



UNIVERSIDAD PERUANA  
CAYETANO HEREDIA

“EFICACIA ANTIBACTERIANA DEL  
EXTRACTO ETANÓLICO DE  
PROPÓLEO AL 1,5%, EXTRACTO DE  
MORINDA CITRIFOLIA AL 6% Y EL  
HIDRÓXIDO DE CALCIO USADOS  
COMO MEDICACIÓN ENDODÓNTICA  
INTRA CONDUCTO FRENTE A UNA  
CEPA DE *Enterococcus faecalis* ATCC  
29212”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRO EN ESTOMATOLOGÍA CON  
MENCIÓN EN ENDODONCIA

JUAN CARLOS LUGO PALMADERA

LIMA – PERÚ

2022



**ASESORA**

Mg. Esp. CD. Carmen Rosa García Rupaya

**JURADO DE TESIS**

DRA. ROSARIO ELENA ROJAS DURAN

PRESIDENTE

MG. JUAN FELIPE HERNANDEZ AÑAÑOS

VOCAL

MG. CARLOS VLADIMIR ESPINOZA MONTES

SECRETARIO

## **DEDICATORIA.**

A Dios por su amor infinito y haber permitido llegar hasta aquí hoy.

A mi esposa e hijos, por su constante apoyo y amor incondicional.

A mis padres apoyarme en cada meta, sueño y objetivo planteado.

A mis hermanos por su cariño y estar conmigo en todo momento.

A mis colegas por su apoyo en el desarrollo de este trabajo.

## **AGRADECIMIENTOS.**

- ❖ A mi asesora Mg. Esp. CD. Carmen Rosa García Rupaya por ofrecerme su tiempo, conocimientos y apoyo incondicional, sin usted esta tesis no habría llegado a feliz término.
- ❖ Al Departamento Académico de Clínica Estomatológica Facultad de Estomatología Universidad Peruana Cayetano Heredia, por su apoyo en la realización del presente trabajo.
- ❖ A la Dra. Dora Mautua Torres, jefa de la unidad de Microbiología de LID de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.
- ❖ Al personal del laboratorio de equipamiento especializado de la unidad de Microbiología de LID de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.
- ❖ A todas las personas que me permitieron realizar esta tesis. A todos ellos quiero dedicarles y agradecerles por siempre acompañarme, apoyarme, alentarme, orientarme y por siempre permitirme ser mejor persona.
- ❖ Finalmente quiero expresar mi más grande y sincero agradecimiento a la Mg. Esp. CD. Zulema Velásquez Huamán, principal colaboradora durante todo este largo proceso, quien con su dirección, conocimiento, enseñanza y colaboración permitió el desarrollo de este trabajo.

## **FUENTES DE FINANCIAMIENTO.**

Tesis autofinanciada

EFICACIA ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPOLEO AL 1,5%, EXTRACTO DE MORINDA CITRIFOLIA AL 6% Y EL HIDROXIDO DE CALCIO USADOS COMO MEDICACION ENDODONTICA INTRACONDUCTO FRENTE A UNA CEPA DE

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

<b>1</b>	<b>repositorio.upsjb.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>2%</b>
<b>2</b>	<b>water.me.vccs.edu</b> Fuente de Internet	<b>2%</b>
<b>3</b>	<b>hdl.handle.net</b> Fuente de Internet	<b>2%</b>
<b>4</b>	<b>www.dspace.uce.edu.ec</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>5</b>	<b>Submitted to Universidad Peruana Cayetano Heredia</b> Trabajo del estudiante	<b>1%</b>
<b>6</b>	<b>Submitted to Universidad Alas Peruanas</b> Trabajo del estudiante	<b>1%</b>
<b>7</b>	<b>upc.aws.openrepository.com</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>

posgrado.ucontinental.edu.pe



## **TABLA DE CONTENIDOS**

RESUMEN	
ABSTRACT	
	Pág.
I. INTRODUCCIÓN.	1
II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.	5
II.1. Planteamiento del problema.	5
III. MARCO TEÓRICO.	7
IV. JUSTIFICACION DEL ESTUDIO.	13
V. OBJETIVOS.	14
V.1. Objetivo general.	14
V.2. Objetivos específicos.	14
VI. MÉTODOLOGIA.	16
VI.1. Diseño del estudio.	16
VI.2. Muestra.	16
VI.3. Criterios de selección.	16
VI.3.1. Criterios de inclusión.	16
VI.3.2. Criterios de exclusión.	17
VI.4. Operacionalización de Variables.	17
VI.5. Procedimientos y/o Técnicas.	18
VI.6. Consideraciones éticas.	23
VI.7. Plan de análisis.	24
VII. RESULTADOS.	25
VIII. DISCUSIÓN.	30
IX. CONCLUSIONES.	36
X. RECOMENDACIONES.	37
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	38
XII. ANEXOS.	

## RESUMEN

**Objetivo:** Comparar in vitro la actividad antibacteriana del extracto etanólico de Propóleo de *Apis mellifera* al 1,5%, extracto de *Morinda citrifolia* al 6% y el Hidróxido de calcio usados como medicación endodóntica intraconducto sobre bloques de dentina infectadas con una cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. **Materiales y Métodos:** Se prepararon muestras de dientes infectadas con *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 sometidas a pruebas de esterilidad, posteriormente fueron expuestas al Propóleo, Morinda e Hidróxido de calcio, y se evaluó el crecimiento bacteriano mediante la Unidades Formadoras de Colonias (UFC) a las 48 y 72 horas. Se realizó un análisis descriptivo, así como analítico mediante la prueba de T de Student y prueba ANOVA. **Resultados:** In vitro, el grupo de extracto de Propóleo presentó un total de UFC a las 48 horas de  $4.15 \times 10^{-4}$  y a las 72 horas de  $3.35 \times 10^{-4}$ , el extracto de Morinda reportó un total de UFC a las 48 horas de  $4.33 \times 10^{-4}$  y a las 72 horas de  $4.76 \times 10^{-4}$  y el hidróxido de calcio indicó un total de UFC a las 48 horas de  $8.27 \times 10^{-4}$  y a las 72 horas de  $7.79 \times 10^{-4}$ . **Conclusiones:** In vitro El extracto etanólico de Propóleo al 1,5% y el extracto de *Morinda citrifolia* al 6% presentan mejor actividad antibacteriana estadísticamente significativo que el hidróxido de calcio en pasta sobre bloques de dentina infectadas con cepas de *E. faecalis* ATCC 29212 a las 48 y 72 horas.

**Palabras claves:** Hidróxido de calcio / *Enterococcus faecalis* / *Morinda citrifolia* / Propóleo.

## ABSTRACT

**Objective:** To compare in vitro the antibacterial activity of the ethanolic extract of Propolis of *Apis mellifera* 1,5%, *Morinda citrifolia* extract 6% and calcium hydroxide used as intracanal endodontic medication on dentin infected blocks with a strain of *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. **Material and Methods:** Infected samples were prepared with *Enterococcus faecalis* ATCC 2921 and tested for sterility, later exposed to Propolis, Morinda and calcium hydroxide, the bacterial growth was evaluated through the Colony Forming Units (CFU) at 48 and 72 hours. A descriptive analysis was performed, as well as a analytical by means of Student's T-test and ANOVA test. **Results:** In vitro, the Propolis extract presented a total of CFU at 48 hours of  $4.15 \times 10^{-4}$  and at the 72 hours of  $3.35 \times 10^{-4}$ , the extract of Morinda reported a total CFU at 48 hours of  $4.33 \times 10^{-4}$  and at the 72 hours of  $4.76 \times 10^{-4}$  and the calcium hydroxide indicated a total of UFC at 48 hours of  $8.27 \times 10^{-4}$  and at the 72 hours of  $7.79 \times 10^{-4}$ . **Conclusions:** In vitro, both ethanolic extract of propolis 1.5% and Morinda Citrifolia extract 6% show antibacterial activity statistically significant compared to Calcium Hydroxide paste on Dentin Blocks infected with *E. Faecalis* ATCC 29212 in 48 and 72 hours

**Key words:** Calcium hydroxide / *Enterococcus faecalis* / Morinda citrifolia / Propolis

## **I. INTRODUCCIÓN**

El pronóstico favorable para el tratamiento endodóntico de una pieza dentaria con diagnóstico de periodontitis apical depende del control de la infección del conducto radicular, en donde los agentes de desbridamiento químico así como la efectiva preparación biomecánica pueden reducir significativamente el número de microorganismos pero no eliminarlos completamente; por eso un efectivo protocolo de tratamiento antimicrobiano debe usarse para reducir el riesgo de infección bacteriana al mínimo, permitiendo así que el sistema inmunológico del huésped controle y promueva un medio favorable para la reparación del tejido periapical.

La eliminación de los microorganismos en dientes con periodontitis apical es una constante preocupación, la búsqueda de alternativas para el tratamiento antimicrobiano de esta patología es demostrada por estudios que estudian la microbiota endodóntica, la eficiencia de la instrumentación biomecánica, la influencia de la irrigación y la eficacia de la medicación endodóntica intraconducto<sup>(1)</sup>.

Asociado a estos especiales habitantes presentes en la infección endodóntica, se observa que la morfología de la cavidad pulpar impone dificultades, lo que hace complejo el acceso a un efectivo control microbiano. En el análisis anatómico, se observa que el contacto directo de una sustancia química irrigadora con los microorganismos presentes en la luz del conducto radicular es adecuada para reducir de modo significativo la población microbiana además de facilitar la disolución del tejido pulpar, pero para actuar sobre los microorganismos que

alcanzaron y están alojados en el interior de los túbulos dentinarios y en los espacios vacíos presentes en áreas del cemento apical, se necesita optar por una medicación endodóntica intraconducto que pueda actuar por contacto y a distancia en un extenso periodo de tiempo.

En el fracaso endodóntico, la causa principal está dada por los microorganismos que sobreviven en el conducto radicular después del tratamiento endodóntico, por tanto las bacterias remanentes podrían multiplicarse entre las citas y alcanzar niveles similares al tratamiento inicial <sup>(1)</sup>. Las bacterias asociadas a estos fracasos endodónticos formados por un consorcio mixto de más de 600 especies, así como las infecciones pulpares y periapicales resistentes a los tratamientos habituales, son los problemas que no han podido ser solucionados en endodoncia <sup>(2)</sup>, por este motivo, uno de los objetivos primarios del tratamiento endodóntico debe ser eliminar los microorganismos del conducto radicular y prevenir su recolonización.

La infección primaria del conducto radicular es típicamente polimicrobiana, con prevalencia de bacterias anaerobias estrictas <sup>(3)</sup>; por otro lado se ha demostrado que las infecciones endodónticas persistentes son causadas por el *Enterococcus faecalis*, quien ha sido el causante principal en los fracasos de los dientes que han sido previamente tratados porque tienen la capacidad de resistir un pH alto debido al funcionamiento de su bomba de protones que impulsan para acidificar su citoplasma <sup>(3,4)</sup>.

La actividad de los diferentes medicamentos endodónticos contra el *Enterococcus faecalis* es extensamente investigado y en su mayoría el hidróxido de calcio Ca (OH)<sub>2</sub> es el estándar contra el cual estos son comparados, pero el uso del Ca

(OH)<sub>2</sub> como medicamento endodóntico tiene sus limitaciones porque no elimina el espectro completo de microorganismos y además necesita un extenso periodo de tiempo para proporcionar su efecto antibacterial <sup>(5)</sup>.

Actualmente se está investigando extensamente la utilización de sustancias alternativas a los medicamentos tradicionales que incluyen productos químicos producidos en laboratorios y de extractos que provienen de la naturaleza, es así que los bioquímicos, botánicos, microbiólogos, y etnofarmacólogos están investigando el uso de sustancias fitoquímicas para el tratamiento de patologías basados en productos naturales.

Una sustancia que ha demostrado actividad antimicrobiana es el extracto etanólico de Propóleo de *Apis mellifera* <sup>(6,7)</sup>; sin embargo, su composición y propiedades varía de acuerdo con la región donde es recolectado por tanto sus indicaciones terapéuticas todavía no han sido bien establecidas siendo utilizada de manera poco profesional <sup>(7)</sup>. El Propóleo es un producto de la colmena que las abejas elaboran a partir de sustancias que recolectan principalmente de la yema de los árboles y arbustos mezclándolas con las enzimas de su saliva para convertirla en un potente antibiótico con el que protegen la estructura de su colmena con el fin de eliminar los virus, hongos y bacterias que puedan colonizarla; es así que debido a sus propiedades está aumentando el interés por esta sustancia natural que va ganando espacio como un efectivo antimicrobiano <sup>(6)</sup>.

El Propóleo tiene poco estudio en el área odontológica, sin embargo, ya ha sido utilizado como medio de almacenamiento para dientes avulsionados, prevención de la caries dental, hipersensibilidad dentinaria, terapia vital de la pulpa, efectos

antireabsorción de tejidos duros y como irrigante endodóntico, pero su uso como medicamento endodóntico intraconducto todavía no ha sido ampliamente evaluado <sup>(8)</sup>.

El extracto de *Morinda citrifolia*, comercialmente conocido como Noni es propio de países tropicales y es considerado como un importante medicamento tradicional, a su extracto le atribuye un amplio espectro de efectos terapéuticos entre ellos ser antibacteriano, antimicótico, antiviral, antitumoral, antihelmíntico, analgésico, antiinflamatorio y de mejorar el sistema inmunológico <sup>(9)</sup>.

Murray y col. compararon la eficacia del jugo de *Morinda citrifolia* (MCJ), hipoclorito de sodio (NaClO) y el gluconato de clorhexidina para remover el barro dentinario de piezas dentarias instrumentadas que fueron previamente inoculadas con *Enterococcus faecalis*; concluyeron que 6% de MCJ mas ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) podría ser utilizado como un irrigante endodóntico con resultados similares al NaClO en combinación con el EDTA <sup>(9)</sup> por lo tanto la MCJ parece ser el primer extracto de fruta identificado como posible alternativa al uso del NaClO como un irrigante endodóntico , pero al igual que el Propóleo su efecto antibacteriano como medicamento intraconducto frente al *E. faecalis* todavía no ha sido rigurosamente evaluado.

Por tal motivo, el presente estudio evaluó la eficacia antibacteriana del extracto de Propóleo de *Apis mellífera* al 1,5%, extracto de *Morinda citrifolia* al 6% y el Hidróxido de calcio usados como medicación endodóntica intraconducto frente a una cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

## II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

### II.1 Planteamiento del problema.

En el tratamiento de la patología pulpo-periapical, el objetivo fundamental del tratamiento endodóntico consiste en eliminar los microorganismos de los conductos radiculares. Los medios que nos permiten cumplir este objetivo son la instrumentación biomecánica, la irrigación y en algunos casos la medicación intraconducto que tenga probada capacidad antimicrobiana y a la vez sea compatible con el tejido periapical<sup>(10)</sup>.

En las investigaciones de los últimos años se evidencia que en los fracasos endodónticos hay una mayor prevalencia de las especies bacterianas *E. faecalis* y *Actinomyces israelí*<sup>(11,12)</sup> es más, el *E. faecalis* es el que tiene la más alta probabilidad en ser encontrado en casos de infección post endodoncia porque está reportado que a esta bacteria la falta de nutrientes y /o oxígeno parecen incrementar su resistencia de forma sustancial<sup>(10)</sup>.

Para el tratamiento de conductos con o sin lesión osteolítica periapical, algunos clínicos aconsejan realizar el tratamiento endodóntico en más de una sesión, dejando un medicamento en los conductos para aumentar la desinfección de los mismos<sup>(13)</sup>. Al  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  se le atribuye la condición de medicamento por su propiedad bactericida, disolución tisular e inhibición de la reabsorción dental; su pH alcalino altera los lipopolisacáridos presentes en la pared celular de muchas bacterias anaerobias teniendo un efecto destructivo sobre sus membranas y sus estructuras proteicas, sin embargo, no es efectivo en eliminar las bacterias alojadas dentro de los túbulos dentinarios<sup>(10)</sup>. Vasudeva y cols. reportaron que a



pesar del éxito del  $\text{Ca (OH)}_2$  como medicamento intraconducto el *E. faecalis* es resistente a sus efectos y puede sobrevivir a condiciones adversas debido a su capacidad para la formación de biopelículas haciéndolas más resistentes a las fagocitosis, anticuerpos y agentes antimicrobianos <sup>(14,15)</sup>.

Distel y col. reportaron que aumentar el pH con  $\text{Ca (OH)}_2$  en tratamientos endodónticos de varias sesiones a los microorganismos los vuelve resistentes, difíciles de eliminar y por tanto son los responsables de las lesiones persistentes <sup>(16)</sup>, reporta además que el empleo del  $\text{Ca (OH)}_2$  como medicamento intraconducto induce la formación de biopelículas de *E. faecalis* porque esta bacteria puede sobrevivir a un pH similar o superior a 11.5; por lo tanto, algunos fracasos de terapias con  $\text{Ca (OH)}_2$  se debe a que al cambiar el pH favorecen la adaptación del microorganismo potencializando su resistencia y persistencia <sup>(16)</sup>.

La investigación de extractos naturales como el Propóleo y la Morinda en el área de la medicina están demostrando su gran utilidad como antimicrobianos. En odontología se están usando por sus propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y de reparación tisular, pero sus efectos antibacterianos frente al *E. faecalis* todavía no han sido rigurosamente evaluados <sup>(3,17)</sup>.

Buscando así un medicamento intraconducto que supere en eficacia al hidróxido de calcio nos planteamos la siguiente pregunta:

**¿Se encontrarán diferencias en la capacidad antibacteriana entre el extracto etanólico de Propóleo de *Apis mellifera* al 1,5%, extracto de *Morinda citrifolia* al 6% y el  $\text{Ca (OH)}_2$  usados como medicación endodóntica frente a una cepa de *E. faecalis* ATCC 29212 infectando bloques de dentina in vitro?**

### III. MARCO TEÓRICO

Un considerable número de bacterias han sido identificadas como habitantes característicos de la mucosa oral. Sin embargo, el número decrece en conductos con pulpa necrótica, donde las condiciones son diferentes por los bajos niveles de nutrientes y la baja disposición de oxígeno. Estas condiciones son ideales para el crecimiento de bacterias anaerobias estrictas y facultativas como el *E. faecalis* el cual sobrevive, se multiplica y causa infecciones que inducen a la reabsorción ósea<sup>(9)</sup>.

Los Enterococcus son parte de la flora normal de la cavidad oral y tracto gastrointestinal y son reconocidos porque causan el 12% de las infecciones nosocomiales. El *E. faecalis* cuenta con alrededor del 80 % del total de infecciones causadas por Enterococcus y su rol en las infecciones persistentes de los conductos radiculares es un gran desafío por ser la especie prevalente más aislada en piezas con diagnóstico de periodontitis apical asintomática y en el fracaso del tratamiento endodóntico<sup>(5,18,19,20)</sup>.

*E. faecalis* es una bacteria coccal Grampositiva, anaerobia facultativa, capaz de vivir en 6,5 % de NaClO y sobrevivir 30 minutos en 60°C y a un pH mayor a 9,6. Además, cuando se exponen al estrés ambiental pueden adoptar un estado existente viable y resurgir cuando se restablecen las condiciones normales<sup>(21)</sup>. Según Shabahang<sup>(22)</sup> en conductos radiculares infectados estas bacterias pueden estar presentes durante el tratamiento endodóntico y son las bacterias predominantes en dientes, en donde los tratamientos de conductos radiculares han fracasado<sup>(23)</sup>. También se ha postulado que el factor virulento del *E. faecalis* en

los fracasos endodónticos y resultados adversos en los procedimientos de endodoncia regenerativa puede estar relacionado a la habilidad de estas bacterias a invadir rápidamente túbulos dentinarios y adherirse al colágeno en presencia de suero humano <sup>(23, 24,25)</sup>.

El rol del *E. faecalis* en infecciones endodónticas agudas y reagudizadas no ha sido muy estudiado. Pinheiro y col. <sup>(26)</sup> encontraron que es inicialmente las bacterias anaerobias y no los *E. faecalis* u otros *Enterococcus* los responsables de reagudizaciones en dientes con tratamiento de conductos fallidos. En un estudio de periodontitis apical primaria usando la técnica de reacción de cadena de la polimerasa (PCR) para detección de bacterias, Siquiera y col. <sup>(27)</sup>, encontraron que el *E. faecalis* es más frecuente en dientes con periodontitis apical asintomática que en dientes con síntomas agudos y aunque es la especie predominante en dientes con tratamiento de conducto previo con periodontitis apical, no hay consenso que sea el causante de las infecciones agudas severas <sup>(18)</sup>.

Una variedad de agentes antimicrobianos está siendo evaluados para eliminar el *E. faecalis* de los conductos radiculares <sup>(28,29)</sup>. Estos incluyen medicación con Ca (OH)<sub>2</sub>, paramonoclorofenol alcanforado, combinaciones de antibióticos-esteroides así también irrigantes como el NaClO, clorhexidina, MTAD, y componentes yoduro <sup>(30, 31,32)</sup>. Sin embargo, el *E. faecalis* ha demostrado ser la bacteria más resistente al Ca (OH)<sub>2</sub> en vivo o in vitro sólo superado por la *Cándida albicans* a una exposición directa saturada de Ca (OH)<sub>2</sub> como lo demostró Waltimo y col. en el que el *E. faecalis* es eliminado solo si es expuesto entre seis a diez minutos <sup>(33)</sup>; sin embargo, la experiencia clínica en experimentos in vitro usando bloques de

dentina inoculados con *E. faecalis* ha demostrado claramente que es difícil, si no imposible eliminar la bacteria en dentina, aun después de periodos de incubación con Ca (OH)<sub>2</sub> saturado <sup>(19)</sup>.

Algunos estudios no solo han reportado la supervivencia *E. faecalis* a la medicación intraconducto con Ca (OH)<sub>2</sub> saturado entre múltiples citas, sino también su presencia en biopelículas en dientes extraídos que habían sido medicados y después obturados con sellador endodóntico a base de Ca (OH)<sub>2</sub> <sup>(16,34)</sup>. La configuración de biopelículas facilita al *E. faecalis* colonizar los conductos radiculares medicados y se ha reportado que puede ser hasta mil veces más resistente a los medicamentos endodónticos cuando se encuentra adherida a una superficie y no en un medio acuoso <sup>(35)</sup>.

En los últimos años hay gran interés por estudiar extractos naturales que posean propiedades farmacológicas con efecto antimicrobiano, se han publicado varios artículos que informan sobre las propiedades antimicrobianas de extractos, aceites esenciales, resinas y diversas clases de compuestos aislados de diversas plantas; sin embargo, todavía falta un análisis completo de sus agentes antimicrobianos. En las plantas los principios activos están biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias que van a interactuar entre sí, de forma tal que no se acumulan en el organismo, y sus efectos indeseables están limitados <sup>(36)</sup>.

El Propóleo es una resina natural producida por las abejas y se le atribuye propiedades antibacteriales, antivirales, antifúngicas, antioxidantes, y antiinflamatorias <sup>(6)</sup>. En general su composición química es compleja y depende de

su fuente vegetal, del clima, la temporada, la ubicación y el año. Principalmente se compone de 50% de resinas y bálsamos, 30% de cera de abeja, 10% de aceites esenciales o volátiles, 5% de polen y 5% de materiales diversos (orgánicos y minerales). Los principales elementos químicos que lo componen son los flavonoides, fenoles, y componentes aromáticos, es más a los flavonoides se le atribuye todas sus propiedades medicinales <sup>(37)</sup>.

Se está estudiando in vitro, en animales y en menor número en humanos el uso y efectividad del Propóleo en el campo de la endodoncia. Pimenta y col. <sup>(38)</sup> evaluaron la actividad antimicrobiana in vitro del Propóleo pardo brasileño y el Ca (OH)<sub>2</sub> como medicamentos intraconductos contra el *E. faecalis*; reportaron que la pasta de propóleo marrón al 20% en combinación con Ca (OH)<sub>2</sub> y la pasta de propóleo marrón al 40% mostraron mejores resultados en comparación con la pasta de Ca (OH)<sub>2</sub>.

Cunha y col. <sup>(32)</sup> evaluaron la actividad antibacteriana de los medicamentos utilizados en el tratamiento de endodoncia regenerativa frente a una cepa de *E. faecalis* ATCC 29212; reportaron que la medicación con propóleo y Ca (OH)<sub>2</sub> fueron tan efectivos como la pasta antibiótica tradicional TAP (Metronidazol, Ciprofloxacina y Minociclina) y TAP modificada con clindamicina pero con una reacción menos inflamatoria y un aumento de bioactividad con importante depósito de tejido en las paredes de la dentina además de la estimulación de factores crecimiento y células madre.

La Morinda citrifolia, comercialmente conocida como Noni, es una fruta indígena de países tropicales, considerado como una importante medicina tradicional.

También es llamada Mora india, Nono, Queso de fruta y Nhan en varias culturas a través del mundo. Su extracto tiene un amplio espectro de efectos terapéuticos que incluyen propiedades antibacterianas, antiinflamatorias, antifúngicas, antivirales, antitumorales, analgésicas, antihelmínticas, hipotensoras y refuerzan el sistema inmunológico<sup>(9)</sup>.

Chaitanya y col.<sup>(39)</sup> encontraron en la *Morinda citrifolia*, que la presencia de acubina, L-asperulosida, alizarina y algunos compuestos de antraquinona pueden ser los responsables de su actividad antibacteriana; además, Duncan<sup>(40)</sup> demostró que la escopoletina presente en la *Morinda* inhibe la actividad de *E. coli* y el *Helicobacter pylori* ayudando en el tratamiento de la úlcera gástrica.

El probable uso del extracto de *Morinda citrifolia* como un irrigante y/o medicamento endodóntico intraconducto quizás sea de interés a profesionales endodoncistas y de práctica general como parte de la tendencia creciente de buscar alternativas naturales como parte del éxito del tratamiento y quizás sea ventajoso porque es un antioxidante biocompatible improbable de causar quemaduras severas que quizás ocurran por extravasación del hipoclorito de sodio o del  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  al periápice.

Kandaswamy y col.<sup>(9)</sup> investigaron la actividad antimicrobiana de diferentes sustancias usadas como medicación endodóntica: Clorhexidina gel al 2%, Propóleo, extracto de *Morinda citrifolia*, yodo povidona al 2% e hidróxido de calcio en conductos radiculares infectados con *E. faecalis* a una profundidad de 200 $\mu\text{m}$  y 400 $\mu\text{m}$  en periodos de evaluación de tres días (días 1, 3 y 5); concluyeron que el Propóleo y el extracto de *Morinda citrifolia* fueron efectivos

contra el *E. faecalis* en túbulos dentinarios de dientes extraídos, con mejores resultados que el Ca (OH)<sub>2</sub>.

Choudhary y col. <sup>(2)</sup> evaluaron la eficacia de preparados comerciales indios en la irrigación endodóntica como la *Morinda citrifolia* y el jugo de *Triphala* frente al *Enterococcus faecalis* y *Cándida albicans* en busca de alternativas seguras al hipoclorito de sodio como irrigantes endodónticos; concluyeron que los irrigantes a base de hierbas prometen convertirse en irrigantes eficientes y justifican una mayor investigación.

En la actualidad, todo lo que pueda representar un beneficio potencial para la salud del hombre y los seres vivos debe ser investigado y contrastado con otros estudios para comprobar su real efectividad. El extracto de Propóleo y la *Morinda citrifolia*, tienen entre sus componentes principios activos que les confieren prometedoras propiedades farmacoterapéuticas, antimicrobianas, antioxidantes entre otras por lo que es necesario una mayor investigación en el campo de la salud.

#### IV. JUSTIFICACION DEL ESTUDIO

Esta investigación fue motivada por el deseo de encontrar un medicamento endodóntico intraconducto que pueda utilizarse en aquellos casos en que el *Enterococcus faecalis* es causante de los fracasos endodónticos sin tener los efectos tóxicos sobre la región apical y periapical, proponiendo al extracto etanólico de Propóleo de *Apis mellifera* y al extracto de *Morinda Citrifolia* como alternativas debido a que estos compuestos tienen además de su probada capacidad antibacteriana efectos antiinflamatorios que favorecerían la reparación tisular y otras características fisicoquímicas que pueden modular los efectos controversiales de la pasta de hidróxido de calcio.

Esta investigación además de tener relevancia clínica por presentar sustancias antibacterianas y antiinflamatorias alternativas para el control antimicrobiano y la inflamación, también tiene relevancia social ya que al concluir con las fases de investigación, podríamos contar con dos alternativas más eficaces contra el *Enterococcus faecalis* y de esta manera podríamos evitar a largo plazo las pérdidas de piezas dentarias por fracasos y sobrecostos en las terapias endodónticas.

La presente investigación tiene importancia debido a que contribuirá con el conocimiento científico, evaluando dos extractos naturales que podrían ser usados como medicamentos endodónticos intraconductos: Extracto etanólico de Propóleo de *Apis mellifera* al 1,5% y extracto de *Morinda Citrifolia* al 6%, para el uso clínico contra las bacterias resistentes en el conducto radicular, en este caso el *E. faecalis* ATCC 29212.



## **V. OBJETIVOS**

### **V.1 Objetivo general:**

Evaluar in vitro la actividad antibacteriana del extracto etanólico de Propóleo al 1,5%, extracto de Morinda citrifolia al 6% y el Hidróxido de calcio en pasta usados como medicamentos endodónticos intraconductos sobre bloques de dentina infectadas con una cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

### **V.2 Objetivos específicos**

1. Determinar in vitro en unidades formadoras de colonias (CFU), la actividad antibacteriana del extracto etanólico de Propóleo al 1,5%, extracto de Morinda citrifolia al 6% y del Hidróxido de calcio en pasta usados como medicamentos endodónticos intraconductos sobre bloques de dentina infectados con una cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 a las 48 y 72 horas.
2. Comparar in vitro en unidades formadoras de colonias (CFU), la actividad antibacteriana del extracto etanólico de Propóleo al 1,5%, extracto de Morinda citrifolia al 6% y del Hidróxido de calcio en pasta usados como medicamentos endodónticos intraconductos sobre bloques de dentina infectados con una cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 a las 48 y 72 horas.

## **Hipótesis**

El extracto etanólico de Propóleo de *Apis mellifera* al 1,5% y el extracto de *Morinda citrifolia* al 6% usados como medicación endodóntica intraconducto producen in vitro una mayor actividad antibacteriana que el hidróxido de calcio en pasta sobre bloques de dentina infectada con una cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 a las 48 y 72 horas.

## **VI. METODOLOGIA**

### **VI.1 Diseño del Estudio**

Experimental in vitro.

### **VI.2. Muestra**

Para calcular el tamaño de la muestra se realizó una prueba piloto usando el 10 % del tamaño de la muestra del artículo base Kandaswamy y col. <sup>(10)</sup> con 5 placas de cultivo que incluyen 5 bloques de dentina por cada uno de los tiempos, cepa y medicación utilizados con el objetivo de determinar la dilución a la que se podían leer las UFC. Después de realizar la prueba piloto se aplicó la fórmula estadística para la comparación de medias y con ello se determinó el tamaño definitivo del grupo de estudio experimental con un mínimo de cultivos de 10 muestras (cada placa con 1 bloque de dentina) por cada tiempo y medicación. (Anexo 1).

#### **Unidad de Análisis:**

Cada placa de cultivo de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

#### **Diseño muestral:**

Muestra probabilística aleatoria simple.

### **VI.3 Criterios de selección.**

#### **VI.3.1. Criterios de inclusión.**

- Cepa perteneciente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 certificadas por la unidad de Microbiología de LID de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.
- Raíces de premolares humanos inferiores con ápices completos y permeables.
- Raíces de premolares humanos inferiores sin tratamiento endodóntico previo.
- Raíces de premolares humanos inferiores con curvatura menor a 30 grados según la técnica de Schneider.

### **VI.3.2. Criterio de exclusión.**

- Raíces de premolares humanos inferiores fracturados.
- Raíces de premolares humanos inferiores calcificados.
- Raíces de premolares humanos inferiores con caries radicular.
- Raíces de premolares humanos inferiores con reabsorciones internas o externas.

### **VI.4 Operacionalización de variables.**

#### **Variable independiente:** Medicación Intraconducto

Variable cualitativa nominal politómica que se refiere al tipo de medicación intraconducto, implica 3 categorías:

1. Extracto etanólico de Propóleo de *Apis mellifera* al 1,5%.
2. Extracto de *Morinda citrifolia* al 6%.
3. Hidróxido de calcio en pasta.

#### **Variable dependiente:** Actividad Antibacteriana

Variable cuantitativa, continua, de razón que indica el crecimiento bacteriano.

Tendrá como categoría la unidad formadora de colonias (CFU).

#### **Covariable:** Tiempo de Evaluación

Variable cualitativa, dicotómica, ordinal que indica el periodo de duración del proceso de exposición al medicamento intraconducto establecido en horas que implica 2 categorías:

1. 48 horas.
2. 72 horas.

## **VI.5. Procedimientos y/o Técnicas**

### **Método:**

- Observación

### **Técnicas:**

- Aislamiento de la bacteria *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 certificada.
- Cultivo en placas: Conteo en Unidades Formadoras de Colonias (CFU)

### **Validación del instrumento y calibración.**

Para el control del sesgo del observador se llevó a cabo la calibración inter e intra examinador <sup>(41)</sup> hasta obtener un coeficiente kappa de 0,8 (concordancia sustancial).

### **Pruebas de identificación del *Enterococcus faecalis*.**

La cepa de *E. faecalis* ATCC 29212 certificadas fueron donadas por el laboratorio de Microbiología de LID de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Para reactivar la cepa fue cultivada en caldo infusión de cerebro y corazón de Brain Heart Infusión (BHI) 37° C por 24 horas. Adicional a eso se utilizó 2 pruebas de confirmación: la coloración Gram y prueba química de catalasa.

Para la identificación por coloración Gram, se utilizó una lámina portaobjeto, para lo cual se colocó una gota de agua destilada junto a una pequeña cantidad de colonias de *E. faecalis* con ayuda del asa de siembra y se procedió a la coloración GRAM. Se observó al microscopio óptico con objetivo de 100X, observándose cocos Gram positivos que se disponen en parejas y en cadenas cortas. En la prueba de catalasa, se realizó con el asa de siembra la inoculación de una colonia de bacterias de *E. faecalis* en la lámina portaobjeto que contenía una gota de

peróxido de hidrógeno y se procedió a realizar un proceso de agitación encontrándose que es catalasa negativa por la ausencia de burbujas en la reacción.

### **Preparación del modelo in vitro de infección de los túbulos dentinarios.**

Según un modelo in vitro para la infección de los túbulos dentinarios, el conducto radicular fue preparado de acuerdo con estudios previos realizados por Haapasalo<sup>(23)</sup> con modificaciones menores. Premolares inferiores fueron almacenados en 0,5% de NaClO por 12 horas para la desinfección superficial. La porción apical y la corona fueron cortadas con un disco de diamante bajo agua-refrigerada quedando bloques de 5 mm de alto y 6mm de diámetro. Los conductos radiculares fueron ampliados con una fresa redonda ISO 18 a 700 RPM (motor ATR-TECNICA) para estandarizar el diámetro. El barro dentinario de cada bloque fue removido con un baño de ultrasonido (APARATO BIOSONIC UC-50 C/CANASTA) con EDTA al 17% (pH 7.8) por 4 minutos y NaClO 5% por 4 minutos más. Los restos de los compuestos químicos utilizados en estos baños fueron eliminados sumergiendo los bloques de dentina en agua destilada por 5 min.

Los bloques de dentina fueron inmediatamente esterilizados por autoclave (Systec lab) por 2 periodos en agua por 15 min a 121° C e incubados (Copreva S.A.I.C.) en caldo Brain Heart Infusión (BHI) por 24 horas a 37° C para comprobar la esterilidad de los bloques; posteriormente los bloques de dentina fueron colocados en tubos de ensayo con 2 ml de caldo BHI conteniendo *E. faecalis* con un tamaño de inóculo de  $1,55 * 10^8$  cfu/ml e incubados por 21 días donde el medio de cultivo fue cambiado diariamente por centrifugado. A los 21 días se volvió a realizar la tinción Gram para verificar la supervivencia de las bacterias. (Anexo 2).

### **Obtención del Propóleo**

La muestra de Propóleo bruto a usarse fue adquirida de la tienda La Casa de la Miel, cuyo dueño es el Sr. Fritz Frey Nano, conocido apicultor del valle de Oxapampa, en el departamento de Pasco, Perú. Dicha muestra de Propóleo bruto sirvió de base para preparar la solución matriz (solución de Propóleo estandarizada), a partir de la cual se elaboró la concentración necesaria para el experimento del presente estudio.

### **Preparación de la muestra del Propóleo**

La solución matriz (solución estandarizada) y el medicamento endodóntico experimental (concentración al 1,5%, de extracto etanólico de Propóleo) fue preparada en el Laboratorio de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina, dirigido por por el magíster en Ciencias Julio César Bracho Pérez.

### **Pasos**

1. Se cosechó el Propóleo en apiarios de Oxapampa (Abejas de la especie *Apis mellifera L.*) y se almacenaron en bolsas en bolsas oscuras alejadas de la luz.
2. Se transportó hacia el laboratorio, se eliminaron las impurezas y se congeló a temperatura de -20 °C a -40 °C por 48 horas.
3. Se procedió a moler la masa de Propóleo.
4. Se coloca 36 g de Propóleo en 100 ml de solución hidroalcohólica (70% de etanol y 30% de agua bidestilada).
5. Maceración por 15 días y se realiza la extracción del extracto por filtrado (con papel filtro Whatman N°4).

6. La muestra filtrada fue llevada al rotavapor para eliminar el etanol; luego se colocó en una estufa a 50° C por 48 horas hasta la obtención de un peso constante donde se obtuvo 5 gr de extracto blando de Propóleo. Se estandarizó extracto de Propóleo al 5% (p/v) que contiene los principios activos del Propóleo que incluyen flavonoides, aceites esenciales, resinas y bálsamos.
7. Se envasó en frascos ámbar y se conservó en lugar seco alejado de la luz.

De esta solución matriz (solución estandarizada al 5% p/v) se elaboró la solución experimental al 1,5%. Se preparó un gel a partir de 10 g de metilcelulosa en agua destilada, se agregó cuidadosamente con agitación continua 30 ml del extracto obtenido hasta obtener 100 ml de producto terminado (anexo 3).

#### **Preparación de la muestra de la Morinda Citrifolia.**

La plantación de la Morinda citrifolia se encuentra a 30 minutos de la ciudad de Bagua-Amazonas-Perú, donde es cultivada por el agricultor Facundo Castillo Vega en 3.5 hectáreas de terreno virgen (primera siembra), producido con técnicas naturales sin utilizar foliares, herbicidas e insecticidas (plantación orgánica) y cosechadas con el mejor cuidado posible para no perjudicar su concentración y sustancias activas.

La preparación del extracto al 100% estuvo a cargo del Ingeniero Químico Aldo Castillo Cardozo quien siguió el siguiente proceso para su obtención:

1. Recolección: Las frutas fueron cosechadas cuidadosamente porque no resiste a los golpes. Este proceso se realizó por personal debidamente entrenado.
2. Lavado, almacenamiento y drenaje de líquido: Se almacenó en unos recipientes de dos niveles que son separados por una malla inoxidable que permite el drenaje de los líquidos que tiene dicha fruta. Este proceso empieza



desde el día 1 hasta el día 20. Para este estudio se recolecto a 15 días de drenaje (cuanto más tiempo la acidez, el sabor y el olor se incrementan).

3. Envasado: El líquido procedente de la fruta pasó por un proceso de Pasteurización (60°C) para inactivar el proceso de fermentación por posibles contaminantes.
4. Se envasó para esta investigación en una botella de vidrio color ámbar a dos días de haber drenado su extracto. El transporte a la ciudad de lima estuvo a cargo del ingeniero Aldo Castillo Cardozo.

La solución experimental (6% de extracto de Morinda Citrifolia con metilcelulosa) fue preparada por el magíster en Ciencias Julio César Bracho Pérez. (Anexo 4)

### **Test de Desinfección de los Bloques Infectados**

Las pruebas de desinfección de los bloques infectados fueron realizados según estudios previos con modificaciones menores <sup>(23)</sup>. Al final de los 21 días, los especímenes fueron irrigados con 5ml de solución salina para remover el crecimiento de la colonia. Se dividió en 3 grupos (n=66 bloques de dentina) Grupo 1, hidróxido de calcio; Grupo 2, Propóleo 1,5%; Grupo 3, MCJ 6% y solución salina (control negativo); La concentración mínima inhibitoria del Propóleo y la Morinda citrifolia también fue determinada por estudios previos <sup>(5,9)</sup>, el hidróxido de calcio fue mezclado con solución salina estéril en una proporción de 1:5 para obtener una consistencia en pasta. La metilcelulosa se utilizó como un agente de espesamiento para los grupos 2 y 3 que también esta reportada en estudios previos <sup>(10)</sup>. Las sustancias experimentales fueron colocadas dentro de los conductos y selladas a sus dos extremos con parafina. Posteriormente se

incubaron en placas Petri en un ambiente anaeróbico a 37°C. Al final de las 48 y 72 horas se lavaron los conductos con suero estéril para retirar las sustancias experimentales. Después los especímenes fueron secados con gasa estéril y las superficies pulpares del bloque de dentina fueron raspadas con una fresa redonda estéril ISO 20 en baja velocidad (700 RPM). Los restos dentinarios de la superficie pulpar fueron recolectados con una fresa redonda estéril en una profundidad de 200 µm, estos restos dentinarios y la fresa incluida fueron recolectados en 10 ml de caldo de BHI e incubados en un medio anaerobio a 37°C por 24 horas. Pasadas las 24 horas para contar las CFU de *E. faecalis* se obtuvieron diluciones seriadas en 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> y 10<sup>-4</sup>. Se tomó 0,1ml de la dilución más 20ml de agar de cultivo (Agar Soya Trypticaseína) fueron colocados en placa Petri e incubados por 24 horas (anexo 5). Las unidades de formación de colonias (CFU) fueron contadas y anotadas en fichas (anexo 6) usando el método spread-plate (anexo 7) según el manual de procedimientos del laboratorio de microbiología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia; previo a esto se volvió a realizar una tinción Gram a las muestras para corroborar que las bacterias son *E. faecalis* infectando los conductos radiculares después de la medicación intraconducto.

#### **VI.6. Consideraciones éticas**

En este estudio se utilizaron premolares inferiores extraídos por motivos ajenos a este estudio que fueron donados por colegas de la especialidad de ortodoncia para esta investigación. El cultivo, la manipulación y desecho de las muestras de las cepas *E. Faecalis* se realizaron de acuerdo con el manual de Bioseguridad en Laboratorios de Microbiología de la UPCH. Además, se obtuvo la exoneración de

revisión del Comité institucional de Ética en Investigación de la UPCH por no involucrar el uso de animales de experimentación, así como de poblaciones humanas (Anexo 8).

#### **VI.7 Plan de análisis.**

Una vez obtenido los resultados se procedió a un análisis descriptivo mediante la obtención de la media, desviación estándar, mínimos y máximos en función de las unidades formadoras de colonias (UFC) según los medicamentos utilizados y las horas de evaluación.

Posterior a ello se aplicó la prueba de Shapiro Will para determinar la normalidad de los datos, el cual demostró que las UFC presentaron una distribución normal, es así que, la prueba utilizada para determinar las diferencias de promedios fue la prueba T de Student, para analizar según medicamentos utilizados y tiempos de evaluación. De igual forma, cuando se evaluó cuál de los tres medicamentos tenía mayor eficacia la prueba seleccionada fue la Prueba de Análisis de Varianza (ANOVA). En este estudio se utilizó el programa SPSS v.17 y se trabajó con un nivel de confianza del 95% con un  $p < 0.05$ .

## VII. RESULTADOS.

El presente estudio tuvo como propósito evaluar in vitro la actividad antibacteriana de tres sustancias experimentales usada en esta investigación como medicamentos intraconductos: hidróxido de calcio en pasta, extracto etanólico de Propóleo de *Apis mellifera* al 1,5% y extracto de *Morinda citrifolia* al 6%. Se realizaron cultivos de colonias de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 sobre dentina de premolares humanos, los cuales posteriormente fueron sometidos a las diversas sustancias experimentales y se realizaron las evaluaciones por conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) a las 48 y 72 horas.

En este estudio se utilizaron 11 muestras por cada tipo de sustancia experimental con tiempos de 48 horas y 72 horas para verificar si el crecimiento bacteriano en la placa de recuento es la misma, disminuye o aumenta. De las 11 muestras que se utilizaron por cada medicamento y tiempo de evaluación, no se pudieron hacer las lecturas de las UFC: hidróxido de calcio a las 72 horas (1 muestra), Propóleo (2 muestras) una a las 48 y otra a las 72 horas y *Morinda citrifolia* (1 muestra) a las 48 horas, todas ellas por problemas en el manejo de la temperatura del agar de soya en las placas Petri pero ello no altero los resultados puesto que la muestra mínima era de 10 unidades por cada sustancia experimental y tiempo de evaluación.

De los cultivos evaluados a las 48 horas, se observó que el mayor promedio de UFC se presentó en el hidróxido de calcio ( $8.27 \times 10^{-4}$ ) seguidos de la *Morinda citrifolia* ( $4.33 \times 10^{-4}$ ) y el Propóleo ( $4.15 \times 10^{-4}$ ) el cual resulto de mayor actividad antibacteriana. Los mismos resultados se obtuvieron cuando la

evaluación se hizo a las 72 horas con hidróxido de calcio ( $7.79 \times 10^{-4}$ ), *Morinda citrifolia* ( $4.76 \times 10^{-4}$ ) y Propóleo ( $3.35 \times 10^{-4}$ ). Además, se observó que en el caso del hidróxido de calcio y el Propóleo las UFC disminuyeron con el tiempo, efecto contrario sucedió en el caso de la *Morinda citrifolia*. En el análisis estadístico para comparar las diferencias de las medias entre cada una de las sustancias experimentales usadas como medicamentos Endodónticos intraconductos según el tiempo de evaluación, se puede afirmar que no existe diferencias estadísticamente significativas al momento de evaluar el conteo de UFC (Tabla N° 1).

Cuando se hizo el análisis de la actividad antibacteriana de las tres sustancias experimentales usadas como medicamentos intraconductos frente al *E. faecalis* en cada tiempo de evaluación mediante el promedio de las UFC, a las 48 y 72 horas se reportó en ambos casos diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.012$  y  $p < 0.005$ , respectivamente) donde la respuesta antibacteriana del Propóleo es mayor, seguido de la *Morinda citrifolia* y al final el hidróxido de calcio. (Tabla N° 2)

Finalmente se evaluó la actividad antibacteriana comparando las sustancias experimentales por pares mediante sus promedios de UFC; A las 48 horas se registraron diferencias estadísticamente significativas a favor del Propóleo ( $p < 0.026$ ) y la MCJ ( $p < 0.029$ ) ambas frente al hidróxido de calcio; sin embargo, no se registró esta diferencia significativa entre el Propóleo y la MCJ ( $p > 0.05$ ). A las 72 horas sólo existió diferencia estadística significativa a favor del Propóleo frente al hidróxido de calcio ( $p < 0.004$ ) (Tabla N° 3)

Los resultados obtenidos bajo las condiciones de este estudio confirman la hipótesis inicial planteada en esta investigación: El extracto de Propóleo y el extracto de *Morinda citrifolia* usados como medicamentos intraconductos experimentales producen in vitro una mayor actividad antibacteriana que el hidróxido de calcio sobre bloques de dentina infectadas con una cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 a las 48 y 72 horas.

**Tabla N° 1**

**Comparación de la respuesta antibacteriana frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 según tiempo de evaluación.**

<b>Medicamento Intraconductor</b>	<b>Tiempo</b>	<b>n</b>	<b>Media<sup>+</sup></b>	<b>Desv. Est.<sup>+</sup></b>	<b>P*</b>
Hidróxido de Calcio	48 horas	11	8.27	4.35	0.594
	72 horas	10	7.79	3.34	
Propóleo 1,5%	48 horas	10	4.15	2.35	0.426
	72 horas	10	3.35	2.28	
Morinda citrifolia 6%	48 horas	10	4.33	2.62	0.970
	72 horas	11	4.76	2.81	

\*: Prueba T para Muestras Relacionadas

+: Valores de UFC x 10<sup>-4</sup>

**Tabla N° 2**

**Comparación de la respuesta antibacteriana frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 según medicamento intraconductor.**

<b>Tiempo</b>	<b>Medicamento Intraconductor</b>	<b>n</b>	<b>Media<sup>+</sup></b>	<b>Desv. Est.<sup>+</sup></b>	<b>P*</b>
48 horas	Hidróxido de Calcio	11	8.27	4.35	<b>0.012</b>
	Propóleo 1,5 %	10	4.15	2.35	
	Morinda citrifolia 6%	10	4.33	2.62	
72 horas	Hidróxido de Calcio	10	7.79	3.34	<b>0.005</b>
	Propóleo 1,5%	10	3.35	2.28	
	Morinda citrifolia 6%	11	4.76	2.81	

\*: Prueba de Análisis de Varianza

+: Valores de UFC x 10<sup>-4</sup>

**Tabla N° 3**

**Comparación de la respuesta antibacteriana frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 según medicamento intraconducto.**

<b>Tiempo</b>	<b>Medicamento Intraconducto</b>	<b>n</b>	<b>Media<sup>+</sup></b>	<b>Desv. Est.<sup>+</sup></b>	<b>P*</b>
48 horas	Hidróxido de Calcio	11	8.27	4.55	<b>0.026</b>
	Propóleo 1,5%	10	4.15	2.35	
	Hidróxido de Calcio	11	8.27	4.35	<b>0.029</b>
	Morinda citrifolia 6%	10	4.33	2.62	
	Propóleo 1,5%	10	4.15	2.35	0.992
	Morinda citrifolia 6%	10	4.33	2.62	
72 horas	Hidróxido de Calcio	10	7.79	3.34	<b>0.004</b>
	Propóleo 1,5%	10	3.35	2.28	
	Hidróxido de Calcio	10	7.79	3.34	0.054
	Morinda citrifolia 6%	11	4.76	2.81	
	Propóleo 1,5%	10	3.35	2.28	0.001
	Morinda citrifolia 6%	11	4.76	2.81	

\*: Prueba T para Muestras Relacionadas

+: Valores de UFC x 10<sup>-4</sup>



## VIII. DISCUSIÓN

En esta investigación se eligió al *E. faecalis* porque es un organismo facultativo que es fácil de cultivar y además coloniza los túbulos de manera eficiente y rápida. Este microorganismo se está utilizado ampliamente en las investigaciones del área de endodoncia porque se ha encontrado que está presente en el 63% de los dientes con periodontitis apical asintomática post tratamiento y puede sobrevivir en condiciones adversas debido a su capacidad para la formación de biopelículas haciéndolas más resistentes a la fagocitosis, los anticuerpos y los agentes antimicrobianos.<sup>(10)</sup>

En esta investigación, el modelo de diente extraído desarrollado por Haapasalo & Orstavik se modificó para incluir dientes humanos como muestras, proporcionando así una mejor simulación del entorno clínico para evaluar la eficacia de las sustancias experimentales usadas como medicamentos intraconductos en la desinfección de los túbulos dentinarios. Los bloques de dentina del conducto radicular se mantuvieron a un estándar de 5,0 mm de altura y 6 mm de diámetro para asegurar la colocación de una cantidad constante de bacterias durante la inoculación y medicación intracanal durante la desinfección. Las muestras se analizaron a una profundidad de los túbulos dentinarios de 200  $\mu\text{m}$ . porque se sabe que el medicamento intracanal como el hidróxido de calcio, penetra sólo hasta 200-300  $\mu\text{m}$ .<sup>(29)</sup>

Murray (2008), Chaitanya (2016), Choudhary (2018), Divia (2018) y Singh (2019) estudiaron al MCJ como irrigante intraconducto contra *E. Faecalis* y en todos ellos hubo disminución en diferentes grados de los recuentos microbianos,

pero como medicamento endodóntico intraconducto no ha sido evaluado ampliamente. <sup>(9, 39, 2, 3, 42)</sup> El presente estudio confirma la propiedad antibacteriana de esta fruta, sin embargo, esta eficacia disminuye cuando se evalúa a 48 y 72 horas. Si bien es cierto a las 72 horas pierde el nivel de significancia esto podría ser contrarrestado si elevamos la concentración del medicamento y/o aumentamos la muestra de manera significativa para futuras investigaciones.

Del Carpio-Perochena y col. <sup>(1)</sup> evaluaron la eficacia del extracto etanólico de propóleo (EPE) y las nanopartículas de quitosano (CNP) incorporados a una pasta de Ca (OH) <sub>2</sub> frente al *Enterococcus faecalis* después de 7 y 14 días; reportaron que los grupos de Ca (OH) <sub>2</sub>/EPE solo fueron efectivos en la eliminación de bacterias durante los primeros 7 días de tratamiento. En la presente investigación se encontró que la actividad antibacteriana del propóleo aumenta con el transcurrir de los días. Habría que ampliar los días de medicación en un próximo estudio para evaluar si con el transcurrir de los días la actividad antibacteriana también disminuye.

Lama y col. <sup>(5)</sup> evaluaron in vitro la efectividad antimicrobiana del Propóleo al 30% frente al *Enterococcus faecalis* utilizando matrices de dentina infectada y compararon su eficacia con la pasta de hidróxido de calcio cuando es usada como medicación intraconducto por periodos de 24 y 48 horas; reportaron que el Propóleo fue significativamente más efectivo que el hidróxido de calcio lo cual concuerda con los resultados de esta investigación con la diferencia que el muestreo microbiológico se realizó utilizando puntas de papel estéril, limas

headstrom e inmersión del disco. La evaluación fue en placas en placas Petri similar a la presente investigación.

Kandaswamy y col. <sup>(10)</sup>, evaluaron la eficacia antibacteriana del hidróxido de calcio en pasta, Propóleo y Morinda citrifolia frente al *Enterococcus faecalis*, reportaron que, existió una diferencia significativa del promedio de UFC cuando se compararon los medicamentos con el grupo control (solución salina), también reportaron que el Propóleo tiene una efectividad de 71%, la MCJ un 69% y el hidróxido de calcio 55% sin diferencias estadísticas entre el propóleo y la MCJ. Si bien los tiempos de evaluación fueron de 1, 3 y 5 días estos resultados concuerdan con los encontrados en esta investigación donde el propóleo y la MCJ son más eficaces contra E. faecalis en dentina de dientes extraídos frente al hidróxido de calcio.

Pimenta y col. <sup>(38)</sup> evaluaron la actividad antimicrobiana del propóleo pardo brasileño como medicamento intraconducto frente el *Enterococcus faecalis*, reportaron que la pasta de propóleo marrón al 40% y la pasta de propóleo marrón al 20% + pasta de hidróxido de calcio fueron más efectivas que la pasta de hidróxido de calcio con suero fisiológico; a diferencia de esta investigación ellos analizaron el crecimiento bacteriano por espectrofotometría después de 15 días y usaron dientes de bovinos recién extraídos. La conclusión fue que el propóleo pardo brasileño muestra capacidad antibacteriana contra E. faecalis.

Cuando el propóleo se usa en nanopartículas sus propiedades mejoran con respecto al propóleo común; por su reducido tamaño tienen la capacidad de

superar las barreras anatómicas y fisiológicas, son más fáciles de absorber y por tanto aumentan la actividad antibacteriana y antifúngica.

Parolia y col <sup>(29)</sup> en el 2020 usaron 240 dientes humanos extraídos para obtener 6 mm del tercio medio de la raíz similar a nuestro estudio. El conducto radicular se agrandó a un diámetro interno de 0,9 mm y las muestras se inocularon con *E. faecalis* durante 21 días. Las muestras se dividieron en ocho grupos (n = 30) según el medicamento colocado: grupo I: solución salina, grupo II: Quitosano, grupo III: Propóleo 100 µg / ml (P100), grupo IV: propóleo 250 µg / ml (P250), grupo V: Nanopartícula de quitosano-propóleo 100 µg / ml (CPN100), grupo VI: Nanopartícula de quitosano-propóleo 250 µg / ml (CPN250), grupo VII: hidróxido de calcio en pasta (CH) y grupo VIII: clorhexidina al 2% (CHX) gel. Se recogieron virutas de dentina a profundidades de 200 y 400 µm, y se hizo la lectura de UFC al final de los días 1, 3 y 7. CPN250 fue el más efectivo en la reducción de colonias de *E. faecalis* en el día 1 y 3 en ambas profundidades. En el día 7 CPN250 fue igualmente efectivo como CPN100 y CHX al 2%. De estos resultados se puede concluir que el propóleo usado en nanopartículas solo o en combinación sería más eficiente que el propóleo común que fue usado en la presente investigación.

Parolia y col <sup>(30)</sup> en el 2021 evaluaron el efecto antibacteriano de las nanopartículas de propóleo (NP) como irrigante endodóntico contra el *Enterococcus faecalis* dentro del sistema de conductos radiculares. Seccionaron 210 dientes humanos extraídos para obtener 6 mm del tercio medio de la raíz. El conducto radicular se amplió a un diámetro interno de 0,9 mm. Las muestras se

inocularon con *E. faecalis* durante 21 días y se dividieron en siete grupos, con 30 bloques cada grupo: grupo I: solución salina; grupo II: propóleo 100 µg / ml; grupo III: propóleo 300 µg / ml; grupo IV: nanopartículas de propóleo 100 µg / ml; grupo V: nanopartícula de propóleo 300 µg / ml; grupo VI: hipoclorito de sodio al 6%; grupo VII: clorhexidina al 2%. Se recogieron virutas de dentina a profundidades de 200 y 400 µm, y se determinó el número total de UFC al final de 1, 5 y 10 minutos. Nanopartículas de 300µg/ml (PN300) fue significativamente más eficaz en la reducción de UFC en comparación con todos los demás grupos ( $p < 0,05$ ) excepto 6% NaClO y 2% CHX ( $p > 0,05$ ) en todos los intervalos de tiempo y en ambas profundidades. A los cinco minutos, NaClO al 6% y CHX al 2% fueron los más eficaces para reducir las UFC ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre PN300, NaClO al 6% y CHX al 2% a los 10 min ( $p > 0,05$ ) por lo tanto PN300 fue tan eficaz como NaClO al 6% y CHX al 2% para reducir biopelículas de *E. faecalis*. Estos resultados podrían complementar a la medicación intraconducto un protocolo de irrigación con propóleo y/o *Morinda citrifolia* en aquellos casos donde la infección persistente es causante de los fracasos endodónticos.

En nuestra investigación cuando se evaluaron los datos en función del medicamento utilizado, se evidenció que a las 48 horas si existió diferencia significativa ( $p=0.012$ ) entre los tres medicamentos evaluados, siendo el más eficaz el Propóleo seguido de la *Morinda citrifolia* y al final el hidróxido de calcio resultados que se mantuvieron a la evaluación de 72 horas ( $p=0.005$ ). Queda claro entonces que bajo las condiciones de este estudio tanto el Propóleo como la *Morinda citrifolia* son adecuados sustitutos como agentes antimicrobianos en

función de su eficacia para disminuir el crecimiento bacteriano a las 48 y 72 horas, lo cual se apoya con los estudios previos.

La presente investigación pretende con sus resultados ser el inicio de nuevas investigaciones para tener mayor evidencia científica con respecto a las concentraciones, tamaño de partículas, tiempos adecuados para su utilización así como de las posibles consecuencias si es usado en el ser humano entre otros temas por investigar. De los resultados que se obtuvieran se podría optar por el Propóleo y la *Morinda citrifolia* como nuevos medicamentos intraconductos de mayor eficacia antibacteriana que el hidróxido de calcio que es utilizado en la actualidad.

## **IX. CONCLUSIONES.**

1. El extracto etanólico de Propóleo al 1,5%, extracto de *Morinda citrifolia* al 6% y el hidróxido de calcio en pasta presentan actividad antibacteriana in vitro sobre bloques de dentina infectadas con cepas de *E. faecalis* ATCC 29212 a las 48 y 72 horas.
2. El extracto etanólico de Propóleo al 1,5% y el extracto de *Morinda citrifolia* al 6% presentan in vitro mejor actividad antibacteriana estadísticamente significativa que el hidróxido de calcio en pasta sobre bloques de dentina infectadas con cepas de *E. faecalis* ATCC 29212 a las 48 y 72 horas.

## **X. RECOMENDACIONES**

1. Se necesitan más investigaciones para evaluar la biocompatibilidad de estas sustancias experimentales usadas como medicamentos endodónticos intraconductos con los tejidos periapicales y analizar el sinergismo entre los componentes del Propóleo, *Morinda citrifolia* e hidróxido de calcio.
2. En esta investigación, se evaluó la actividad antimicrobiana del Propóleo y la *Morinda citrifolia* frente a una sola especie. Aunque el *Enterococcus faecalis* se puede encontrar en casos de Infecciones persistentes, típicamente, la mayoría de las infecciones endodónticas son biopelículas de múltiples especies. Por lo tanto, los estudios futuros deben evaluarse frente a una biopelícula polimicrobiana.
3. En el futuro se debe realizar mayores investigaciones para evaluar la actividad del Propóleo y la *Morinda citrifolia* en sus diferentes concentraciones frente al *Enterococcus faecalis* ya no solo en dientes extraídos si no mejor aún en modelos animales para lograr mayor evidencia científica.
4. La actividad antimicrobiana del Propóleo de Oxapampa y de la *Morinda citrifolia* de Bagua no han sido estudiadas en profundidad, por lo tanto, es necesario realizar más investigaciones para comprender y dilucidar su mecanismo de acción, especialmente a nivel celular.



## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Del Carpio-Perochena A, Kishen A, Felitti R, et al. Antibacterial Properties of Chitosan Nanoparticles and Propolis Associated with Calcium Hydroxide against Single- and Multispecies Biofilms: An In Vitro and In Situ Study. *J Endod.* 2017;43(8):1332-1336.
2. Choudhary E, Indushekar KR, Saraf BG, Sheoran N, Sardana D, Shekhar A. Exploring the role of *Morinda citrifolia* and *Triphala* juice in root canal irrigation: An *ex vivo* study. *J Conserv Dent.* 2018;21(4):443-449.
3. Divia AR, Nair MG, Varughese JM, Kurien S. A comparative evaluation of *Morinda citrifolia*, green tea polyphenols, and *Triphala* with 5% sodium hypochlorite as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*: An *in vitro* study. *Dent Res J (Isfahan).* 2018;15(2):117-122
4. Costerton J, Lewandowski Z, Debeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. *J. Bacteriol* 1994; 17(8):2137-2142.
5. Lama A, Maja A, Mohammad H. Effectiveness of propolis and calcium hydroxide as a short-term intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*: A laboratory study. *Aust Endod J* 2009; 35(2): 52–58
6. Gebara E, Lima L, Mayer M. Atividade antimicrobiana da própolis contra bacterias periodontogênicas. *Braz J Microbiol* 2002; 33(4): 365-69.
7. Vargas A, Loguercio A, Witt N, Costa M, Silva M, Viana L. Atividade antibacteriana in vitro de extracto alcohólico de própolis. *Ciênc Rural* 2004; 34(1): 159-63.
8. Ahangari Z, Naseri M, Vatandoost F. Propolis: Chemical Composition and Its Applications in Endodontics. *Iran Endod J.* 2018;13(3):285-292.
9. Murray P, Farber R, Namerow K, Kuttler S, Godoy FG. Evaluation of *Morinda citrifolia* as an endodontic irrigant. *J Endod* 2008; 34:66 –70
10. Kandaswamy D, Venkateshbabu N, Gogulnath D, Kindo A. Dentinal tubule disinfection with 2% chlorhexidine gel, propolis, morinda citrifolia juice, 2% povidone iodine, and calcium hydroxide. *Int Endod J* 2010; 43:419-23.
11. Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, et al. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2004;37(7):438-446
12. Almadi K, Alkahtany M, Alamam Y, et al. Influence of Propolis, Ozone and Photodynamic therapy in root canal disinfection on resin bond strength to radicular dentin. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021;33:102131.
13. Chong B, Pitt Ford T. The role of intracanal medication in root canal treatment. *Int Endod J* 1992; 25: 97-106.
14. Vasudeva A, Sinha DJ, Tyagi SP, Singh NN, Garg P, Upadhyay D. Disinfection of dentinal tubules with 2% Chlorhexidine gel, Calcium hydroxide and herbal intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*: An in-vitro study. *Singapore Dent J.* 2017;38:39-44

15. De Almeida Barbosa M, de Oliveira KV, Dos Santos VR, et al. Effect of Vehicle and Agitation Methods on the Penetration of Calcium Hydroxide Paste in the Dentinal Tubules. *J Endod.* 2020; 46(7):980-986.
16. Distel J, Hatton J, Gillespie J. Biofilm Formation in Medicated Root Canals. *J Endod* 2002; 28: 689-93
17. El-Tayeb MM, Abu-Seida AM, El Ashry SH, El-Hady SA. Evaluation of antibacterial activity of propolis on regenerative potential of necrotic immature permanent teeth in dogs. *BMC oral health.* 2019; 19(1):174.
18. Portenier I, Tuomos M, Haapasalo M. Enterococcus faecalis, the root canal survivor and 'star' in post-treatment disease. *Endod Topics* 2003; 6:135-59
19. Rocha MP, Santos MS, Rodrigues PLF, et al. Photodynamic therapy with curcumin in the reduction of enterococcus faecalis biofilm in bone cavity: rMicrobiological and spectral fluorescence analysis. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021;33:102084.
20. Haasapalo M, Endal U, Zandi H, Coil J. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. *Endod Topics* 2005; 10: 77- 102.
21. Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Quantification of Lipoteichoic Acid Contents and Cultivable Bacteria at the Different Phases of the Endodontic Retreatment. *J Endod.* 2016;42(4):552-556.
22. Shabahang S, Torabinejad M. Effect of MTAD on Enterococcus faecalis-contaminated roots canal of extracted human teeth. *J Endod* 2003; 29: 576 – 79.
23. Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infección and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987; 66(8): 1375-79.
24. Ghorbanzadeh R, Assadian H, Chiniforush N, et al. Modulation of virulence in Enterococcus faecalis cells surviving antimicrobial photodynamic inactivation with reduced graphene oxide-curcumin: An ex vivo biofilm model. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020;29:101643.
25. Barhart B, Chuang A, Dalle Lucca J, Roberts S, Liewehr F, Joyce A. An in vitro evaluation of cytotoxicity of various Endodontic Irrigants on Human Gingival Fibroblasts. *J Endod* 2005; 31: 613 – 15.
26. Pinheiro E, Gomes B, Ferraz C, Sousa E, Teixeira F, Sousa-Filho F. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003; 46: 1-11
27. Siqueira J, Rocas I. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganism associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97: 85-94
28. Case PD, Bird PS, Kahler WA, George R, Walsh LJ. Treatment of root canal biofilms of Enterococcus faecalis with ozone gas and passive ultrasound activation. *J Endod.* 2012;38(4):523-526
29. Parolia A, Kumar H, Ramamurthy S, Davamani F, Pau A. Effectiveness of chitosan-propolis nanoparticle against Enterococcus faecalis biofilms in the root canal. *BMC Oral Health.* 2020;20(1):339.

30. Parolia A, Kumar H, Ramamurthy S, et al. Effect of Propolis Nanoparticles against *Enterococcus faecalis* Biofilm in the Root Canal. *Molecules*. 2021; 26(3):715.
31. Almadi KH, Ahmed MA, Ghazal T, Jouhar R, Alkahtany MF, Abduljabbar T, Vohra F. Antimicrobial Efficacy of Propolis in Comparison to Chlorhexidine against *Enterococcus faecalis*: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Applied Sciences*. 2021; 11(8):3469
32. Cunha Neto MAD, Coêlho JA, Pinto KP, et al. Antibacterial Efficacy of Triple Antibiotic Medication With Macrogol (3Mix-MP), Traditional Triple Antibiotic Paste, Calcium Hydroxide, and Ethanol Extract of Propolis: An Intratubular Dentin Ex Vivo Confocal Laser Scanning Microscopic Study. *J Endod*. 2021;21:519-7.
33. Waltimo T, Sirén E, Orstavik D, Haapasalo M. Susceptibility of oral *Candida* species to calcium hydroxide in vitro. *Int Endod J* 1999; 32: 94-8.
34. Dahlen G, Samuelson W, Molander A, Reit C. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15: 309-12.
35. Neelakantan P, Romero M, Vera J, et al. Biofilms in Endodontics-Current Status and Future Directions. *Int J Mol Sci*. 2017;18(8):1748.
36. Murphy M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 1999;12(4): 564-582 Ladislav Kokoska \*, Pavel Kloucek, Olga Leuner y Pavel Novy, “Productos derivados de plantas como agentes antibacterianos y antifúngicos en la atención de la salud humana”, *Current Medicinal Chemistry* 2019; 26 (29).
37. Farre R, Frasset I, Sánchez A. El propolis y la salud. *Ars Pharmaceutica* 2004; 45:21-43.
38. Pimenta HC, Violante IM, Musis CR, Borges ÁH, Aranha AM. In vitro effectiveness of Brazilian brown propolis against *Enterococcus faecalis*. *Braz Oral Res*. 2015;29(1):1-6
39. Chaitanya BV, Somisetty KV, Diwan A, et al. Comparison of Antibacterial Efficacy of Turmeric Extract, *Morinda Citrifolia* and 3% Sodium Hypochlorite on *Enterococcus faecalis*: An In-vitro Study. *J Clin Diagn Res*. 2016;10(10):55-57.
40. Duncan SH, Flint HJ, Stewart CS. Inhibitory activity of gut bacteria against *Escherichia coli* 0157 mediated by dietary plant metabolites. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 164: 283-58.
41. Cerda J, Villarroel L. Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. *Rev Chil Pediatr* 2008; 79(1): 54-58.
42. Singh M, Singh S, Salgar AR, Prathibha N, Chandrahari N, Swapna LA. An *In Vitro* Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Propolis, *Morinda Citrifolia* Juice, Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine on *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *J Contemp Dent Pract*. 2019;20(1):40-45.

## XII. ANEXOS

### Anexo 1: Comparación de dos medias.

#### Comparación de dos medias:

Fórmula:

$$n = \frac{2 (Z_a + Z_b)^2 * S^2}{d^2}$$

Donde:

n = sujetos necesarios en cada una de las muestras

Z<sub>a</sub> = Valor Z correspondiente al riesgo deseado

Z<sub>b</sub> = Valor Z correspondiente al riesgo deseado

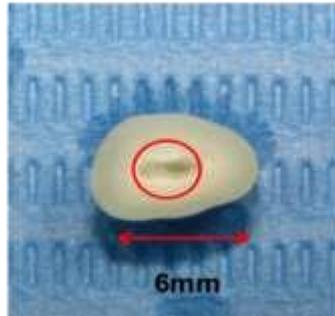
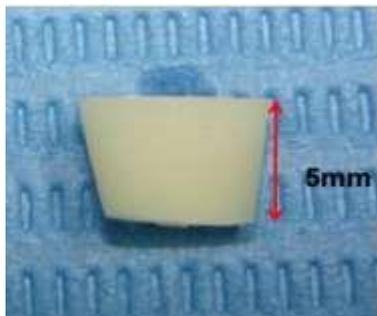
S<sup>2</sup> = Varianza de la variable cuantitativa que tiene el grupo control o de referencia.

d = Valor mínimo de la diferencia que se desea detectar (datos cuantitativos)

COMPARACIÓN DE DOS MEDIAS	
(Se pretende comparar si las medias son diferentes)	
Indique número del tipo de test	
Tipo de test (unilateral o bilateral)	1 UNILATERAL
Nivel de confianza o seguridad (1-α)	95%
Poder estadístico	80%
Precisión (d) (Valor mínimo de la diferencia que se desea detectar, datos cuantitativos)	5.00
Varianza (S <sup>2</sup> ) (De la variable cuantitativa que tiene el grupo control o de referencia)	22.00
TAMAÑO MUESTRAL (n)	11

**Anexo 2:** Preparación del modelo in vitro de infección de los túbulos dentinarios.

- Corte de pré-molares inferiores



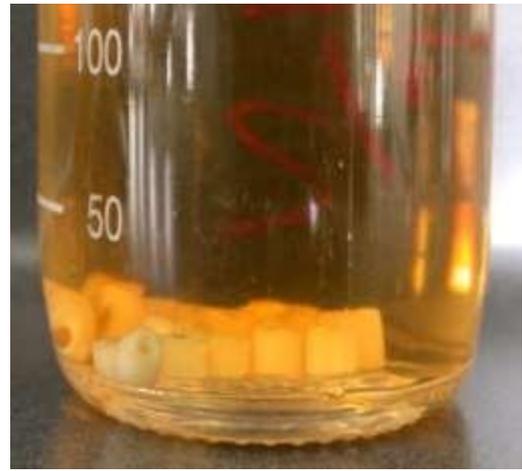
- Preparación del caldo de Brain Heart Infusión (BHI, infusión de cerebro y corazón)



- Bloques de dientes inoculados con *Enterococcus faecalis*



Bloques de dientes auto clavados



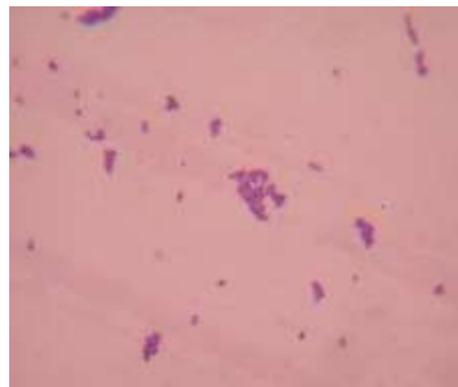
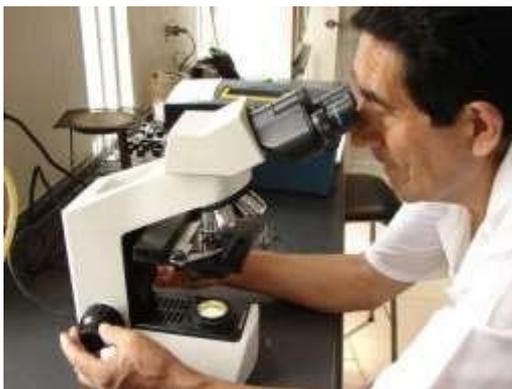
Test para esterilidad



Bloques de dientes inoculados con *Enterococcus faecalis*



Incubados por 21 días y recambio del BHI por 21 días por centrifugado



A los 21 días se realizó tinción Gram para verificar la supervivencia de las bacterias



### Anexo 3: Medicación endodóntica experimental a base de propóleo.

## CERTIFICADO

El presente certificado es un documento de **Autenticación** del propóleo materia prima empleado para la elaboración del Extracto Hidroalcohólico al 1,5% utilizado para obtener su formulación con metilcelulosa.

- **SOLICITANTE**  
JUAN CARLOS LUGO PALMADERA
- **ANÁLISIS**  
Autenticación de Propóleos y Elaboración de Extracto Hidroalcohólico al 1,5 % con metilcelulosa.
- **CANTIDAD DE MUESTRA**  
100 g
- **ORIGEN DE LA MUESTRA**  
La muestra de propóleos fue cosechada durante el mes de agosto de 2011 en Oxapampa. El tipo de abeja utilizada fue la clásica abeja melífera italiana (*Apis mellifera* L.).

### I. AUTENTICACIÓN DE PROPÓLEOS MATERIA PRIMA

La muestra de propóleos materia prima proveniente de Oxapampa fue cosechada aplicando el método de raspado de las partes superiores de la colmena. El mismo fue sometido a diversos análisis organolépticos y fisicoquímicos con la finalidad de autenticarlo (Tabla 1).

**Tabla 1. Análisis requeridos para la autenticación del propóleos materia prima colectado en Oxapampa.**

N°	ANÁLISIS	RESULTADO
01	Características Organolépticas	+++
02	Presencia de Flavonoides	++
03	Presencia de Aceites Esenciales	+++
04	Presencia de Resinas	+++
05	Presencia de Esteroides y Triterpenos	++
06	Índice de Oxidación	++ ( < 20 seg.)
07	Espectro UV-VIS (200-750 nm)	++ (Máximos)
08	Contenido de Resinas y Bálsamos	63 %
09	Contenido de Ceras	34 %

- **CONCLUSIONES**
  1. El producto natural denominado "propóleos" y proveniente de Oxapampa, cumple con todas las características de ese producto natural.
  2. El propóleos materia prima proveniente de Oxapampa es adecuado para el desarrollo de extractos hidroalcohólicos.

## II. ELABORACIÓN DE EXTRACTOS CON METILCELULOSA

### ▪ Materiales

Espátula, vasos de precipitado (04), probeta, baño de agua, agitador de vidrio, papel de filtro, frascos ámbar de boca ancha (03), frascos ámbar de boca estrecha 60 ml (06).

### ▪ Equipos

Balanza digital de precisión, baño de agua, molino eléctrico, refrigeradora no frost.

### ▪ Reactivos

Agua destilada, alcohol etílico 70 % (v/v).

### ▪ Obtención del extracto de propóleos al 5 % (p/v)

El propóleos materia prima previamente autenticado y libre de impurezas, es pulverizado y se pesan 36 g. La muestra pesada se trasvasa a un frasco ámbar de boca ancha y se añaden 100 ml de solución hidroalcohólica al 70 % (v/v), manteniéndola en reposo durante 2 h. Se someten a maceración durante 15 días y finalmente son filtrados.

Los extractos obtenidos se estandarizan con solución hidroalcohólica hasta alcanzar la concentración de sólidos solubles del 5 % (p/v). Se trasvasa a un frasco de color ámbar y boca estrecha, se le identifica adecuadamente y se almacena en un lugar seco, fresco y alejado de la luz hasta su empleo de la formulación.

### ▪ Control de calidad del extracto de propóleos al 5 % (p/v)

Tabla 1. Análisis de control de calidad del extracto de propóleos al 5 % (p/v).

Nº	ANÁLISIS	RESULTADO
01	Sólidos totales solubles (%)	5.03 ± 0.02
01	Presencia de Flavonoides	+++
02	Presencia de Aceites Esenciales	+++
03	Presencia de Resinas	+++
04	Presencia de Esteroides y Triterpenos	++
05	Índice de Oxidación	++ ( < 20 seg.)
06	Espectro UV-VIS (200-750 nm)	++ (Máximos)
07	Actividad antibacteriana frente a Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i>	++ Halos de inhibición

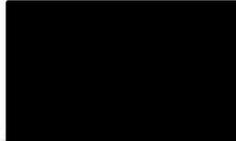
▪ **Preparación de la formulación**

Se prepara un gel a partir de 10 g de metilcelulosa en agua destilada y se agrega cuidadosamente con agitación continua a 30 ml del extracto obtenido hasta obtener 100 ml de producto terminado.

**REFERENCIAS**

- Aysel Ugur, T. A.** An in vitro study on antimicrobial activity of propolis from Mugla Province of Turkey. *J. of Medicinal Food* 7(1): 90-94, 2004.
- Bracho J.C.** Calidad de propóleos de origen argentino: I. Propiedades organolépticas. *Vida Apícola* No. 118: pp. 52-59, 2003.
- Bracho J.C.** Calidad de propóleos de origen argentino: II. Propiedades físico-químicas. *Vida Apícola* No. 119: pp. 35-42, 2003.
- Burdock G. A.** Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food and Chemical Toxicology* 36 (4): 347-363, 1998.
- Lock de Ugaz O.** Estudios fitoquímicos. *Edit. PUCP*, 1994.
- Lock de Ugaz O.** Investigación fitoquímica. *Edit. PUCP*, 1998.
- Moreira L. et. Al.** Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*. Vol. 46 (11): 3482-3485, 2008.

Lima, 23 de enero de 2012



JULIO CÉSAR BRACHO PÉREZ  
LIC. EN QUÍMICA  
CQP. 721

Mg. Julio César Bracho Pérez  
Esp. Control de Calidad de Prod. Apícolas  
Lic. Química CQP 721

## Anexo 4: Medicación endodóntica experimental a base de Morinda Citrifolia.

### CERTIFICADO

El presente certificado es un documento de **Autenticación** de la formulación obtenida a partir de un extracto puro al 100 % de *Morinda citrifolia* L. (Noni) utilizada como materia prima de partida para la elaboración de una formulación con metilcelulosa.

- **SOLICITANTE**  
JUAN CARLOS LUGO PALMADERA
- **ANÁLISIS**  
Autenticación de un jugo puro de frutos de *Morinda citrifolia* al 100 % y Elaboración de una solución al 6 % con metilcelulosa.
- **CANTIDAD DE MUESTRA**  
Botella de vidrio de color ámbar, conteniendo 750 ml de extracto puro de *Morinda citrifolia* L.

#### I. AUTENTICACIÓN DEL EXTRACTO DE MORINDA CITRIFOLIA

El jugo de *Morinda citrifolia* obtenido a partir del fruto fue sometido a diversos análisis organolépticos y fisicoquímicos con la finalidad de autenticarlo (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis requeridos para la autenticación del

Nº	ANÁLISIS	MÉTODO DE ANALISIS	RESULTADOS
01	Color, olor y sabor característicos.	Análisis organoléptico	+++
02	Presencia de Carbohidratos	Screening fitoquímico	++
03	Presencia de Azúcares Reductores	Screening fitoquímico	+
04	Glicósidos cardíacos	Screening fitoquímico	++
05	Presencia de cumarinas	Screening fitoquímico	+
06	Presencia de Escopoletina (7-hidroxi-6-metoxi cumarina)	CCF (Silica Gel 60 F <sub>254</sub> (20 × 20 cm; Merck) vs. Estándar primario revelado con Lámpara UV a $\lambda=365$ nm.	+++ Manchas fluorescentes de color azul claro (Rf: 0.4 – 0.6)
07	Presencia de Alcaloides	Screening fitoquímico	+
08	Presencia de Saponinas	Screening fitoquímico	+
09	Presencia de Azúcares reductores	Screening fitoquímico	+
10	Presencia de Flavonoides	Screening fitoquímico	+++
11	Presencia de Esteroides.	Screening fitoquímico	++
12	Presencia de Fenoles	Screening fitoquímico	+
13	Presencia de Taninos	Screening fitoquímico	++
14	Presencia de Terpenoides	Screening fitoquímico	++

▪ **CONCLUSIONES**

1. El producto natural *Morinda citrifolia* (Noni) cumple con todas las características de ese producto natural.
2. El jugo de *Morinda citrifolia* L. (Noni) es adecuado para el desarrollo de formulaciones.

**II. ELABORACIÓN DE JUGO CON METILCELULOSA AL 6%**

▪ **Preparación de la formulación**

Se pesan 6 g de extracto seco de jugo de *Morinda citrifolia* L. y se disuelven con agitación continua en 20 ml de agua destilada. Posteriormente, se le agrega la cantidad suficiente de un gel preparado previamente a partir de 10 g de metilcelulosa en agua destilada, hasta obtener 100 ml de producto terminado.

**REFERENCIAS**

- Lock de Ugaz O.** Estudios fitoquímicos. Edit. PUCP, 1994.  
**Lock de Ugaz O.** Investigación fitoquímica. Edit. PUCP, 1998.  
**Brett J. West, B. J. & Deng, S.** Thin Layer Chromatography Methods for Rapid Identity Testing of *Morinda citrifolia* L. (Noni) Fruit and Leaf. *Advance Journal of food science and technology* 2(5): 298-302, 2010.  
**West BJ, Jensen CJ, Westendorf J, et al.** A safety review of noni juice [J]. *J Food Sci* 71:100-105, 2006.  
**Harborne, J.B.** Phytochemical methods. A Guide to modern techniques of plant analysis, Chapman and Hall, London, 1973.

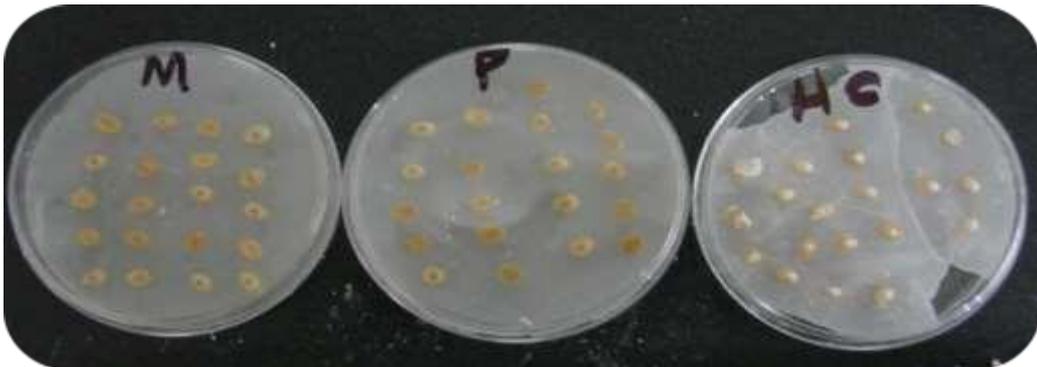
Lima, 23 de enero de 2012



JULIO CÉSAR BRACHO PÉREZ  
LIC. EN QUÍMICA  
CQP/721

Mg. Julio César Bracho Pérez  
Esp. Control de Calidad de Prod. Apícolas  
Lic. Química CQP 721

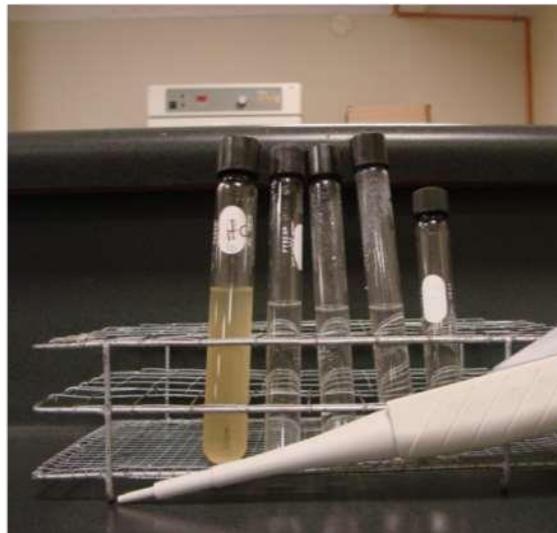
**Anexo 5: Test de Desinfección de los Bloques Infectados.**



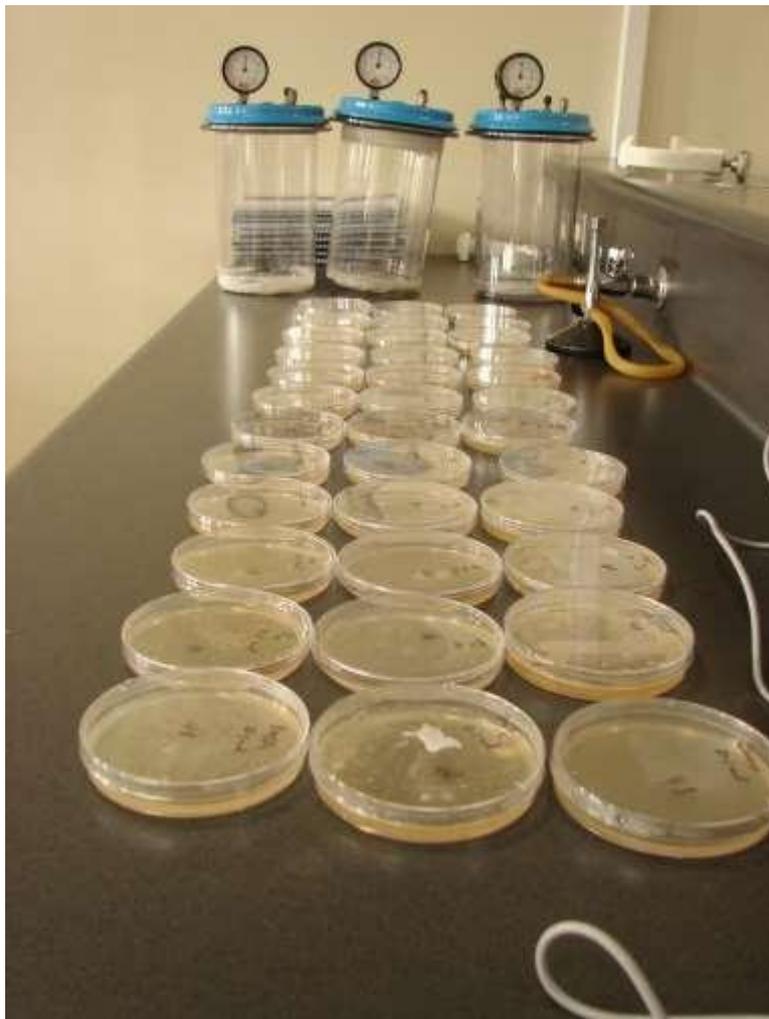
Medicación intraconducto con los medicamentos endodonticos experimentales e Hidroxido de calcio e incubacion por 48 y 72 horas



*Aparato de aluminio para ampliar el lumen de los modelos*



Preparación de diluciones y placas Petri



Contador de Quebec

Muestra a las 48 y 72 horas



**Anexo 6:** ficha de recolección de datos.

**N° DE PLACA**  
horas)

**FECHA**

**TIEMPO:** (24 horas) (48

	<b>Medicación intraconducto</b>		<b>CFU</b>
	Propóleo al 60%		
	Morinda citrifolia Juice al 6%		
	Hidróxido de Calcio		

Observaciones.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

## Anexo 7: Spread plate technique.

Standard Methods Agar (SMA) is used routinely for the spread plate technique to enumerate heterotrophic bacteria. R2A agar can also be used.

- Plates are allowed to warm to room temperature and dry before inoculating.
- Serial dilutions are prepared (using 0.1 % peptone water) so that following incubation, one of the dilutions will yield growth of 30 - 300 colonies (the ideal range for counting) on the agar plate.



- The plate is inoculated from the dilution (which has been thoroughly mixed), or directly from the sample using a 0.1 mL inoculum, if low counts are expected.



- The inoculum is transferred onto the agar surface near the center if the plate is hand spread, or at a designated mark on the plate if it is being spread by an automatic spreading device.



- The inoculum is spread over the surface (by hand or instrument) and allowed to be absorbed by the medium. Plates are inverted and incubated as follows:

## Anexo 8: Comité de ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

Dirección Universitaria de  
**INVESTIGACIÓN, CIENCIA Y  
TECNOLOGÍA (DUICT)**

### CAREG-ORVEI-191-21

Lima, 13 de septiembre del 2021

Señor/a  
**LUGO PALMADERA, JUAN CARLOS**  
Presente. -

Estimado/a investigador/a:

Es grato dirigirme a usted para saludarlo y a la vez informarle que el proyecto de investigación titulado: "Eficacia antibacteriana del extracto etanólico de propóleo al 30%, extracto de *Morinda citrifolia* al 6% y el hidróxido de calcio usados como medicamentos endodónticos intraconductos frente a una cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212" SIDISI 58554 ha sido revisado, registrado y aprobado por la Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Si bien el documento de aprobación inicial indica vigencia por 1 año, de acuerdo al Manual de Procedimientos de nuestra universidad y por sus características, este proyecto no requiere evaluación por el Comité Institucional de Ética en Humanos o en Animales; por lo que su aprobación se encuentra vigente.

Agradecemos tenga a bien presentar su informe de cierre al concluir la ejecución de su proyecto.

Atentamente,

  
Firmado digitalmente por:  
**CARLOS EDUARDO ZAMUDIO FUENTES**  
Director  
Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología

/s/

Av. Honorio Delgado 430, SMP 15102  
Apartado postal 4314  
(511) 319-0000 anexo 201352  
duict@alcatraz.upch.pe  
[www.cayetano.edu.pe](http://www.cayetano.edu.pe)