Cepa ATTCC | Coeficiente de correlación | 1.000 | ,985** |
| | | Sig. (bilateral) | | 0.000 |
| | | N | 84 | 84 |
| | Chacco Acora | Coeficiente de correlación | ,985** | 1.000 |
| | | Sig. (bilateral) | 0.000 | |
| | | N | 84 | 84 |
| **. La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral). | | | | |

| ANOVA | | | | | |
|------------------|-------------------|----|------------------|----------|-------|
| CEPA ATTCC | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
| Entre grupos | 784.247 | 6 | 130.708 | 2918.750 | 0.000 |
| Dentro de grupos | 3.448 | 77 | 0.045 | | |

| | | | | | |
|-------|---------|----|--|--|--|
| Total | 787.695 | 83 | | | |
|-------|---------|----|--|--|--|

| ANOVA | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F |
|----------------------|------------------|-------------------|----|------------------|----------|
| Azángaro cepa nativa | Entre grupos | 780,948 | 6 | 130,158 | 1681,076 |
| | Dentro de grupos | 5,962 | 77 | ,077 | |
| | Total | 786,910 | 83 | | |
| Azángaro cepa CTCC | Entre grupos | 800,671 | 6 | 133,445 | 2227,558 |
| | Dentro de grupos | 4,613 | 77 | ,060 | |
| | Total | 805,284 | 83 | | |
| Acora cepa nativa | Entre grupos | 735,535 | 6 | 122,589 | 4331,043 |
| | Dentro de grupos | 2,179 | 77 | ,028 | |
| | Total | 737,714 | 83 | | |
| Acora cepa CTCC | Entre grupos | 784,247 | 6 | 130,708 | 2918,750 |
| | Dentro de grupos | 3,448 | 77 | ,045 | |
| | Total | 787,695 | 83 | | |

| ANOVA | | |
|----------------------|------------------|------|
| | | Sig. |
| Azángaro cepa nativa | Entre grupos | ,000 |
| | Dentro de grupos | |
| | Total | |

| | | |
|---------------------|------------------|------|
| Azángaro cepa CTTCC | Entre grupos | ,000 |
| | Dentro de grupos | |
| | Total | |
| Acora cepa nativa | Entre grupos | ,000 |
| | Dentro de grupos | |
| | Total | |
| Acora cepa CTTCC | Entre grupos | ,000 |
| | Dentro de grupos | |
| | Total | |

Pruebas post hoc

| Comparaciones múltiples | | | | | | |
|-------------------------|-----------|----------------------------|---------|---------|---------|---------|
| HSD Tukey | | | | | | |
| Variable dependiente | (J) Grupo | Diferencia de medias (I-J) | | | | |
| | | (I) Grupo | | | | |
| | | Control - | 12.5% | 25% | 50% | 75% |
| Azángaro cepa nativa | Control - | | 4,6333* | 5,5500* | 6,1833* | 6,9333* |
| | 12.5% | -4,6333* | | ,9167* | 1,5500* | 2,3000* |
| | 25% | -5,5500* | -,9167* | | ,6333* | 1,3833* |

| | | | | | | |
|---------------------|-----------|-----------|----------|----------|----------|----------|
| | 50% | -6,1833* | -1,5500* | -,6333* | | ,7500* |
| | 75% | -6,9333* | -2,3000* | -1,3833* | -,7500* | |
| | 100% | -7,4667* | -2,8333* | -1,9167* | -1,2833* | -,5333* |
| | Control + | -10,8958* | -6,2625* | -5,3458* | -4,7125* | -3,9625* |
| Azángaro cepa CTTCC | Control - | | 5,5000* | 5,6000* | 6,4000* | 7,4583* |
| | 12.5% | -5,5000* | | ,1000 | ,9000* | 1,9583* |
| | 25% | -5,6000* | -,1000 | | ,8000* | 1,8583* |
| | 50% | -6,4000* | -,9000* | -,8000* | | 1,0583* |
| | 75% | -7,4583* | -1,9583* | -1,8583* | -1,0583* | |
| | 100% | -8,1083* | -2,6083* | -2,5083* | -1,7083* | -,6500* |
| | Control + | -10,9133* | -5,4133* | -5,3133* | -4,5133* | -3,4550* |
| Acora cepa nativa | Control - | | 5,4583* | 5,8583* | 6,5250* | 7,2250* |
| | 12.5% | -5,4583* | | ,4000* | 1,0667* | 1,7667* |
| | 25% | -5,8583* | -,4000* | | ,6667* | 1,3667* |
| | 50% | -6,5250* | -1,0667* | -,6667* | | ,7000* |
| | 75% | -7,2250* | -1,7667* | -1,3667* | -,7000* | |
| | 100% | -8,1167* | -2,6583* | -2,2583* | -1,5917* | -,8917* |
| | Control + | -10,3667* | -4,9083* | -4,5083* | -3,8417* | -3,1417* |
| Acora cepa CTTCC | Control - | | 5,9917* | 6,4917* | 6,9333* | 7,6333* |
| | 12.5% | -5,9917* | | ,5000* | ,9417* | 1,6417* |
| | 25% | -6,4917* | -,5000* | | ,4417* | 1,1417* |
| | 50% | -6,9333* | -,9417* | -,4417* | | ,7000* |

| | | | | | | |
|--|-----------|-----------|----------|----------|----------|----------|
| | 75% | -7,6333* | -1,6417* | -1,1417* | -,7000* | |
| | 100% | -8,3333* | -2,3417* | -1,8417* | -1,4000* | -,7000* |
| | Control + | -10,7508* | -4,7592* | -4,2592* | -3,8175* | -3,1175* |

| Comparaciones múltiples | | | | | | |
|-------------------------|-----------|----------------------------|-----------|-----------|-------|-------|
| HSD Tukey | | | | | | |
| Variable dependiente | (J) Grupo | Diferencia de medias (I-J) | | | | |
| | | (I) Grupo | | | | |
| | | 100% | Control + | Control - | 12.5% | 25% |
| Azángaro cepa nativa | Control - | 7,4667* | 10,8958* | | ,1136 | ,1136 |
| | 12.5% | 2,8333* | 6,2625* | ,1136 | | ,1136 |
| | 25% | 1,9167* | 5,3458* | ,1136 | ,1136 | |
| | 50% | 1,2833* | 4,7125* | ,1136 | ,1136 | ,1136 |
| | 75% | ,5333* | 3,9625* | ,1136 | ,1136 | ,1136 |
| | 100% | | 3,4292* | ,1136 | ,1136 | ,1136 |
| | Control + | -3,4292* | | ,1136 | ,1136 | ,1136 |
| Azángaro cepa CTTC | Control - | 8,1083* | 10,9133* | | ,0999 | ,0999 |
| | 12.5% | 2,6083* | 5,4133* | ,0999 | | ,0999 |
| | 25% | 2,5083* | 5,3133* | ,0999 | ,0999 | |
| | 50% | 1,7083* | 4,5133* | ,0999 | ,0999 | ,0999 |
| | 75% | ,6500* | 3,4550* | ,0999 | ,0999 | ,0999 |
| | 100% | | 2,8050* | ,0999 | ,0999 | ,0999 |
| | | | | | | |

| | | | | | | |
|-------------------|-----------|----------|----------|-------|-------|-------|
| | Control + | -2,8050* | | ,0999 | ,0999 | ,0999 |
| Acora cepa nativa | Control - | 8,1167* | 10,3667* | | ,0687 | ,0687 |
| | 12.5% | 2,6583* | 4,9083* | ,0687 | | ,0687 |
| | 25% | 2,2583* | 4,5083* | ,0687 | ,0687 | |
| | 50% | 1,5917* | 3,8417* | ,0687 | ,0687 | ,0687 |
| | 75% | ,8917* | 3,1417* | ,0687 | ,0687 | ,0687 |
| | 100% | | 2,2500* | ,0687 | ,0687 | ,0687 |
| | Control + | -2,2500* | | ,0687 | ,0687 | ,0687 |
| Acora cepa CTTCC | Control - | 8,3333* | 10,7508* | | ,0864 | ,0864 |
| | 12.5% | 2,3417* | 4,7592* | ,0864 | | ,0864 |
| | 25% | 1,8417* | 4,2592* | ,0864 | ,0864 | |
| | 50% | 1,4000* | 3,8175* | ,0864 | ,0864 | ,0864 |
| | 75% | ,7000* | 3,1175* | ,0864 | ,0864 | ,0864 |
| | 100% | | 2,4175* | ,0864 | ,0864 | ,0864 |
| | Control + | -2,4175* | | ,0864 | ,0864 | ,0864 |

| Comparaciones múltiples | | | | | | |
|-------------------------|-----------|----------------|-------|-------|-----------|-----------|
| HSD Tukey | | | | | | |
| Variable dependiente | (J) Grupo | Error estándar | | | | |
| | | (I) Grupo | | | | |
| | | 50% | 75% | 100% | Control + | Control - |
| Azángaro cepa nativa | Control - | ,1136 | ,1136 | ,1136 | ,1136 | |

| | | | | | | |
|--------------------|-----------|-------|-------|-------|-------|------|
| | 12.5% | ,1136 | ,1136 | ,1136 | ,1136 | ,000 |
| | 25% | ,1136 | ,1136 | ,1136 | ,1136 | ,000 |
| | 50% | | ,1136 | ,1136 | ,1136 | ,000 |
| | 75% | ,1136 | | ,1136 | ,1136 | ,000 |
| | 100% | ,1136 | ,1136 | | ,1136 | ,000 |
| | Control + | ,1136 | ,1136 | ,1136 | | ,000 |
| Azángaro cepa CTTC | Control - | ,0999 | ,0999 | ,0999 | ,0999 | |
| | 12.5% | ,0999 | ,0999 | ,0999 | ,0999 | ,000 |
| | 25% | ,0999 | ,0999 | ,0999 | ,0999 | ,000 |
| | 50% | | ,0999 | ,0999 | ,0999 | ,000 |
| | 75% | ,0999 | | ,0999 | ,0999 | ,000 |
| | 100% | ,0999 | ,0999 | | ,0999 | ,000 |
| | Control + | ,0999 | ,0999 | ,0999 | | ,000 |
| Acora cepa nativa | Control - | ,0687 | ,0687 | ,0687 | ,0687 | |
| | 12.5% | ,0687 | ,0687 | ,0687 | ,0687 | ,000 |
| | 25% | ,0687 | ,0687 | ,0687 | ,0687 | ,000 |
| | 50% | | ,0687 | ,0687 | ,0687 | ,000 |
| | 75% | ,0687 | | ,0687 | ,0687 | ,000 |
| | 100% | ,0687 | ,0687 | | ,0687 | ,000 |
| | Control + | ,0687 | ,0687 | ,0687 | | ,000 |
| Acora cepa CTTC | Control - | ,0864 | ,0864 | ,0864 | ,0864 | |
| | 12.5% | ,0864 | ,0864 | ,0864 | ,0864 | ,000 |

| | | | | | | |
|--|-----------|-------|-------|-------|-------|------|
| | 25% | ,0864 | ,0864 | ,0864 | ,0864 | ,000 |
| | 50% | | ,0864 | ,0864 | ,0864 | ,000 |
| | 75% | ,0864 | | ,0864 | ,0864 | ,000 |
| | 100% | ,0864 | ,0864 | | ,0864 | ,000 |
| | Control + | ,0864 | ,0864 | ,0864 | | ,000 |

| Comparaciones múltiples | | | | | | |
|-------------------------|-----------|-----------|------|------|------|------|
| HSD Tukey | | | | | | |
| Variable dependiente | (J) Grupo | Sig. | | | | |
| | | (I) Grupo | | | | |
| | | 12.5% | 25% | 50% | 75% | 100% |
| Azángaro cepa nativa | Control - | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 |
| | 12.5% | | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 |
| | 25% | ,000 | | ,000 | ,000 | ,000 |
| | 50% | ,000 | ,000 | | ,000 | ,000 |
| | 75% | ,000 | ,000 | ,000 | | ,000 |
| | 100% | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | |
| | Control + | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 |
| Azángaro cepa CTTC | Control - | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 |
| | 12.5% | | ,952 | ,000 | ,000 | ,000 |
| | 25% | ,952 | | ,000 | ,000 | ,000 |
| | 50% | ,000 | ,000 | | ,000 | ,000 |

| | | | | | | |
|-------------------|-----------|------|------|------|------|------|
| | 75% | ,000 | ,000 | ,000 | | ,000 |
| | 100% | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | |
| | Control + | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 |
| Acora cepa nativa | Control - | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 |
| | 12.5% | | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 |
| | 25% | ,000 | | ,000 | ,000 | ,000 |
| | 50% | ,000 | ,000 | | ,000 | ,000 |
| | 75% | ,000 | ,000 | ,000 | | ,000 |
| | 100% | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | |
| | Control + | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 |
| Acora cepa CTTCC | Control - | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 |
| | 12.5% | | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 |
| | 25% | ,000 | | ,000 | ,000 | ,000 |
| | 50% | ,000 | ,000 | | ,000 | ,000 |
| | 75% | ,000 | ,000 | ,000 | | ,000 |
| | 100% | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | |
| | Control + | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 |

| Comparaciones múltiples | | | |
|-------------------------|-----------|-----------|-------------------------------|
| HSD Tukey | | | |
| | | | 95% de intervalo de confianza |
| | | Sig. | Límite inferior |
| Variable dependiente | (J) Grupo | (I) Grupo | (I) Grupo |

| | | Control + | Control - | 12.5% | 25% | 50% |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|--------|--------|--------|
| Azángaro cepa nativa | Control - | ,000 | | 4,289 | 5,206 | 5,839 |
| | 12.5% | ,000 | -4,977 | | ,573 | 1,206 |
| | 25% | ,000 | -5,894 | -1,261 | | ,289 |
| | 50% | ,000 | -6,527 | -1,894 | -977 | |
| | 75% | ,000 | -7,277 | -2,644 | -1,727 | -1,094 |
| | 100% | ,000 | -7,811 | -3,177 | -2,261 | -1,627 |
| | Control + | | -11,240 | -6,606 | -5,690 | -5,056 |
| Azángaro cepa CTCC | Control - | ,000 | | 5,197 | 5,297 | 6,097 |
| | 12.5% | ,000 | -5,803 | | -,203 | ,597 |
| | 25% | ,000 | -5,903 | -,403 | | ,497 |
| | 50% | ,000 | -6,703 | -1,203 | -1,103 | |
| | 75% | ,000 | -7,761 | -2,261 | -2,161 | -1,361 |
| | 100% | ,000 | -8,411 | -2,911 | -2,811 | -2,011 |
| | Control + | | -11,216 | -5,716 | -5,616 | -4,816 |
| Acora cepa nativa | Control - | ,000 | | 5,250 | 5,650 | 6,317 |
| | 12.5% | ,000 | -5,666 | | ,192 | ,859 |
| | 25% | ,000 | -6,066 | -,608 | | ,459 |
| | 50% | ,000 | -6,733 | -1,275 | -875 | |
| | 75% | ,000 | -7,433 | -1,975 | -1,575 | -,908 |
| | 100% | ,000 | -8,325 | -2,866 | -2,466 | -1,800 |
| | Control + | | -10,575 | -5,116 | -4,716 | -4,050 |

| | | | | | | |
|-----------------|-----------|------|---------|--------|--------|--------|
| Acora cepa CTTC | Control - | ,000 | | 5,730 | 6,230 | 6,672 |
| | 12.5% | ,000 | -6,253 | | ,238 | ,680 |
| | 25% | ,000 | -6,753 | -,762 | | ,180 |
| | 50% | ,000 | -7,195 | -1,203 | -,703 | |
| | 75% | ,000 | -7,895 | -1,903 | -1,403 | -,962 |
| | 100% | ,000 | -8,595 | -2,603 | -2,103 | -1,662 |
| | Control + | | -11,012 | -5,021 | -4,521 | -4,079 |

| Comparaciones múltiples | | | | | | |
|-------------------------|-----------|-------------------------------|--------|-----------|-----------|--------|
| HSD Tukey | | | | | | |
| Variable dependiente | (J) Grupo | 95% de intervalo de confianza | | | | |
| | | Límite inferior | | | | |
| | | (I) Grupo | | | | |
| | | 75% | 100% | Control + | Control - | 12.5% |
| Azángaro cepa nativa | Control - | 6,589 | 7,123 | 10,552 | | 4,977 |
| | 12.5% | 1,956 | 2,489 | 5,919 | -4,289 | |
| | 25% | 1,039 | 1,573 | 5,002 | -5,206 | -,573 |
| | 50% | ,406 | ,939 | 4,369 | -5,839 | -1,206 |
| | 75% | | ,189 | 3,619 | -6,589 | -1,956 |
| | 100% | -,877 | | 3,085 | -7,123 | -2,489 |
| | Control + | -4,306 | -3,773 | | -10,552 | -5,919 |
| Azángaro cepa CTTC | Control - | 7,156 | 7,806 | 10,611 | | 5,803 |
| | 12.5% | 1,656 | 2,306 | 5,111 | -5,197 | |

| | | | | | | |
|-------------------|-----------|--------|--------|--------|---------|--------|
| | 25% | 1,556 | 2,206 | 5,011 | -5,297 | ,203 |
| | 50% | ,756 | 1,406 | 4,211 | -6,097 | -,597 |
| | 75% | | ,347 | 3,152 | -7,156 | -1,656 |
| | 100% | -,953 | | 2,502 | -7,806 | -2,306 |
| | Control + | -3,758 | -3,108 | | -10,611 | -5,111 |
| Acora cepa nativa | Control - | 7,017 | 7,909 | 10,159 | | 5,666 |
| | 12.5% | 1,559 | 2,450 | 4,700 | -5,250 | |
| | 25% | 1,159 | 2,050 | 4,300 | -5,650 | -,192 |
| | 50% | ,492 | 1,384 | 3,634 | -6,317 | -,859 |
| | 75% | | ,684 | 2,934 | -7,017 | -1,559 |
| | 100% | -1,100 | | 2,042 | -7,909 | -2,450 |
| | Control + | -3,350 | -2,458 | | -10,159 | -4,700 |
| Acora cepa CTCC | Control - | 7,372 | 8,072 | 10,489 | | 6,253 |
| | 12.5% | 1,380 | 2,080 | 4,498 | -5,730 | |
| | 25% | ,880 | 1,580 | 3,998 | -6,230 | -,238 |
| | 50% | ,438 | 1,138 | 3,556 | -6,672 | -,680 |
| | 75% | | ,438 | 2,856 | -7,372 | -1,380 |
| | 100% | -,962 | | 2,156 | -8,072 | -2,080 |
| | Control + | -3,379 | -2,679 | | -10,489 | -4,498 |

| Comparaciones múltiples | | |
|-------------------------|-----------|-------------------------------|
| HSD Tukey | | |
| Variable dependiente | (J) Grupo | 95% de intervalo de confianza |

| | | Límite superior | | | | |
|----------------------|-----------|-----------------|--------|--------|--------|-----------|
| | | (I) Grupo | | | | |
| | | 25% | 50% | 75% | 100% | Control + |
| Azángaro cepa nativa | Control - | 5,894 | 6,527 | 7,277 | 7,811 | 11,240 |
| | 12.5% | 1,261 | 1,894 | 2,644 | 3,177 | 6,606 |
| | 25% | | ,977 | 1,727 | 2,261 | 5,690 |
| | 50% | -,289 | | 1,094 | 1,627 | 5,056 |
| | 75% | -1,039 | -,406 | | ,877 | 4,306 |
| | 100% | -1,573 | -,939 | -,189 | | 3,773 |
| | Control + | -5,002 | -4,369 | -3,619 | -3,085 | |
| Azángaro cepa CTTCC | Control - | 5,903 | 6,703 | 7,761 | 8,411 | 11,216 |
| | 12.5% | ,403 | 1,203 | 2,261 | 2,911 | 5,716 |
| | 25% | | 1,103 | 2,161 | 2,811 | 5,616 |
| | 50% | -,497 | | 1,361 | 2,011 | 4,816 |
| | 75% | -1,556 | -,756 | | ,953 | 3,758 |
| | 100% | -2,206 | -1,406 | -,347 | | 3,108 |
| | Control + | -5,011 | -4,211 | -3,152 | -2,502 | |
| Acora cepa nativa | Control - | 6,066 | 6,733 | 7,433 | 8,325 | 10,575 |
| | 12.5% | ,608 | 1,275 | 1,975 | 2,866 | 5,116 |
| | 25% | | ,875 | 1,575 | 2,466 | 4,716 |
| | 50% | -,459 | | ,908 | 1,800 | 4,050 |
| | 75% | -1,159 | -,492 | | 1,100 | 3,350 |
| | 100% | -2,050 | -1,384 | -,684 | | 2,458 |

| | | | | | | |
|-----------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Control + | -4,300 | -3,634 | -2,934 | -2,042 | |
| Acora cepa CTCC | Control - | 6,753 | 7,195 | 7,895 | 8,595 | 11,012 |
| | 12.5% | ,762 | 1,203 | 1,903 | 2,603 | 5,021 |
| | 25% | | ,703 | 1,403 | 2,103 | 4,521 |
| | 50% | -,180 | | ,962 | 1,662 | 4,079 |
| | 75% | -,880 | -,438 | | ,962 | 3,379 |
| | 100% | -1,580 | -1,138 | -,438 | | 2,679 |
| | Control + | -3,998 | -3,556 | -2,856 | -2,156 | |

Pruebas Tukey

| | | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | |
|------------------------|-------------|----|------------------------------|--------|--------|
| | | | 1 | 2 | 3 |
| HSD Tukey ^a | Control (+) | 12 | 0.0000 | | |
| | 100mg/ml | 12 | | 2.6000 | |
| | 75mg/ml | 12 | | 3.0800 | |
| | 50mg/ml | 12 | | 4.0100 | 4.0100 |
| | 25mg/ml | 12 | | 4.8900 | 4.8900 |
| | Control (-) | 12 | | | 5.9060 |
| | 12.5mg/ml | 12 | | | 6.0700 |
| | Sig. | | 1.000 | 0.092 | 0.164 |

| | | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | |
|------------------------|-------------|----|------------------------------|--------|--------|
| | | | 1 | 2 | 3 |
| HSD Tukey ^a | Control (+) | 12 | 0.0000 | | |
| | 100mg/ml | 12 | | 2.5760 | |
| | 75mg/ml | 12 | | 3.5160 | 3.5160 |
| | 50mg/ml | 12 | | 4.7160 | 4.7160 |
| | 25mg/ml | 12 | | | 5.4920 |
| | Control (-) | 12 | | | 5.9060 |
| | 12.5mg/ml | 12 | | | 5.9460 |
| | Sig. | | 1.000 | 0.136 | 0.063 |

| cepanativadifusionazangaro | | | | | | | | | |
|----------------------------|------|----|------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| cepa3 | | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | | | | | |
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| HSD Tukey ^a | ,00 | 12 | 6.0000 | | | | | | |
| | 1,00 | 12 | | 10.6333 | | | | | |
| | 2,00 | 12 | | | 11.5500 | | | | |
| | 3,00 | 12 | | | | 12.1833 | | | |
| | 4,00 | 12 | | | | | 12.9333 | | |
| | 5,00 | 12 | | | | | | 13.4667 | |
| | 6,00 | 12 | | | | | | | 16.8958 |

| | | | | | | | | | |
|--|------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |
|--|------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|

| cepaattccdifusionazangaro | | | | | | | | | |
|---------------------------|-------------|----|------------------------------|---------|---------|---------|---------|-------|---------|
| | | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | | | | | |
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| HSD Tukeya | Control (+) | 12 | 60,000 | | | | | | |
| | 100mg/ml | 12 | | 115,000 | | | | | |
| | 75mg/ml | 12 | | 116,000 | | | | | |
| | 50mg/ml | 12 | | | 124,000 | | | | |
| | 25mg/ml | 12 | | | | 134,583 | | | |
| | 12.5mg/ml | 12 | | | | | 141,083 | | |
| | Control (-) | 12 | | | | | | | 169,133 |
| | Sig. | | 1,000 | ,952 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |

| | | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | | |
|------------------------|-------------|----|------------------------------|--------|--------|---|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| HSD Tukey ^a | Control (+) | 12 | 0.0000 | | | |
| | 100mg/ml | 12 | 2.5220 | 2.5220 | | |
| | 75mg/ml | 12 | | 3.0240 | 3.0240 | |

| | | | | | | |
|--|-------------|----|-------|--------|--------|--------|
| | 50mg/ml | 12 | | 3.7580 | 3.7580 | 3.7580 |
| | 25mg/ml | 12 | | 4.7760 | 4.7760 | 4.7760 |
| | 12.5mg/ml | 12 | | | 5.1420 | 5.1420 |
| | Control (-) | 12 | | | | 5.9580 |
| | Sig. | | 0.052 | 0.106 | 0.149 | 0.122 |

| | | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | | |
|------------------------|-------------|----|------------------------------|--------|--------|--------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| HSD Tukey ^a | Control (+) | 12 | 0.0000 | | | |
| | 100mg/ml | 12 | 2.1960 | 2.1960 | | |
| | 75mg/ml | 12 | | 2.8560 | 2.8560 | |
| | 50mg/ml | 12 | | 3.7620 | 3.7620 | 3.7620 |
| | 25mg/ml | 12 | | 4.2280 | 4.2280 | 4.2280 |
| | 12.5mg/ml | 12 | | | 4.7880 | 4.7880 |
| | Control (-) | 12 | | | | 5.9580 |
| | Sig. | | 0.125 | 0.185 | 0.231 | 0.125 |

| cepanativaacoradifusion | | | | | | | | | |
|-------------------------|--|---|------------------------------|---|---|---|---|---|---|
| cepa6 | | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | | | | | |
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| | | | | | | | | | |




| | | | | | | | | | |
|---------------------------|------|----|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| HSD Tukey ^a | ,00 | 12 | 6.0000 | | | | | | |
| | 1,00 | 12 | | 11.4583 | | | | | |
| | 2,00 | 12 | | | 11.8583 | | | | |
| | 3,00 | 12 | | | | 12.5250 | | | |
| | 4,00 | 12 | | | | | 13.2250 | | |
| | 5,00 | 12 | | | | | | 14.1167 | |
| | 6,00 | 12 | | | | | | | 16.3667 |
| Sig. | | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

| cepaAttccacoradifusion | | | | | | | | | |
|-------------------------------|------|----|------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| cepa7 | | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | | | | | |
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| HSD Tukey ^a | ,00 | 12 | 6.0000 | | | | | | |
| | 1,00 | 12 | | 11.9917 | | | | | |
| | 2,00 | 12 | | | 12.4917 | | | | |
| | 3,00 | 12 | | | | 12.9333 | | | |
| | 4,00 | 12 | | | | | 13.6333 | | |
| | 5,00 | 12 | | | | | | 14.3333 | |
| | 6,00 | 12 | | | | | | | 16.7508 |




| | | | | | | | | | |
|--|------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |
|--|------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|

ANEXO 2. DOCUMENTOS - EVIDENCIA



Universidad Nacional del Altiplano - Puno
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA



CONSTANCIA

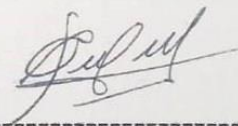

EL QUE SUSCRIBE, ENCARGADO DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

HACE CONSTAR:

Que, el señor GAELORD VLADIMIR HUACASI SUPO, identificado con DNI. 02449702 con código de estudiante N°172345 de la Escuela de post grado de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UNA- PUNO, quien ha realizado su Proyecto de Tesis titulado: "EFECTO INHIBITORIO DE LA ARCILLA CHACCO, EN EL CRECIMIENTO DE *Porphyromona gingivalis* PUNO 2020" para optar el grado académico de: Doctor en Ciencias de la Salud, realizado en el Laboratorio de Microbiología de esta Facultad, en la fecha de enero a marzo del 2021.

Se expide la presente a solicitud de la interesada, para los fines que estime conveniente.

Puno, 03 de julio del 2021



LIC. BALBINO LORGIO PALACIOS FRISANCHO



Universidad Nacional del Altiplano - Puno
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA



CERTIFICADO DE CEPA BACTERIANA

EL QUE SUSCRIBE:

Certifica la pureza de cepas para *Porphyromonas gingivalis*, las que se han obtenido tomando en cuenta el siguiente procedimiento:

1. Las muestras de placa subgingival y liofilizado estandarizado fueron dispersadas y mezcladas por 45 segundos agitando en un vórtex-mixer
2. seguido de diluciones seriadas en PBS (buffer fosfato pH 7,4) de la suspensión bacteriana mantenida en el RTF.
3. Un volumen de 100 ml de la dilución adecuada, se sembró en agar sangre.
4. Características ambientales.

Las placas fueron incubadas en condiciones de anaerobiosis a 35 °C

Tiempo de incubación hasta 14 días, en jarra con generador de atmósfera anaerobia (Anaerogen)

5. Para la identificación del *Porphyromona gingivalis*, se tomó en cuenta los criterios fenotípicos.
 - a. Morfología macroscópica, borde irregular, elevación cóncava, color verdosa parda o negra, forma irregular.
 - b. Morfología microscópica, bacteria bacilo corto y cocoide gram negativo.
 - c. Resistencia o sensibilidad a antibióticos.
Resistente a amoxicilina y bacitracina, Sensible a aminoglucósidos
 - d. Propiedades Bioquímicas, BANA (Benzoil-DL-Arginina-Naftilamida) Sistema API 20A (BioMérieux, Francia).

Cepa estandarizada: Constituida por cepas de microorganismo liofilizado *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (Minnesota, USA, importado por Genlab del Peru SAC)

Cepa nativa: A partir de muestras biológicas proporcionadas por el investigador.

Nota: Los procedimientos de caracterización realizados, fueron los mismos en ambas muestras, siguiendo los métodos estándar propuestos por el Instituto Nacional de Salud (INS).



LIC. BALBINO LORGIO PALACIOS FRISANCHO



Universidad Nacional del Altiplano - Puno
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA



MATRIZ DE DATOS

HALO DE INHIBICIÓN

| APLICACIÓN CHACO AZANGARO | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|-------------|--------|------|------|------|------|-----------|-----------|--------|------|------|------|------|-----------|
| | CEPA NATIVA | | | | | | | CEPA CTTC | | | | | | |
| | CONTROL - | 12.50% | 25% | 50% | 75% | 100% | CONTROL + | CONTROL - | 12.50% | 25% | 50% | 75% | 100% | CONTROL + |
| 1 | 6 | 10.8 | 11.3 | 11.9 | 12.9 | 13.3 | 16.8 | 6 | 11.2 | 11.4 | 12.2 | 13.4 | 14.1 | 16.9 |
| 2 | 6 | 10.7 | 11.2 | 11.8 | 12.7 | 13.1 | 16.5 | 6 | 11.3 | 11.6 | 12.4 | 13.6 | 14.2 | 16.9 |
| 3 | 6 | 10.6 | 11.4 | 12.1 | 12.6 | 13.3 | 17.2 | 6 | 11.4 | 11.7 | 12.5 | 13.7 | 14.3 | 17.2 |
| 4 | 6 | 10.7 | 11.5 | 12.2 | 12.7 | 13.2 | 16.9 | 6 | 11.2 | 11.5 | 12.3 | 13.5 | 14.2 | 17.3 |
| 5 | 6 | 10.9 | 11.3 | 11.9 | 12.5 | 13.2 | 16.5 | 6 | 11.4 | 11.7 | 12.5 | 13.4 | 14.5 | 16.6 |
| 6 | 6 | 10.8 | 11.4 | 12.2 | 12.7 | 13.3 | 16.9 | 6 | 11.4 | 11.5 | 12.3 | 13.3 | 14.6 | 17.1 |
| 7 | 6 | 10.6 | 11.7 | 12.3 | 12.8 | 13.7 | 16.7 | 6 | 11.6 | 11.8 | 12.6 | 13.2 | 14.6 | 16.8 |
| 8 | 6 | 10.5 | 11.8 | 12.4 | 12.9 | 13.5 | 17.04 | 6 | 11.8 | 11.5 | 12.3 | 13.1 | 13.8 | 16.34 |
| 9 | 6 | 10.4 | 11.9 | 12.5 | 13.4 | 13.8 | 16.66 | 6 | 11.7 | 11.4 | 12.2 | 13.4 | 13.7 | 16.44 |
| 10 | 6 | 10.7 | 11.8 | 12.4 | 13.5 | 13.9 | 17.54 | 6 | 11.6 | 11.6 | 12.4 | 13.2 | 13.9 | 16.8 |
| 11 | 6 | 10.5 | 11.7 | 12.3 | 13.3 | 13.7 | 17.89 | 6 | 11.8 | 11.7 | 12.5 | 13.9 | 13.6 | 17.35 |
| 12 | 6 | 10.4 | 11.6 | 12.2 | 13.2 | 13.6 | 16.12 | 6 | 11.6 | 11.8 | 12.6 | 13.8 | 13.8 | 17.54 |

| APLICACIÓN CHACO ACORA | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------|-------------|--------|------|------|------|------|-----------|-----------|--------|------|------|------|------|-----------|
| | CEPA NATIVA | | | | | | | CEPA CTTC | | | | | | |
| | CONTROL - | 12.50% | 25% | 50% | 75% | 100% | CONTROL + | CONTROL - | 12.50% | 25% | 50% | 75% | 100% | CONTROL + |
| 1 | 6 | 11.3 | 11.7 | 12.4 | 13.1 | 13.9 | 16.5 | 6 | 11.9 | 12.4 | 12.8 | 13.5 | 14.5 | 16.9 |
| 2 | 6 | 11.2 | 11.6 | 12.3 | 13 | 13.8 | 16.2 | 6 | 11.8 | 12.3 | 12.7 | 13.4 | 14.3 | 16.8 |
| 3 | 6 | 11.4 | 11.8 | 12.5 | 13.2 | 14.1 | 16.3 | 6 | 11.9 | 12.4 | 12.8 | 13.5 | 14.1 | 16.9 |
| 4 | 6 | 11.6 | 12 | 12.7 | 13.4 | 14.2 | 16.3 | 6 | 11.7 | 12.2 | 12.6 | 13.3 | 13.9 | 16.8 |
| 5 | 6 | 11.7 | 12.1 | 12.8 | 13.5 | 14.3 | 16.1 | 6 | 11.8 | 12.3 | 12.7 | 13.4 | 14.5 | 16.7 |
| 6 | 6 | 11.9 | 12.3 | 12.6 | 13.3 | 14.1 | 16.4 | 6 | 11.7 | 12.2 | 12.6 | 13.3 | 13.9 | 16.5 |
| 7 | 6 | 11.5 | 11.9 | 12.6 | 13.3 | 14.1 | 16.35 | 6 | 12.2 | 12.7 | 13.1 | 13.8 | 14.4 | 16.4 |
| 8 | 6 | 11.4 | 11.8 | 12.5 | 13.2 | 14.4 | 16.5 | 6 | 12.1 | 12.6 | 13.2 | 13.9 | 14.5 | 16.82 |
| 9 | 6 | 11.3 | 11.7 | 12.4 | 13.1 | 13.9 | 16.67 | 6 | 12.3 | 12.8 | 13.2 | 13.9 | 14.5 | 16.63 |
| 10 | 6 | 11.4 | 11.8 | 12.5 | 13.2 | 14.2 | 16.75 | 6 | 12.2 | 12.7 | 13.1 | 13.8 | 14.4 | 16.66 |
| 11 | 6 | 11.3 | 11.7 | 12.4 | 13.1 | 14.3 | 16 | 6 | 12.1 | 12.6 | 13.3 | 14 | 14.6 | 16.9 |
| 12 | 6 | 11.5 | 11.9 | 12.6 | 13.3 | 14.1 | 16.33 | 6 | 12.2 | 12.7 | 13.1 | 13.8 | 14.4 | 17 |



ANEXO 3. CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

- 1.- INSTITUCIONES: UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA
V&D SERVICIOS DE SALUD E. I. R. L.
- 2.- INVESTIGADOR: Mg. Gaelord Vladimir Huacasi Supo
Dr. Moisés Apaza Ahumada
- 3.- TÍTULO: Efecto inhibitorio de la arcilla Chacco en el crecimiento de *Porphyromonas Gingivalis*, Puno 2020.

4.- JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El propósito del estudio es determinar el efecto de la arcilla Chacco, producto natural de uso frecuente en nuestro medio, sobre la bacteria *Porphyromonas gingivalis*, periodonto patógeno asociado al desarrollo de Periodontitis, con la finalidad de evaluar el potencial inhibitorio de la arcilla.

5.- METODOLOGÍA:

Si usted acepta participar se procederá de la siguiente manera:

- a.- Toma de temperatura y desinfección externa.
- b.- Desinfección del ambiente donde se tomará la muestra.
- c.- Diagnóstico Periodontal y examen radiográfico gratuito.
- d.- Remoción de sarro dental y recojo de las muestras provenientes de bolsas periodontales mayores o iguales a 5mm.
- e.- Tratamiento periodontal básico (Ferulización, raspado radicular, alisado radicular y pulido de superficies) gratuito.
- f.- Las muestras tomadas, serán colocadas en medios de almacenamiento temporal y luego llevadas al laboratorio de microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Altiplano.

6.- CONFIDENCIALIDAD:

El investigador registrará su información con códigos, no será necesario colocar su nombre o algún otro dato personal. Si el estudio es publicado en una revista científica, no se mostrará ninguna información que permita la identificación de las personas que participan en este estudio. Los registros recabados no serán mostrados a ninguna persona ajena al estudio sin su consentimiento.

7.- CONSENTIMIENTO:

He recibido y comprendo perfectamente la información que se me ha brindado sobre los propósitos y procedimientos si participo en el estudio.

Acepto voluntariamente participar en el estudio y también entiendo que puedo decidir no participar o retirarme en cualquier momento sin dar explicaciones.

Firma del participante

Huella Digital

Fecha

DNI:

Nombres y Apellidos:

Firma del investigador

Huella Digital

Fecha

DNI:

Nombres y Apellidos:

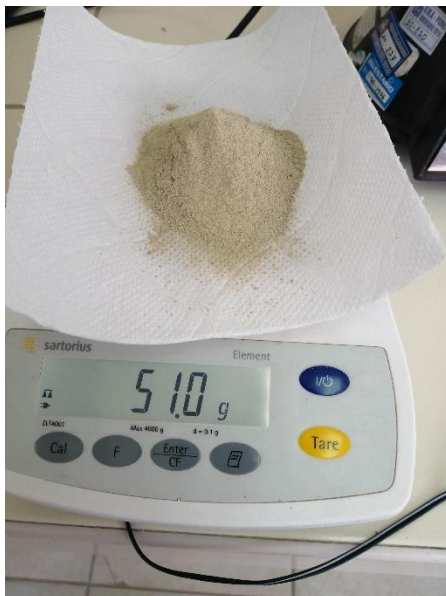
ANEXO B. PANEL FOTOGRÁFICO



ARCILLA ÁCORA



ARCILLA AZÁNGARO



PESAJE DE MUESTRA DE ARCILLA
ARCILLA CHACCO

VARIEDAD ÁCORA

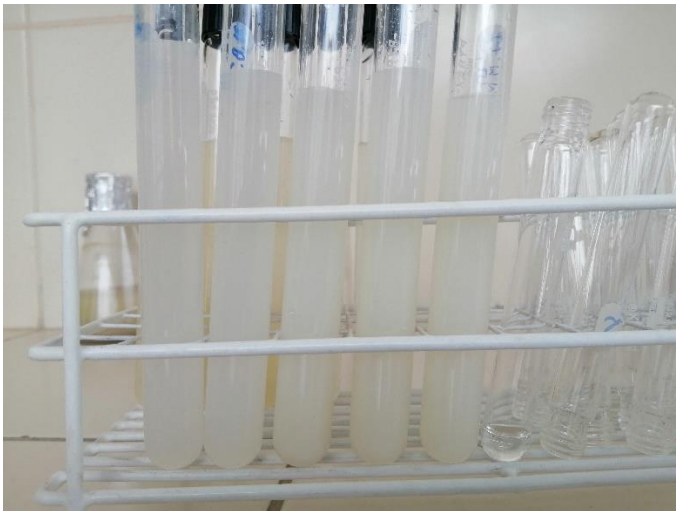


PESAJE DE MUESTRA DE
ARCILLA CHACCO

VARIEDAD AZÁNGARO



DILUCIÓN DE MUESTRAS DE ARCILLA CHACCO



DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ARCILLA CHACCO VARIEDAD
AZÁNGARO



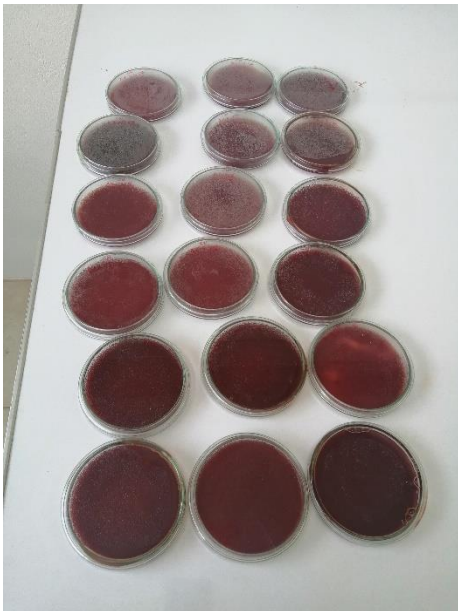
DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ARCILLA CHACCO VARIEDAD ÁCORA



MEDIO DE CULTIVO AGAR SANGRE



VOTEXADO DE MUESTRAS
BIOLÓGICAS



PLACAS PETRI PARA CEPAS NATIVAS



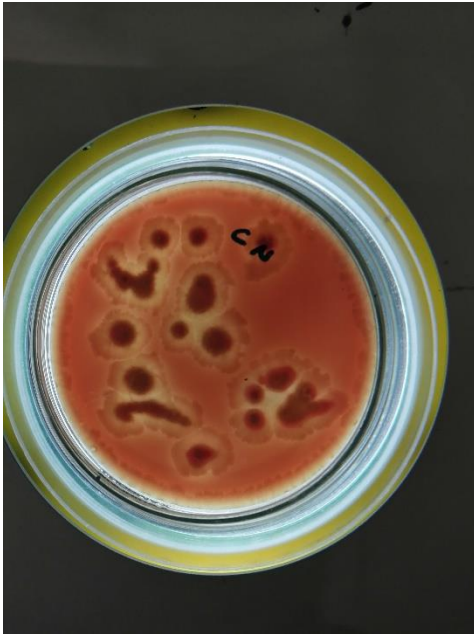
PLACAS PETRI PARA CEPAS
ESTANDARIZADAS



CÁMARA DE AEROBIOSIS



INCUBACIÓN DE PLACAS CON
MUESTRAS



PLACA PETRI CON CEPAS NATIVAS
ESTANDARIZADAS



PLACA PETRI CON CEPAS

ANEXO 5. FICHA DE OBSERVACIÓN

FICHA DE OBSERVACIÓN PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS

I.- IDENTIFICACIÓN DE LA UNIDAD DE ANÁLISIS

CÓDIGO DE LA PLACA PETRI:

NÚMERO DE REPETICIÓN:

FECHA DE CULTIVO:

FECHA DE LECTURA:

OBSERVACIONES:
.....
.....

II.- TÉCNICA DE CULTIVO BACTERIANO:

DILUCIÓN EN AGAR

DIFUSIÓN EN AGAR

III.- CONCENTRACIÓN DE LA ARCILLA CHACCO

100mg/ml

75mg/ml

50mg/ml

25mg/ml

12,5mg/ml

IV VARIEDAD DE ARCILLA CHACCO

VARIEDAD AZÁNGARO

VARIEDAD ÁCORA

Control Positivo Clorhexidina

Control Negativo Suero Fisiológico

V.- LONGITUD DEL HALO DE INHIBICIÓN:
.....

VI.- RECUENTO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS
.....

- Cuantificar el desarrollo observado en los medios sembrados: contar las colonias y multiplicar por el factor de dilución para determinar el número de bacterias presentes en 1 ml de material.
- Interpretación del recuento obtenido: identificar los microorganismos presentes en recuento significativo ($\geq 10^4$ UFC/ml).

APELLIDOS Y NOMBRES DEL OBSERVADOR

FIRMA