



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

“EFICACIA ANTIMICROBIANA DE  
UNA PASTA “EXPERIMENTAL”  
FRENTA A LA CEPA DE  
*ENTEROCOCCUS FAECALIS*  
(ATCC 29212) Y *CANDIDA*  
*ALBICANS* (ATCC 24433) EN  
COMPARACIÓN CON LA PASTA  
TRIMIX Y FORTRIMAX, ESTUDIO  
IN VITRO”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRA EN ESTOMATOLOGÍA

NATALY PARRA MARCELO

LIMA - PERÚ

2024



**ASESORA**

Mg. Carmen Rosa García Rupaya

**JURADO DE TESIS**

DRA. LIDIA YILENG TAY CHU JON

PRESIDENTA

MG. MARGARITA VEGA YSLACHIN

VOCAL

MG. ADA GABRIELA PEREZ LUYO

SECRETARIO (A)

### **DEDICATORIA.**

A mis padres que me enseñaron a creer en mí.

A mis docentes que me apoyaron en esta tesis

### **AGRADECIMIENTOS.**

A Dios, por ser la fuente de toda sabiduría.

### **FUENTES DE FINANCIAMIENTO.**

Tesis Autofinanciada

EFICACIA ANTIMICROBIANA DE UNA PASTA "EXPERIMENTAL"  
FRENTE A LA CEPA DE ENTEROCOCCUS FAECALIS (ATCC 29212)  
Y CANDIDA ALBICANS (ATCC 24433) EN COMPARACIÓN CON  
LA PASTA TRIMIX Y FORTRIMAX, ESTUDIO IN VI

INFORME DE ORIGINALIDAD

<b>19%</b>	<b>18%</b>	<b>1%</b>	<b>6%</b>
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

<b>1</b>	<b>hdl.handle.net</b> Fuente de Internet	<b>2%</b>
<b>2</b>	<b>tesis.ucsm.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>2%</b>
<b>3</b>	<b>repositorio.upch.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>4</b>	<b>Submitted to Universidad Peruana Cayetano Heredia</b> Trabajo del estudiante	<b>1%</b>
<b>5</b>	<b>odontologia.uas.edu.mx</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>6</b>	<b>core.ac.uk</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>7</b>	<b>repositorio.upao.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>

Submitted to Universidad Científica del Sur

## TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN .....	
ABSTRACT.....	
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	3
II.1. Objetivo General .....	3
II 2. Objetivos Específicos .....	3
III. HIPÓTESIS .....	4
IV. MARCO TEÓRICO .....	5
V. METODOLOGÍA.....	8
V.1. Diseño del estudio .....	8
V.2. Grupos de estudio .....	8
V.3. Variables (Anexo 1) .....	9
V.4. Procedimientos y técnicas .....	10
V.5. Consideraciones éticas .....	18
V.6. Plan de análisis .....	19
VI. RESULTADOS .....	20
VII. DISCUSIONES .....	24
VIII. CONCLUSIONES .....	30
IX. RECOMENDACIONES .....	31
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
ANEXOS .....	40

## RESUMEN

La finalidad del estudio fue evaluar la eficacia antimicrobiana de la pasta “experimental” a base de doxiciclina- claritromicina- metronidazol frente a *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y a *Candida albicans* (ATCC 24433), en comparación con la pasta Trimix y pasta Fortrimax. El estudio estuvo conformado por un total 120 placas petri y se utilizó la técnica de método de difusión en pozo. 60 placas petri conteniendo agar Tripticasa Soya fueron inoculadas con *Enterococcus faecalis*, siendo distribuidas en 20 placas para cada pasta medicamentosa. En cada placa se perforó 4 pozos, depositándose la pasta antibiótica, Ca (OH)<sub>2</sub>, control positivo, control negativo en cada uno de los pozos. Por otro lado, otras 60 placas petri conteniendo agar Sabouraud fueron inoculadas con *Candida albicans*, siendo divididas en 20 placas petri para cada pasta medicamentosa. Igualmente, en cada placa se perforó 4 pozos, colocándose la pasta antibiótica, Ca (OH)<sub>2</sub>, control positivo, control negativo en cada uno de los pozos. Finalmente, las lecturas de los halos de inhibición fueron tomadas a las 24 horas y 48 horas.

Se utilizó ANOVA con prueba pos-hoc de Bonferri ( $p < 0,05$ ). Se observó que la pasta Trimix fue más eficaz con el *Enterococcus faecalis* seguida de la pasta “experimental”. La pasta Trimix obtuvo buen efecto antimicótico frente a *Candida albicans*, seguida del Fortrimax y pasta “experimental”. Se concluye que la pasta “experimental” presenta un halo de inhibición que se interpreta como sumamente sensible frente al *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* a las 24 horas y 48 horas.

**PALABRAS CLAVES:** *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, doxiciclina, claritromicina, farmacorresistencia bacteriana



## ABSTRACT

The purpose of the study was to evaluate the antimicrobial efficacy of the "experimental" paste based on doxycycline- clarithromycin- metronidazole against *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) and *Candida albicans* (ATCC 24433), in comparison with Trimix paste and Fortrimax paste. The study consisted of a total of 120 petri dishes and the well diffusion method technique was used. 60 petri dishes containing Trypticase Soya agar were inoculated with *Enterococcus faecalis*, being distributed in 20 plates for each drug paste. In each plate 4 wells were perforated, depositing the antibiotic paste, Ca(OH)<sub>2</sub>, positive control, negative control in each of the wells. On the other hand, another 60 petri dishes containing Sabouraud agar were inoculated with *Candida albicans*, being divided into 20 petri dishes for each drug paste. Likewise, in each plate 4 wells were perforated, placing the antibiotic paste, Ca (OH)<sub>2</sub>, positive control, negative control in each of the wells. Finally, the readings of the inhibition halos were taken at 24 hours and 48 hours.

ANOVA with Bonferri's post-hoc test was used ( $p < 0.05$ ). It was observed that the Trimix paste was more effective with *Enterococcus faecalis* followed by the "experimental" paste. Trimix paste obtained good antifungal effect against *Candida albicans*, followed by Fortrimax and "experimental" paste. It is concluded that the "experimental" paste presents an inhibition halo that is interpreted as highly sensitive to *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* at 24 hours and 48 hours.

KEY WORDS: *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, doxycycline, clarithromycin, bacterial drug resistance.

## I. INTRODUCCIÓN

El éxito o fracaso del tratamiento endodóntico se determina por los signos y síntomas clínicos, acompañados por los controles radiológicos. Los factores más frecuentes relacionados al fracaso endodóntico son: persistencia de bacterias interradiculares y extrarradiculares, preparación quimiomecánica inadecuada y una obturación deficiente del sistema de conductos.<sup>1</sup> Las infecciones microbianas de los sistemas de conductos radiculares pueden desarrollar periodontitis apical, enfermedad inflamatoria de los tejidos perirradiculares, por lo que es primordial erradicar todo el tejido pulpar y microorganismos durante la endodoncia.<sup>2</sup>

Dentro de los microorganismos estudiados, el *Enterococcus faecalis*, el principal microorganismo gram positivo persistente en infecciones secundarias, es capaz de formar una biopelícula monoespecie en el sistema de conductos radiculares sin el apoyo sinérgico de otros microorganismos.<sup>3</sup> Otra especie es la *Candida albicans*, la cual ha sido identificada con una alta frecuencia en infecciones endodónticas persistentes. Posee varios factores de virulencia que favorece a la invasión del tejido huésped.<sup>4</sup>

El conocimiento de los principales microorganismos implicados en los fracasos endodónticos ha contribuido a la investigación y desarrollo de medicamentos intraconductos, como el Ca (OH)<sub>2</sub> que tiene propiedades antimicrobianas debido a su pH alcalino; sin embargo, su eficacia es baja frente a *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*.<sup>5</sup>

En contraste, la pasta Trimix, compuesta por minociclina, metronidazol y ciprofloxacino, ha demostrado resultados favorables frente a las cepas mencionadas.<sup>6</sup> Por otro lado, la pasta Fortrimax, conformada por Amoxicilina/Clavulánico, Levofloxacino y Cefuroxima presenta un mejor efecto antimicrobiano que la pasta Trimix frente a *Enterococcus faecalis*.<sup>7</sup> Se debe subrayar que, para que tengan eficacia, las medicaciones intraconducto deben difundirse por todas las áreas anatómicas del sistema de conductos radiculares.<sup>8</sup>

Teniendo en cuenta que no se ha encontrado un medicamento intraconducto ideal, se deben realizar estudios *in vitro* que evalúen la efectividad de nuevos medicamentos intraconductos frente a las cepas *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*. En este estudio se planteó una nueva pasta “experimental”, cuya composición está dada por doxiciclina<sup>9</sup>, una tetraciclina que tiene acción bacteriostática, que actúa impidiendo la síntesis de proteínas por medio de su unión reversible con la sub -unidad 30S; así como la claritromicina, un macrólido que tiene un amplio espectro antibacteriano y una buena distribución tisular con baja incidencia de efectos secundarios.<sup>10</sup> Finalmente, el metronidazol que es un imidazol altamente eficaz sobre microorganismos anaerobios y protozoos. Este medicamento inhibe los ácidos nucleicos y la replicación de ADN de las bacterias anaerobias.<sup>11</sup> No existen estudios previos que evalúen la eficacia de la combinación de estos tres medicamentos, por ello se planteó la siguiente pregunta:

¿Cuál es la eficacia antimicrobiana de la pasta “experimental” frente a la cepa *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y *Candida albicans* (ATCC 24433) en comparación con la pasta Trimix y Fortrimax *in vitro*?

## II. OBJETIVOS

### II.1. Objetivo General

Comparar la eficacia antimicrobiana de una pasta “experimental”, pasta Trimix y Fortrimax frente a la cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y *Candida albicans* (ATCC 24433).

### II 2. Objetivos Específicos

1. Determinar la eficacia antibacteriana a las 24 horas y 48 horas de una pasta “experimental”, la pasta Trimix, pasta Fortrimax frente a las cepas de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)
2. Determinar la eficacia antimicótica a las 24 horas y 48 horas de una pasta “experimental”, pasta Trimix, pasta Fortrimax frente a las cepas de *Candida albicans*. (ATCC 24433)

### III. HIPÓTESIS

H0: La eficacia antimicrobiana de la pasta “experimental”, pasta Trimix y Fortrimax son similares frente a cepas *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*.

H1: La eficacia antimicrobiana de la pasta “experimental”, pasta Trimix y Fortrimax son diferentes frente a cepas *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*.

#### IV. MARCO TEÓRICO

La alta prevalencia de *Enterococcus faecalis* en casos de fracasos endodónticos resalta su capacidad para sobrevivir en entornos ambientales adversos, como la privación nutricional, por lo que usa el suero proveniente del hueso alveolar y del ligamento periodontal como fuente de alimento el cual le ayudará para fusionarse al colágeno tipo 1.<sup>12</sup> Por otro lado, la *Candida albicans* se considera más patógena que otras especies de Candidas debido a la tendencia a formar biopelículas en diversas superficies de sustratos que son altamente adhesivas y brindan un nicho de protección para sus células. Otros factores de virulencia adicionales incluyen la transformación morfológica de las hifas, la adhesión a una variedad de superficies, la evasión e inmunomodulación de la defensa del hospedero, el tigmotropismo y la secreción de enzimas hidrolíticas; estas propiedades pueden desempeñar un papel importante en el desarrollo de la periodontitis apical persistente después del tratamiento endodóntico.<sup>13</sup>

El uso de un medicamento intraconducto se considera un paso importante para obtener y mantener la desinfección del sistema de conductos radiculares después de la instrumentación y antes de la obturación, aumentando significativamente las posibilidades de un tratamiento exitoso.<sup>14</sup> Siqueira et al.<sup>15</sup> demostraron que con la instrumentación e irrigación se eliminan el 90% de las bacterias. Es así que, al dejar un 10% de remanente de microorganismos, estos pueden potencialmente proliferar entre citas.

En la elección de un medicamento intraconducto se debe considerar <sup>16</sup>:

a. Calidad: Se debe determinar la cantidad y la concentración del medicamento, para que actúe sin dañar los tejidos circundantes.

b. Localización: Es necesario tener en cuenta el mecanismo de acción de las sustancias para determinar la forma correcta para su localización.

c. Tiempo de aplicación: Es necesario conocer el tiempo en que la sustancia permanece activa. Cada uno tiene un tiempo de vida útil después del cual su efecto desvanece.

Arıcan et al. <sup>17</sup> evaluaron la eficacia antimicrobiana de la pasta Trimix, pasta doble antibiótica (ciprofloxacino, metronidazol) y Ca (OH)<sub>2</sub> frente *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*, concluyeron que la pasta doble antibiótica alcanzó valores similares a la pasta Trimix.

Kumar et al. <sup>18</sup> realizaron una revisión sistemática donde evaluaron la tasa de curación de la lesión periapical tras el apósito antibacteriano con pasta Trimix y Ca (OH)<sub>2</sub>, concluyeron que la pasta Trimix eliminó la sintomatología a diferencia del Ca (OH)<sub>2</sub>.

Srikumar et al. <sup>19</sup> concluyeron que el gel de clorhexidina al 2% y la pasta Trimix con quitosán al 3% mostraron una mejor eficacia antifúngica que el vitapex y el Ca (OH)<sub>2</sub>.

Dahake et al.<sup>20</sup> realizaron un estudio *in vitro* sobre la eficacia de una nueva pasta medicamentosa (clindamicina, metronidazol, doxiciclina) frente a *Candida albicans* y *Enterococcus faecalis*, concluyeron que ambas cepas presentaron un 90% y 70% de sensibilidad, respectivamente, frente a la nueva pasta medicamentosa.

Mandras et al.<sup>21</sup> evaluaron el efecto antibacteriano y la profundidad de acción de la pasta triple antibiótica modificada (ciprofloxacino, metronidazol y claritromicina) frente a *Enterococcus faecalis*, obteniendo un resultado favorable.

Gutiérrez<sup>22</sup> comparó el efecto de la pasta Trimix modificada (ciprofloxacino, metronidazol y clindamicina) con la pasta Trimix frente a *Enterococcus faecalis*, concluyendo que la pasta Trimix modificada presenta mejor eficacia a bajas concentraciones que la pasta Trimix.

Pandey et al.<sup>23</sup> compararon la eficacia antimicrobiana de la pasta Trimix y la (pasta Trimix + cisteamina), concluyendo que la cisteamina aumentó la capacidad de la pasta Trimix.

En el presente estudio se evaluó una nueva pasta “experimental”, que es factible de usar en la clínica y cuyo aporte en la salud de los pacientes podría lograr un efecto positivo. Es importante reconocer que un adecuado control de infecciones y esterilización del sistema de conductos radiculares y la región perirradicular favorecen una buena cicatrización.<sup>24</sup>



## V. METODOLOGÍA.

### V.1. Diseño del estudio

El tipo de investigación fue experimental *in vitro*.

### V.2. Grupos de estudio

Con la finalidad de establecer un tamaño de muestra que justifique la cantidad de replicas se utilizó la fórmula de comparación de medias a un nivel de confianza del 95% y un margen de error del 5% a partir de los resultados de la prueba piloto que permitieron obtener la desviación estándar de la respuesta antibacteriana de las pastas medicamentosas de prueba frente a los microorganismos del estudio, determinando el uso de 60 placas petri para el grupo de estudio frente a cepas de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), distribuidas en 20 placas petri para cada pasta medicamentosa, y 60 placas petri para el grupo de estudio frente a cepas de *Candida albicans* (ATCC 24433) y distribuidas en 20 placas petri para cada pasta medicamentosa.

### V.3. Variables (Anexo 1)

#### Variable Dependiente

- Eficacia antimicrobiana: Capacidad de la medicación intraconducto de eliminar la progresión de los microorganismos. <sup>25</sup> Para el presente estudio presenta dos dimensiones:

*Eficacia antibacteriana*: Capacidad de la medicación intraconducto de eliminar la proliferación de una bacteria. Para el presente estudio fue el *Enterococcus faecalis*.<sup>25</sup>

*Eficacia antimicótica*: Capacidad del medicamento intracanal de evitar el crecimiento de hongos. Para el presente estudio fue la *Candida albicans*.<sup>26</sup>

#### Variable Independiente

- Pasta medicamentosa: Es la mezcla de varios medicamentos que tienen sinergismo, la cual inhibe a los microorganismos patógenos. <sup>27</sup>

#### Covariable

- Tiempo de lectura de los halos: Es el tiempo que transcurre desde la incubación microbiológica de los medicamentos intraconductos, que fueron previamente inoculados en las placas Petri, hasta las 24 y 48 horas. <sup>28</sup>

#### **V.4. Procedimientos y técnicas**

Se obtuvo la aceptación del estudio otorgado por la Coordinadora del Laboratorio de Bacteriología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. (Anexo 2).

Técnica:

Se registró la información mediante la observación directa del halo inhibitorio, que consistió en la observación de las réplicas dentro de un contexto particular sin modificar el ambiente y se midió la sensibilidad sobre la cepa de *Enterococcus faecalis* (ATC 29212) y *Candida albicans* (ATCC 24433) frente a la pasta “experimental, la pasta Trimix, pasta Fortrimax, mediante la medición del halo inhibitorio.

#### **Obtención del material biológico.**

Se obtuvo las cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) y *Candida albicans* (ATCC 24433) del Laboratorio de Bacteriología UPCH.

### **Reactivación de la Cepa bacteriana *Enterococcus faecalis* ATCC 29212**

#### **(Anexo 3)**

En primer lugar, se realizó la preparación de frascos de Agar Tripticasa Soya (TSA) y caldos Infusión cerebro-corazón (BHI). Esta consistió en la obtención de 1200 ml (20 ml en cada placa petri) de Agar TSA y 60 ml de BHI (1ml en cada placa petri). Para ello se realizó la dilución del polvo de Agar TSA en agua destilada previamente se obtuvo el peso correcto de Agar TSA y BHI. Todos los frascos de Agar TSA y tubos de ensayos de BHI fueron colocados en autoclave por 1 hora. Luego mediante el uso de una pipeta de plástico, se sembró en caldo BHI, y posteriormente se colocaron en una lata con una vela prendida, la cual fue correctamente tapada (crecimiento en anaerobiosis). Después se llevó a la estufa (37 °) por 24 horas, al finalizar este proceso, se realizó la prueba de catalasa, siendo este un procedimiento confirmatorio básico.

### **Reactivación de la Cepa *Candida albicans* ATCC 24433 (Anexo 3)**

En primer lugar, se realizó la preparación de frascos de Agar Sabouraud (SB) y caldos de Mueller- Hinton (MHB). Esta consistió en la obtención de 1200 ml (20 ml en cada placa petri) de Agar Sabouraud y 60 ml de MHB (1ml en cada placa petri).

Para ello se realizó la dilución del polvo de Agar Sabouraud en agua destilada previamente se obtuvo el peso correcto de Agar Sabouraud y caldo de Mueller-Hinton (MHB). Todos los frascos de Agar Sabouraud y tubos de ensayos de MHB fueron colocados en autoclave por 1 hora. Luego, mediante el uso de una pipeta de plástico, se sembró en caldo MHB, y posteriormente se colocaron en la estufa (37°) por 24 horas. Al completar el desarrollo de reactivación de la cepa de *Candida albicans*, se realizó la Tinción Gram para confirmar la cepa de estudio.

#### **Inóculo Bacteriano *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* (Anexo 4)**

Con la ayuda de una pipeta de plástico se colocó 10 gotas de *Enterococcus faecalis* en cada tubo de ensayo (caldo BHI), siendo un total de 6 tubos. Después de ello, se evaluó la turbidez de cada uno en escala de 0.5 Mc Farland. Asimismo, se colocó 10 gotas de *Candida albicans* en cada tubo de ensayo (caldo MHB), siendo un total de 6 tubos. Posterior a ello, se evaluó la turbidez de cada uno en escala de 0.5 Mc Farland.

#### **Elaboración de las soluciones antibióticas (Anexo 5)**

Pasta “experimental”: Se procedió su preparación en una proporción equivalente a 1:1:1:1, usando una cuchara dosificadora 3M®. Primero se retiró la cubierta entérica de todos los medicamentos, luego se pulverizó con un mortero 1 tableta de doxiciclina 100mg, luego se realizó el mismo procedimiento con 1 tableta de claritromicina 500 mg y, posteriormente con 1 tableta de Metronidazol 500mg.

Posterior a ello, se tomó una porción de cada medicamento y se adicionó una porción de propilenglicol (1 gota) + macrogold (1cda) y fueron colocados sobre un block de mezcla y se procedió a mezclar con una espátula de cemento dental hasta obtener una mezcla homogénea.

Pasta Trimix: Se procedió a su preparación en una proporción equivalente a 1:1:1:1, usando una cuchara dosificadora 3M®. Primero se retiró la cubierta entérica de todos los medicamentos, luego se pulverizó con un mortero 1 tableta de ciprofloxacino 200 mg, luego se realizó el mismo procedimiento con 1 tableta de metronidazol (500 mg) y 1 tableta de minociclina (100 mg). Posterior a ello, se tomó una porción de cada medicamento y se adicionó 1 gota de propilenglicol (1 gota) + 1 cucharada de macrogold, luego fueron colocados sobre un block de mezcla y se procedió a mezclar con una espátula de cemento dental hasta obtener una mezcla homogénea.

Pasta Fortrimax: Se procedió a su preparación en una proporción equivalente a 1:1:1:1, usando una cuchara dosificadora 3M®. Primero se retiró la cubierta entérica de todos los medicamentos, luego se pulverizó con un mortero 1 tableta de amoxicilina –ácido clavulánico 500mg /125mg, luego se realizó el mismo procedimiento con 1 tableta de Levofloxacino 500mg y 1 tableta de Cefuroxima 500mg. Posterior a ello, se tomó una porción de cada medicamento y se adicionó una porción de propilenglicol (1 gota) + macrogold (1cda) y fueron colocados sobre un block de mezcla y se procedió a mezclar con una espátula de plástico hasta obtener una mezcla homogénea.

#### Pasta amoxicilina (Control Positivo)

Se realizó la preparación en una proporción equivalente a 1:1, primero se retiró la cubierta entérica del medicamento, luego se pulverizó con un mortero 1 tableta de amoxicilina 500mg, se colocó sobre un block de mezcla con 1 gota de agua destilada y se mezcló con una espátula de plástico hasta obtener una mezcla homogénea.

#### Ca (OH)<sub>2</sub> (Control Positivo)

Se realizó la preparación en una proporción equivalente a 1:1, primero se colocó sobre un block de mezcla 1 cucharada de Ca (OH)<sub>2</sub> y 1 gota de agua destilada, luego se mezcló con una espátula de plástico hasta obtener una mezcla homogénea.

#### Fluconazol (Control positivo)

Se realizó la preparación en una proporción equivalente a 1:1, primero se retiró la cubierta entérica del medicamento, luego se pulverizó con un mortero 1 tableta de fluconazol 150 mg, se colocó sobre un block de mezcla con 1 gota de agua destilada y se mezcló con una espátula de plástico hasta obtener una mezcla homogénea.

En este estudio, se usaron las siguientes concentraciones, de acuerdo con lo establecido en CLSI.<sup>29</sup>

- Ciprofloxacino: 5µg/ml
- Minociclina: 4µg/ml
- Metronidazol: 8µg/ml.

- Levofloxacino: 5 µg/ml
- Amoxicilina/clav: 20/10µg/ml
- Cefuroxima: 30µg/ml.
- Claritromicina: 15 µg/ml.
- Ca (OH)<sub>2</sub> :10gr
- Amoxicilina: 8 µg/ml
- Doxiciclina: 32 ug/ml

### **Inoculación de las placas (Anexo 6)**

*Cepa Enterococcus faecalis* ATCC (29212)

Usando una pipeta serológica se aplicó 1 ml de cepa *Enterococcus faecalis* en cada placa petri (60 placas petri, 20 por cada pasta en estudio). Luego se colocó el agar TSA (25 ml) con un tubo centrifuga, y posteriormente se vertió 25 ml de agar TSA en cada placa petri (método modificado de pozos de agar). Se perforaron 4 pozos sobre el agar, con la ayuda de un sacabocados (6 mm de diámetro). Estos pozos se realizaron por cada placa petri. La distribución de las placas y el contenido de los pozos para el grupo de la pasta “experimental” fue de la siguiente manera: en 10 placas petri (evaluación de 24 horas) se colocaron la pasta “experimental”, amoxicilina (control positivo), Ca (OH)<sub>2</sub>, y agua destilada (control negativo). Asimismo, en otras 10 placas petri (evaluación de 48 horas) se colocaron las pastas mencionadas y el agua destilada como control negativo.



Posteriormente, la distribución de las placas y el contenido de los pozos para el grupo de la pasta Trimix fue de la siguiente manera: en 10 placas petri (evaluación de 24 horas) se colocaron la pasta Trimix, amoxicilina (control positivo),  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , y agua destilada (control negativo), seguidamente, en otras 10 placas petri (evaluación de 48 horas) se colocaron las pastas mencionadas y el agua destilada como control negativo.

Luego, para el grupo de la pasta Fortrimax, la secuencia fue la siguiente: en 10 placas petri (evaluación de 24 horas) se colocaron la pasta Fortrimax, amoxicilina (control positivo),  $\text{CaOH}$ , y agua destilada (control negativo), asimismo en 10 placas petri (evaluación de 48 horas) se colocaron las pastas mencionadas y el agua destilada como control negativo. Finalmente, las 60 placas petri (crecimiento anaerobiosis) fueron llevadas a la estufa ( $37^\circ$ ). Finalizado el proceso, se realizó la medida de los halos de inhibición a las 24 horas y 48 horas.

#### *Cepa de Candida albicans (ATCC 24433)*

Usando una pipeta serológica se aplicó 1 ml de cepa *Candida albicans* en cada placa petri (60 placas petri, 20 por cada pasta en estudio). Luego se colocó el agar Sabouraud (25 ml) con un tubo centrifuga, y posteriormente se vertió 25 ml de agar SB en cada placa petri (método modificado de pozos de agar). Se perforaron 4 pozos sobre el agar, con la ayuda de un sacabocados (6 mm de diámetro). Estos pozos se realizaron por cada placa petri. La distribución de las placas y el contenido de los pozos para el grupo de la pasta “experimental” fue de la siguiente manera: en 10 placas petri (evaluación de 24 horas) se colocaron la pasta “experimental”,

fluconazol (control positivo), CaOH, y agua destilada (control negativo). Asimismo, en otras 10 placas petri (evaluación de 48 horas) se colocaron las pastas mencionadas y el agua destilada como control negativo. Posteriormente, la distribución de las placas y el contenido de los pozos para el grupo de la pasta Trimix fue de la siguiente manera: en 10 placas petri (evaluación de 24 horas) se colocaron la pasta Trimix, fluconazol (control positivo), CaOH, y agua destilada (control negativo), seguidamente, en otras 10 placas petri (evaluación de 48 horas) se colocaron las pastas mencionadas y el agua destilada como control negativo. Luego, para el grupo de la pasta Fortrimax, la secuencia fue la siguiente: en 10 placas petri (evaluación de 24 horas) se colocaron la pasta fortrimax, fluconazol (control positivo), CaOH, y agua destilada (control negativo), asimismo en otras 10 placas petri (evaluación de 48 horas) se colocaron las pastas mencionadas y el agua destilada como control negativo. Finalmente, las 60 placas petri fueron llevadas a la estufa (37 °). Finalizado el proceso, se realizó la medida de los halos de inhibición a las 24 horas y 48 horas.

### **Recolección de datos y lectura**

Una microbióloga capacitada midió los halos de inhibición con una regla Vernier, determinándose la cantidad del diámetro en milímetros de cada halo. Las lecturas, fueron tomadas a las 24 horas y 48 horas, respectivamente y anotadas en una ficha de observación laboratorial (Anexo 7 y 8).

Para analizar los resultados, se usó la escala de Duraffourd<sup>30</sup> que evalúa el efecto inhibitorio *in vitro* según el diámetro de inhibición:

- sensibilidad nula (-):  $\leq 8\text{mm}$
- sensibilidad limite (+): 9 a 14mm
- sensibilidad media (++) : 15 a 19mm
- sumamente sensible (+++):  $\geq 20\text{mm}$

#### **V.5 Consideraciones éticas**

El presente proyecto se ejecutó posterior a la aceptación del DUICT (Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. (Anexo 9). Asimismo, se respetó todos los reglamentos propuestos para el desarrollo de una investigación experimental. Todos los residuos biocontaminados se colocaron en el recipiente y bolsa roja previamente rotulados, asimismo los materiales punzocortantes se colocaron en un recipiente de plástico para su posterior recojo. Los investigadores no presentaron conflictos de interés por las pastas medicamentosas que fueron usadas en el siguiente estudio.

## **V.6 Plan de análisis**

Se obtuvo una estadística descriptiva mediante la obtención de medias, desviación estándar y rango de las pastas medicamentosas de acuerdo con los microorganismos utilizados. Asimismo, previo a la estadística inferencial se aplicó las pruebas de normalidad (Shapiro wilk). La comparación entre grupos se determinó mediante ANOVA con prueba pos-hoc de Bonferri ( $p < 0,05$ ). El análisis de los datos se llevó a cabo con el programa estadístico Stata SE17.

## VI. RESULTADOS

**Tabla 1.** Eficacia antibacteriana a las 24 horas y 48 horas de la pasta “experimental”, pasta Trimix, pasta Fortrimax frente a las cepas de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)

PASTA MEDICAMENTOSA	24 horas	48 horas	Valor $p^{**}$
	X(mm) D.E.	X (mm) D.E.	
Pasta “experimental”	21.9 (0.21)e	23.2 (0.26)e	< .001
Trimix	27.9 (0.39) a	29.1 (0.61) a	< .001
Fortrimax	17.5 (0.62) bd	22.15 (0.75)bd	< .001
Ca (OH) <sub>2</sub>	17.2 (0.63) c	19.45 (1.05)c	< .001
Amoxicilina	17.11 (0.51) bc	18.05 (0.47)b	< .001
Agua destilada	0	0	-
<i>Valor p<sup>*</sup></i>	< .001	< .001	

\*ANOVA con prueba post hoc de Bonferri (p<.005)

\*\* Prueba t para muestras relacionadas

\*\*Letras minúsculas diferentes en sentido vertical indican diferencias estadísticamente significativas entre las medias.

Se observa que la inhibición de la pasta Trimix es más eficaz con el *Enterococcus faecalis* con un halo de inhibición promedio de 27,9 mm a la 24 horas y 29,1 mm a las 48 horas, seguida de la pasta “experimental” con un halo de inhibición de 21,9 mm a las 24 horas y 23,2 mm a las 48 horas; mientras que, el Fortrimax, la amoxicilina e  $\text{Ca (OH)}_2$  proporcionan un efectiva parecida pero menor al Trimix y la pasta “experimental”. A las 24 horas se observa una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre las pastas Trimix y todas las demás pastas y el agua destilada. Al comparar la pasta Fortrimax con los demás grupos se observa un comportamiento parecido a la pasta de amoxicilina, del mismo modo, que la amoxicilina e  $\text{Ca (OH)}_2$ . Por otro lado, a las 48 horas se observó una diferencia significativa en la eficacia de las pastas en todos los grupos, del mismo modo, al comparar todas las pastas a las 24 y 48 horas se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la eficacia al comparar la misma pasta.

**Tabla 2.** Eficacia antimicótica a las 24 horas y 48 horas de la pasta “experimental”, pasta Trimix, pasta Fortrimax frente a las cepas de *Candida albicans* (ATCC 24433)

PASTA MEDICAMENTOSA	24 horas	48 horas	Valor p <sup>**</sup>
	X (mm) D.E.	X (mm) D.E.	
Pasta “experimental”	21.35 (0.34)b	22.9 (0.52) b	0.25
Trimix	26.2 (0.42) a	27.4 (0.52) a	0.65
Fortrimax	22.4 (0.52) b	24.15 (0.24) b	0.11
Ca (OH) <sub>2</sub>	18.76 (0.95)e	17.03 (1.02)d	< .001
Fluconazol	39.03 (2.33)c	40.15 (2.36) c	0.04
Agua destilada	0	0	-
Valor p <sup>*</sup>	< .001	< .001	

\*ANOVA con prueba pos-hoc de Bonferri (p<.005)

\*\* Prueba t para muestras relacionadas

\*\*Letras minúsculas diferentes en sentido vertical indican diferencias estadísticamente significativas entre las medias.

Se observa que la inhibición de la pasta fluconazol es más efectiva con la *Candida Albicans* con un halo de inhibición promedio de 39,03 mm a las 24 horas y 40,15 mm a las 48 horas, seguida de la pasta Trimix con un halo de inhibición de 26,2 mm a las 24 horas y 27,4 a las 48 horas, mientras que el Fortrimax y pasta “experimental” proporcionan un efectiva parecida pero menor al fluconazol y finalmente el  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  es el que proporciona menor inhibición a las 24 y 48 horas. A las 24 horas se observa una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre las pastas Trimix y todas las demás pastas y el agua destilada, al comparar la pasta Fortrimax y la pasta “experimental” se observa un comportamiento parecido. Por otro lado, a las 48 horas se observó una eficacia parecida entre la pasta “experimental” y Fortrimax. Al comparar las pastas a las 24 y 48 solo se encontró diferencia estadísticamente significativa en la pasta de fluconazol.



## VII. DISCUSIONES

Durante el proceso de tratamiento endodóntico, los microorganismos altamente resistentes presentes en el sistema de conductos radiculares son la causa principal en el desarrollo, propagación y reinfección de lesiones pulpares y periapicales.<sup>31</sup>

Los principales microorganismos son el *Enterococcus faecalis*, que es capaz de invadir los túbulos dentinarios, y llegar a permanecer en un estado inactivo en condiciones anaerobias. Por otro lado, la especie fúngica *Candida albicans* que utiliza la dentina como fuente de nutrición y, por lo tanto, promueve su colonización.<sup>32</sup> Debido a la gran resistencia de estos microorganismos, se han empleado una amplia diversidad de sustancias antibacterianas y antimicóticas como medicación intraconducto, siendo uno de los más utilizados el Ca (OH)<sub>2</sub>, cuya actividad antimicrobiana proviene de su alcalinidad.<sup>33</sup> Sin embargo, los estudios discrepan sobre su eficacia antimicótica, debido a que *Candida albicans* presenta una elevada resistencia en entornos con pH elevado y, por tanto, no logra eliminarla por completo.<sup>34</sup> Por otro lado, la pasta Trimix, propuesta por Hoshino, tiene un potente efecto bactericida y bacteriostático. Este medicamento intraconducto es altamente eficaz contra el *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* dentro de los conductos radiculares infectados tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*.<sup>35</sup> Por el contrario la pasta Fortrimax tiene buena eficacia antibacteriana frente *Enterococcus faecalis*, sin embargo, no se ha evaluado la eficacia antimicótica frente a *Candida albicans*.<sup>7</sup>

Puesto que, a pesar de las investigaciones realizadas, no se ha encontrado un medicamento intraconducto ideal, el presente estudio evaluó la efectividad de una pasta “experimental” frente a las cepas *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*.

En este estudio se observa la eficacia antibacteriana y antimicótica de la pasta “experimental”. Esto podría deberse al efecto sinérgico que produce la combinación de sus componentes dado por la doxiciclina, la claritromicina y el metronidazol. La doxiciclina, que pertenece al grupo de las tetraciclinas, tiene acción bacteriostática y actúa inhibiendo la síntesis de proteínas a través de su unión reversible con la sub-unidad 30S.<sup>9</sup> Además, la claritromicina, un antibiótico que pertenece al grupo de los macrólidos, interfiere con la síntesis de proteínas en las bacterias sensibles ligándose a la subunidad 50S ribosomal.<sup>10</sup> Por otra parte, el metronidazol, un agente sintético antibacteriano y antiparasitario que pertenece al grupo de los nitroimidazoles, actúa penetrando en la membrana celular de la bacteria que luego se une al ADN y rompe su estructura inhibiendo la síntesis de ácido nucleico llevando a la muerte bacteriana.<sup>11</sup> Finalmente, el vehículo que se usó fue la combinación del macrogol y propilenglicol, el cual tiene la propiedad de introducirse en la dentina de forma más rápida, considerándose altamente eficaz para la difusión de medicamentos.<sup>36</sup>

Por otro lado, un estudio *in vitro* de Govindaraju et al.<sup>37</sup> evaluaron la eficacia antimicrobiana de la pasta Trimix modificada (ciprofloxacino, metronidazol y doxiciclina), Odontopaste y Ca (OH)<sub>2</sub>. Concluyeron que la pasta Trimix modificada obtuvo la mayor eficacia. Este hallazgo es parecido al presente estudio, en el que

se evidencia que la pasta “experimental” es eficaz. Esto puede explicarse a que la doxiciclina inhibe la colagenasa y las metaloproteinasas de la matriz de bacterias; por lo tanto, libera productos antigénicos como endotoxinas. Su mecanismo de acción podría potenciar a los otros medicamentos que conforman la pasta “experimental”.<sup>38</sup>

Ramos et al.<sup>39</sup> evaluaron la efectividad de la pasta Trimix modificada (ciprofloxacino, metronidazol y claritromicina) en niños de 4 a 7 años con necrosis pulpar donde concluyeron que es efectiva en el 100% de los casos después de 15 días. Se evidencian resultados diferentes, ello debido a que Ramos et al. realizaron un estudio clínico a diferencia del presente estudio que fue *in vitro*. Sin embargo, en ambos estudios se observa la alta eficacia de la pasta Trimix modificada (a los 15 días) y la pasta “experimental” (a las 48 horas), este resultado podría deberse, a la sustentividad de la pasta “experimental”, lo que permite que el efecto antimicrobiano perdure por mucho más tiempo.<sup>40</sup>

Genta et al.<sup>41</sup> compararon la eficacia y la profundidad de acción en los túbulos dentinarios de la pasta Trimix modificada (ciprofloxacino, metronidazol y claritromicina), pasta Trimix y pasta Bimix (ciprofloxacino y metronidazol). Se concluyó que la pasta Trimix modificada y la pasta Trimix no tienen diferencias significativas en cuanto a la penetración en los túbulos de dentina. Se muestran resultados diferentes, dado que, en el presente estudio, la pasta Trimix obtuvo diferencias significativas en comparación con la pasta “experimental”. Esto puede deberse a que se desarrolló diferentes metodologías en ambos estudios, en el estudio de Genta et al.<sup>41</sup> realizaron el análisis de las pastas medicamentosas con microscopio confocal láser de barrido usando la tinción de viabilidad, el cual es un

método confiable para evaluar la formación de una biopelícula bacteriana en los túbulos dentinarios.<sup>42</sup>

Zevallos<sup>7</sup> evaluó la eficacia antimicrobiana de la pasta Fortrimax (amoxicilina / ácido clavulánico, levofloxacino y cefuroxima), en comparación con la pasta Trimix sobre *Enterococcus faecalis* a las 24 horas, 48 horas y 7 días. Se concluyó que la pasta Fortrimax fue la más eficaz. Se evidencia resultados diferentes, dado que, en el presente estudio, la pasta “experimental” superó a la pasta Fortrimax, esto podría deberse a la excelente acción bacteriostática de la doxiciclina y claritromicina así como la acción bactericida del metronidazol, brindando una pasta medicamentosa con una alta sensibilidad para *Enterococcus faecalis*. Se conoce que este microorganismo tiene la capacidad de mantenerse en un entorno con bajos nutrientes ya que genera gelatinasa que hidroliza la gelatina y otros péptidos como colágeno, fibrinógeno, caseína, hemoglobina e insulina, los cuales degradan a la matriz periodontal y conllevan a una inflamación de los tejidos periodontales.<sup>43</sup>

Se han realizado diversos estudios *in vitro* sobre la eficacia de la pasta Trimix modificada (doxiciclina, ciprofloxacino, metronidazol) frente a *Candida albicans*. Estudios como el de Naidu et al.<sup>44</sup> evaluaron la eficacia antimicótica de la pasta Trimix modificada, donde concluyeron que fue eficaz. Los resultados son similares, dado que, en el presente estudio la pasta “experimental” tuvo una eficacia antimicótica aceptable. Esto puede deberse a las excelentes propiedades del propilenglicol y macrogol que fueron usados como vehículo, los cuales al tener un alto peso molecular disminuyen la disociación de los iones en los tejidos y conservan al medicamento intraconducto en el área deseada por intervalos de

tiempo prolongados, mejorando su acción ya que sus compuestos se liberan de forma lenta, reduciendo así el efecto tóxico.<sup>45</sup>

De La Garza <sup>46</sup> concluyó que la pasta doble antibiótica (ciprofloxacino + metronidazol) con fluconazol, tiene un buen efecto antimicótico a bajas concentraciones frente a la *Candida albicans*. Los resultados obtenidos son parecidos con el presente estudio, en donde se obtuvo que el fluconazol fue el más efectivo, seguida de la pasta triple antibiótica. Esto puede deberse a que el fluconazol es un triazol de primera generación, el cual actúa alterando la permeabilidad de la membrana fúngica lo que resulta en la inhibición del crecimiento micótico. Asimismo, la pasta “experimental” y la pasta Fortrimax obtuvieron una efectividad antimicótica cercana al fluconazol, además, se observó un incremento de inhibición de todas las pastas medicamentosas a las 48 horas. La eficacia antimicótica de la pasta “experimental” podría deberse a que la claritromicina y el metronidazol potencian el efecto antimicótico de la doxiciclina, debido a que las tetraciclinas inhiben la síntesis de proteínas en las superficies de los ribosomas lo que proporciona su propiedad antimicótica.<sup>47</sup>

El presente estudio fue *in vitro*, en donde se utilizó la cepa *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), la cual es aislada del tracto urinario. Esta ha demostrado ser la más resistente a los antibacterianos, por lo que su eliminación es más compleja en comparación con la cepa aislada del conducto radicular (ATCC 4083), por ello, la gran mayoría de estudios en Odontología utiliza dicha cepa. <sup>48</sup> Por otro lado, se utilizó la cepa *Candida albicans* (ATCC 24433), comúnmente usada en este tipo de estudios.

Se evaluó la eficacia antimicrobiana y antimicótica de los diferentes medicamentos intraconductos, mediante el método de difusión en pozo, lo cual permitió evaluar las pastas medicamentosas en una estabilidad similar al que se usa en el procedimiento clínico. Este método fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS (Comité Nacional de Estándares del Laboratorio Clínico), de Estados Unidos.<sup>49</sup>

La hipótesis nula se rechaza, dado que la eficacia de la pasta “experimental”, pasta Trimix y pasta Fortrimax son diferentes frente a *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*. El presente estudio demuestra que el halo de inhibición de la pasta “experimental” fue sumamente sensible, esta interpretación se encuentra dentro de los estándares y de acuerdo con las pautas de Duraffourd y Lapraz. Esta investigación brinda un aporte científico dado que la pasta “experimental” es una alternativa de medicación intraconducto frente a la pasta Fortrimax (amoxicilina / ácido clavulánico, levofloxacino y cefuroxima) y Ca (OH)<sub>2</sub>. En la actualidad existe un porcentaje elevado de pacientes alérgicos a las penicilinas, asimismo, diversos estudios<sup>50</sup> evidencian que la *Candida albicans* es resistente al CaOH<sub>2</sub>, por lo tanto, la pasta “experimental” es una buena alternativa por su eficacia antimicrobiana y antimicótica en estas situaciones. Es conveniente continuar con esta línea de investigación *in vitro* frente a otras bacterias, y asimismo a futuro implementar estudios *in vivo* para corroborar los resultados de laboratorio.

## VIII. CONCLUSIONES

- 1) La pasta Trimix presenta mayor eficacia antibacteriana seguida de la pasta “experimental” la cual superó a la pasta Fortrimax, amoxicilina y  $\text{CaOH}_2$  frente a *Enterococcus faecalis*. Por otro lado, la pasta Trimix presenta una alta eficacia antimicótica, seguida de pasta Fortrimax y la pasta “experimental” frente a la cepa *Candida albicans*.
- 2) La pasta “experimental” presenta un halo de inhibición que se interpreta como sumamente sensible frente al *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* a las 24horas y 48 horas.

## IX. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios *in vitro* que comparen la pasta “experimental” con otras pastas medicamentosas sobre biofilms maduros de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* utilizando pruebas moleculares como la PCR para un resultado completo. Asimismo, analizar esta pasta “experimental” frente a otros patógenos endodónticos frecuentes en necrosis pulpar y lesiones periapicales. Finalmente se recomienda realizar estudios en pacientes con retratamientos y lesiones periapicales amplias, y posterior a ello realizar los controles clínicos y radiográficos.



## X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Tabassum S, Khan F. Failure of endodontic treatment: The usual suspects. Eur J Dent. 2016; 10(1):144-147.
2. Yoo Y, Kim A, Perinpanayagam H, Han S, Kum K. *Candida albicans* Virulence Factors and Pathogenicity for Endodontic Infections. Microorganisms.2020 ;8(9):2-18.
3. Estrela C, Silva J, de Alencar A, Leles C, Decurcio D: Eficacia del hipoclorito de sodio y clorhexidina contra *Enterococcus faecalis*: una revisión sistemática. J Appl Ciencias Orales. 2008, 16:364-368.
4. Mergoni G, Percudani D, Lodi G, Bertani P, Manfredi M. Prevalence of *Candida* Species in Endodontic Infections: Systematic Review and Meta-analysis. J Endod. 2018;44(11):1616-1625.
5. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo AP. Actinomyces species, streptococci, and *Enterococcus faecalis* in primary root canal infections. J Endod. 2002;28(3):168-172.
6. Takushige T, Cruz E, Asgor A, Hoshino E. Endodontic treatment of primary teeth using a combination of antibacterial drugs. International Endodontic Journal. 2004; 37(2):132-138.

7. Zevallos A. Efecto antibacteriano de la pasta tri mix-mp y la pasta Fortrimax sobre la cepa *Enterococcus faecalis*. Estudio in vitro. [Tesis Pregrado]. Lima, Universidad Norbert Wiener; 2018.
8. Jiménez L, Juárez M, Ferreira F. Capacidad de Penetración y Difusión de la Medicación, Intraconducto en Túbulos Dentinales, Conductos Laterales e Istmos. Una Revisión Sistemática. *International Journal of odontostomatology*.2021;15(3):727-733.
9. Adl N, Motamedifar M. Comparison between the antimicrobial effect of triple antibiotic paste and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis*. *Iran Endod J*. 2012;7(3):149-145.
10. Dinos G. El renacimiento de los antibióticos macrólidos. *Br J Pharmacol*. 2017; 174 (18): 2967-2983.
11. Canalda C, Brau E. Endodoncia técnicas clínicas y bases científicas. España: Elsevier Masson; 2006.
12. Kayaoglu G, Orstavik D: Factores de virulencia de *Enterococcus faecalis*: relación con la enfermedad endodóntica. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004, 15:308-320.
13. Lim CS, Rosli R, Seow HF, Chong PP. Candida and invasive candidiasis: back to basics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(1):21-31.

14. Obando SMA, Muralles AJM, Silva-Herzog FD. Medicación intraconducto utilizada para revascularización de dientes necróticos y formación radicular incompleta. *Rev ADM*. 2015;72(3):124-128.
15. Siqueira JF Jr, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J*. 1999;32(5):361-369.
16. Lasala A, Goldberg F, Soares I, Endodoncia, Técnica y Fundamentos.2002; Buenos Aires 4ta Ed. Ed Médica Panamericana; 133-140.
17. Arıcan B, Sazak Öveçoğlu H. In Vitro Comparison of the Antimicrobial Effects of Different Root Canal Medicaments on *Enterococcus Faecalis* and *Candida Albicans*. *Cumhuriyet Dent J*.2021; 24(3):256-265.
18. Kumar, N, Brigit, B., Annapoorna B, Naik S, Merwade, S, Rashmi K. Effect of triple antibiotic paste and calcium hydroxide on the rate of healing of periapical lesions: A systematic review. *Journal of conservative dentistry*.2021; 24(4):307-313.
19. Srikumar GP, Kumar RS, Bardia S, Geojan NE, Nishad G, Bhagat P. Antifungal Effectiveness of Various Intracanal Medicaments against *Candida albicans*: An In Vitro Study. *J Contemp Dent Pract*. 2020;21(9):1042-1047.
20. Dahake PT, Baliga SM. Antimicrobial efficacy of a new tri-antibiotic combination against resistant endodontic pathogens: An in-vitro study. *Braz Dent Sci*. 2020;23(4):1-8.

21. Mandras N, Alovise M, Roana J, Crosasso P, Luganini A, Pasqualini D, Genta E, Arpicco S, Banche G, Cuffini A, et al. Evaluation of the Bactericidal Activity of a Hyaluronic Acid-Vehicled Clarithromycin Antibiotic Mixture by Confocal Laser Scanning Microscopy. *Applied Sciences*. 2020; 10(8):2-11.
22. Gutiérrez, C. Acción antimicrobiana de la pasta triple antibiotica y su modificación con clindamicina a diferentes concentraciones sobre la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212: estudio in vitro comparativo. [Tesis Pregrado]. Lima, Universidad Norbert Wiener; 2018.
23. Pandey SH, Patni PM, Jain P, Sanwatsarkar G, Bardia C. Cysteamine improves the bactericidal efficacy of intra-canal medicaments against *Enterococcus faecalis*. *Clujul Med*. 2018;91(4):448–451.
24. Ricucci D, Siqueira JF, Loghin S, Lin L. Repair of extensive apical root resorption associated with apical periodontitis: Radiographic and histologic observations after 25 years. *J Endod*. 2014;40(8):1268–1274.
25. Serra MA. La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 2017; 16(3):402-419.
26. Chandra, J, Kuhn D, Mukherjee P, Hoyer L, McCormick T, Ghannoum, M. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol*. 2001;183: 5385–5394.

27. Alvear J, Marrugo P, Romero A. Evaluación de la actividad antimicrobiana del hidróxido de calcio combinado con diferentes concentraciones de omeprazol frente a *Enterococcus faecalis*. *Salud, Barranquilla*. 2018; 34(3): 551-557.
28. Jaju S, Jaju P. Newer root canal irrigants in horizon: a review. *International Journal of Dentistry*. 2011; 2011: 1-9.
29. CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute 2015. Performance Standards For Antimicrobial Susceptibility Testing 27th Edition. Estados Unidos.
30. Duraffourd C, Lapraz J, d' Hervicourt L. Cuadernos de fitoterapia clínica. Primera ed. Duraffourd C, editor. Barcelona: Masson S.A; 1987.
31. Alvear J, Marrugo P, Romero A. Evaluación de la actividad antimicrobiana del hidróxido de calcio combinado con diferentes concentraciones de omeprazol frente a *Enterococcus faecalis*. *Salud Barranquilla*. 2018; 34(3): 551-557.
32. Yu, C, Abbott P. An overview of the dental pulp: Its functions and responses to injury. *Aust. Dent. J*. 2007; 52: S14–S16.
33. Deniz S, Aksel H, Purali N. Effect of a low surface tension vehicle on the dentinal tubule penetration of calcium hydroxide and triple antibiotic paste. *J Endod*. 2017; 43(3):452-455.
34. Alshanta OA, Shaban S, Nile CJ, McLean W, Ramage G. *Candida albicans* Biofilm Heterogeneity and Tolerance of Clinical Isolates: Implications for Secondary Endodontic Infections. *Antibiotics (Basel)*. 2019;8(4):2-13.

35. Zancan R, Cavenago B, Oda D, Bramante C, Andrade F, Duarte M. Antimicrobial activity and physicochemical properties of antibiotic pastes used in regenerative endodontics. *Braz Dent J.* 2019; 30(6):536–541.
36. Andrade, F. A new improved protocol for in vitro intratubular dentinal bacterial contamination for antimicrobial endodontic tests: standardization and validation by confocal laser scanning microscopy. *J Appl Oral Sci.* 2015; 23(6): 591–598.
37. Govindaraju L, Jenarthanan S, Subramanyam D, Ajitha P. Antibacterial Activity of Various Intracanal Medicament against *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans* and *Staphylococcus aureus*: An In vitro Study. *J Pharm Bioallied Sci.* 2021;13(1): 157-161.
38. Kanoh S, Rubin B. Mecanismos de acción y aplicación clínica de macrólidos como medicamentos inmunomoduladores. *Clin Microbiol Rev.* 2010; 23 (3): 590-615.
39. Ramos A, Barcena J. Effectiveness of the triclaritro antibiotic mixture in pulp treatments for deciduous teeth. *Revista Odontológica Basadrina.*2020; 4 (1):2-9.
40. Chandwani N, Maurya N, Nikhade P, Chandwani J. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of calcium hydroxide, triple antibiotic paste and bromelain against *Enterococcus faecalis*: An In Vitro study. *Journal of Conservative Dentistry.*2022; 25(1): 63–67.

41. Genta E, Alovise M, Cuffini AM, Mandras N, Luganini A, Roana J, et al. Confocal scanner laser evaluation of bactericidal effect of different antibiotic mixtures used for dental pulp regeneration: a preliminary study. *G Ital Endod.* 2016; 30(1):41-45.
42. Ma, J.Z.; Wang, Z.J.; Shen, Y.; Haapasalo, M. A New Noninvasive Model to Study the Effectiveness of Dentin Disinfection by Using Confocal Laser Scanning Microscopy. *J. Endod.* 2011; 37(10):1380-1385.
43. Kaishram S, Pragasam A, Bakthavatchalam Y, Veeraraghavan B. An update on technical, interpretative and clinical relevance of antimicrobial synergy testing methodologies. *Indian J Med Microbiol.* 2017; 35(4):445-468.
44. Naidu S, Rajashekar V, Balaraju K, Gayathri C, Harshitha G, Sreeha K. Antifungal efficacy of Triple antibiotic paste, double antibiotic paste with fungicide and calcium hydroxide with chitosan as a vehicle against *Candida albicans*: An in vitro study. *J Pharm Res Int.* 2021; 33(45): 394–401.
45. Verlee A, Mincke S, Stevens C V. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydr Polym.* 2017;164:268–283.
46. De la Garza Treviño AM. Efecto antifúngico de una solución doble antibiótica modificada con fluconazol sobre *Cándida albicans* in vitro [Tesis de grado académico]. México: Universidad Autónoma de Nuevo León.; 2019.

47. Martins A. Comparação da eficácia antimicrobiana de pastas de medicação intracanal na eliminação de *Enterococcus faecalis*. [Tesis maestría]. Portugal: Universidad Lisboa;2022.
48. Fernandes Zancan R, Furquim Canali L, Tartari T, Bombarda F, Ricci Vivan R, Hungaro Duarte M. Do different strains of *E. faecalis* have the same behavior towards intracanal medications in vitro research. *Revista Scielo Investigación Oral Brasileña* 2018; 32(46):1-8.
49. S. National Committee for Clinical Laboratory, "Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar", National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova. 1997; 7(1).
50. Trubiano J, Adkinson N, Phillips E. Penicillin allergy is not necessarily forever. *JAMA*. 2017; 318(1):82-83.



**ANEXOS**  
**ANEXO 1**  
**OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES**

<b>VARIABLE</b>	<b>DEFINICIÓN CONCEPTUAL</b>	<b>DEFINICION OPERACIONAL</b>	<b>DIMENSIONES</b>	<b>INDICADOR</b>	<b>TIPO</b>	<b>ESCALA DE MEDICIÓN</b>	<b>VALORES DE CATEGORÍA</b>
Eficacia antimicrobiana (variable dependiente)	Capacidad de la medicación intraconducto de eliminar o inhibir el crecimiento microbiano in vitro de <i>Candida albicans</i> (ATCC 24433) y <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	Sensibilidad bacteriana frente a medicamentos intraconductos	Eficacia antibacteriana	Halos de inhibición de crecimiento antibacteriano	Cuantitativa	De razón	mm
			Eficacia antimicótica	Halos de inhibición de crecimiento antimicótico	Cuantitativa	De razón	mm

<p>Pasta medicamentosa (variable independiente)</p>	<p>Es la combinación de dos o más sustancias que hacen sinergismo entre ellas potenciando su efecto antibacteriano, la cual es utilizada para inhibir y destruir microorganismos que escaparon de la acción de la preparación biomecánica</p>	<p>Pasta “experimental”: Conformada por doxiciclina-claritromicina-metronidazol</p> <p>Pasta Trimix: Conformada por Ciprofloxacino, metronidazol y minociclina</p> <p>Pasta Fortrimax: Conformada por amoxicilina / ácido clavulánico, Levofloxacino y Cefuroxima</p>	<p>No aplica</p>	<p>Composición química</p>	<p>Cualitativa</p>	<p>nominal</p>	<p>Pasta “experimental”</p> <p>Pasta Trimix</p> <p>Pasta Fortrimax</p>
<p>Tiempo de lectura de los halos</p>	<p>Tiempo transcurrido desde incubación microbiológica</p>	<p>-</p>	<p>No aplica</p>	<p>Tiempo de observación del efecto antibacteriano</p>	<p>Cualitativa</p>	<p>Ordinal</p>	<p>24 horas 48 horas</p>

## ANEXO 2

### Declaración del Jefe del Área Operativa<sup>1</sup> en la que se llevará a cabo el estudio

Certifico que mi área operativa ha tomado conocimiento de este proyecto según nuestros procedimientos internos, y nos comprometemos a canalizarlo y apoyar las gestiones que fueran necesarias dentro de las normas vigentes, dentro de la ley y de las normas nacionales e internacionales para la realización de proyectos de investigación.

Certifico además, que el investigador principal y sus colaboradores tienen la competencia necesaria para su realización

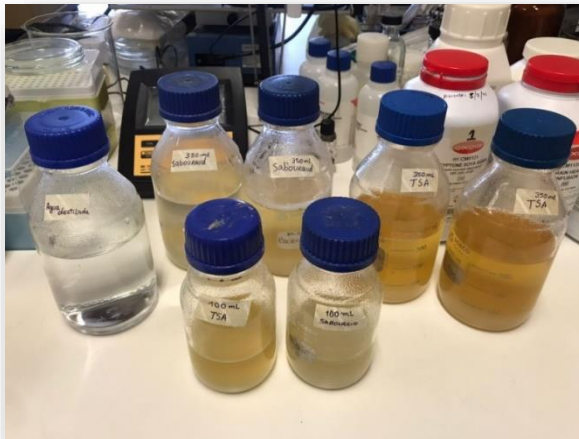
*(Podrá incluirse tantas áreas operativas como fuera necesario, un formulario por cada una)*

Nombre del Jefe del Área Operativa:	Dora Maurtua Torres, Mg
Área Operativa:	Laboratorio de Bacteriología- Laboratorios de Investigación y Desarrollo- FCF-UPCH
Firma y sello:	Fecha: 12 Febrero 2022

MSc. Dora Maurtua Torres  
Microbióloga – CBP 776  
Laboratorio de Bacteriología

### ANEXO 3

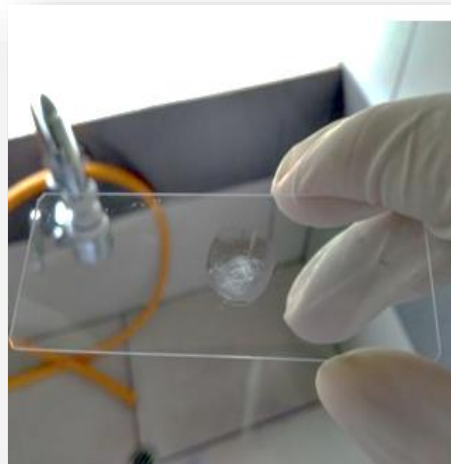
Preparación del medio de cultivo para *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*



Reactivación de *Enterococcus faecalis*



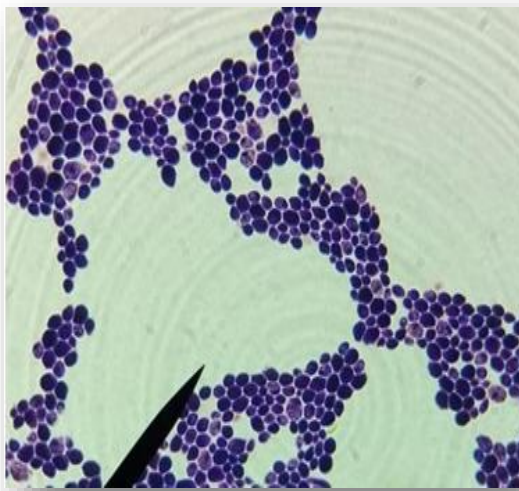
Prueba de confirmación de *Enterococcus faecalis*: catalasa negativa



Reactivación de *Candida albicans*



Prueba de confirmación de *Candida albicans*: coloración GRAM



## ANEXO 4

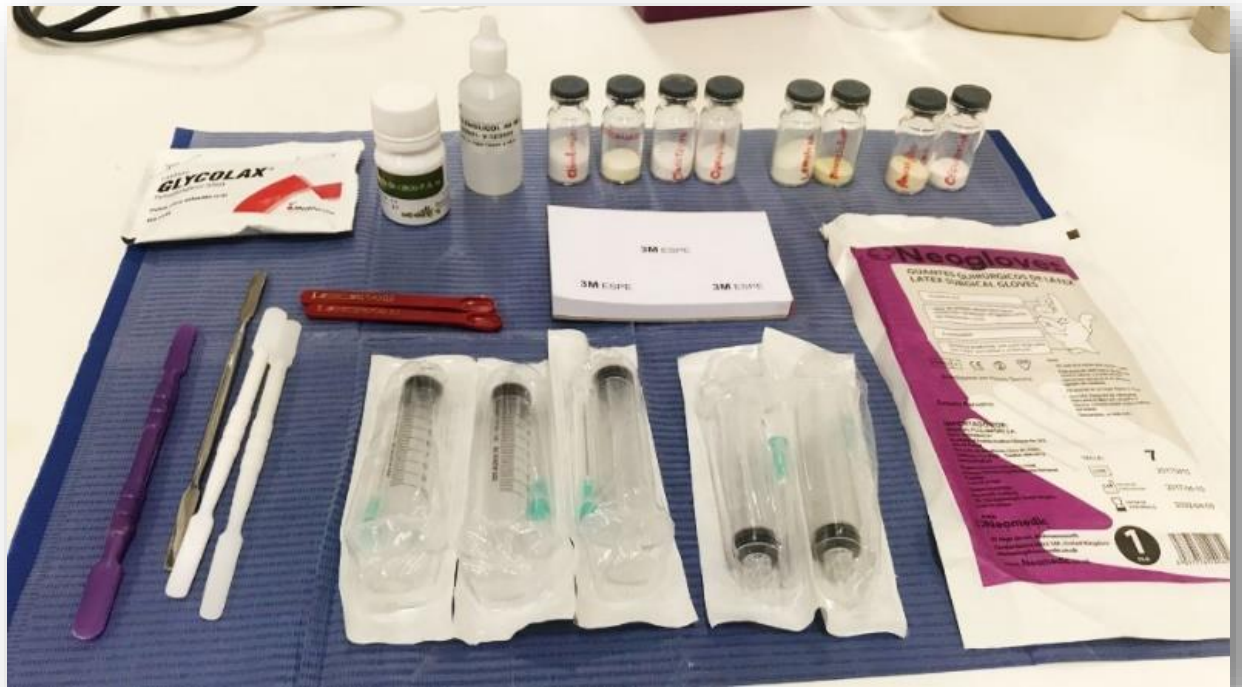
Inóculo bacteriano *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*

Prueba de turbidez 0.5 Mc Farland



## ANEXO 5

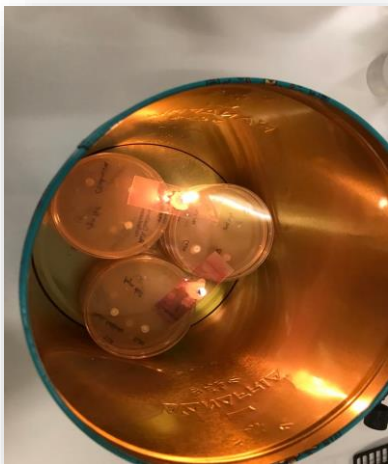
Elaboración de pastas medicamentosa





## ANEXO 6

Inoculación de las placas: *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*



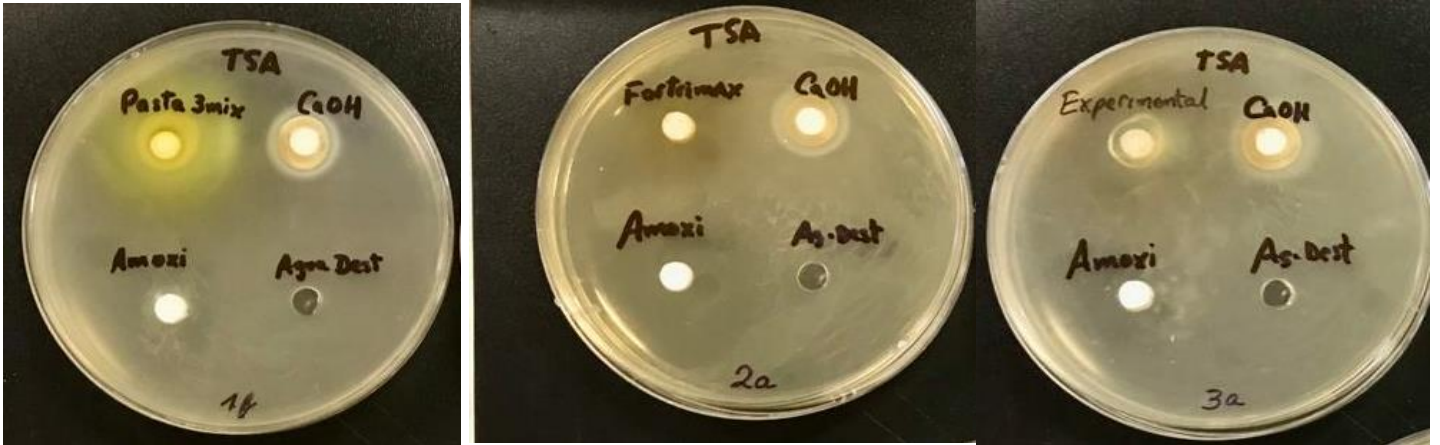
## ANEXO 7

### FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Placa Petri		24 horas
<b>3a</b>	Pasta “experimental”	21.5 mm
	Amoxicilina	17 mm
	Ca (OH) <sub>2</sub>	17 mm
	Agua destilada	0
<b>3b</b>	Pasta “experimental”	22 mm
	Amoxicilina	17 mm
	Ca (OH) <sub>2</sub> .	17.5 mm
	Agua destilada	0
<b>3c</b>	Pasta “experimental”	22 mm
	Amoxicilina	18.5 mm
	Ca (OH) <sub>2</sub> .	18 mm
	Agua destilada	0
<b>3d</b>	Pasta “experimental”	22 mm
	Amoxicilina	18 mm
	Ca (OH) <sub>2</sub> .	17 mm
	Agua destilada	0
<b>3e</b>	Pasta “experimental”	21 .5 mm
	Amoxicilina	17 mm
	Ca (OH) <sub>2</sub> .	16.5 mm
	Agua destilada	0

## ANEXO 8

### Lecturas de halos de inhibición de *Enterococcus faecalis*



### Lecturas de halos de inhibición de *Candida albicans*



## ANEXO 9

### Carta de aceptación de la DUICT



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

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

**CAREG-ORVEI-022-22**

**Lima, 15 de febrero del 2022**

Señor(a)(s)  
**PARRA MARCELO NATALY**  
Presente. -

Estimado(a)(s) investigador(a)(s)(es):

Es grato dirigirme a usted para saludarla y a la vez informarle que hemos recibido el proyecto de investigación titulado: **"Eficacia antimicrobiana de la pasta trimix frente a la cepa de Enterococcus faecalis (ATCC 29212) y Candida albicans (ATCC 10231) en comparación con la pasta fortrimax y pasta "experimental" claritromicina- metronidazol in vitro". SIDISI 207393**, el cual ha sido revisado y registrado en la Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. 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, pudiendo iniciar su ejecución.

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

Atentamente,



**Blga. Zoila María Vela Clavo**  
Directora (e)  
Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y  
Tecnología

## Aprobación de 1ra enmienda DUICT



UNIVERSIDAD PERUANA  
CAYETANO HEREDIA

Dirección Universitaria de  
INVESTIGACIÓN, CIENCIA Y  
TECNOLOGÍA (DUICT)

### CONSTANCIA

Director(e) de la Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología - DUICT de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, hace constar que se aprobó de manera expedita la **ENMIENDA/MODIFICACIÓN** del proyecto de investigación señalado a continuación.

**Título del Proyecto** : “Eficacia antimicrobiana de la pasta trimix frente a la cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y *Candida albicans* (ATCC 24433) en comparación con la pasta fortrimax y pasta “experimental” claritromicina- metronidazol in vitro”

**Código de inscripción** : 207393

**Investigador principal** : Nataly Parra Marcelo

La **enmienda/modificación** corresponde a los siguientes documentos:

1. **Protocolo de investigación**, versión recibida en fecha 23 de marzo del 2022.

Lima, 24 de marzo del 2022

  
Bja. Zoila María Vela Clavo  
Directora (e)

Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y  
Tecnología



## Aprobación de 2da enmienda DUICT



VICERRECTORADO  
DE INVESTIGACIÓN

### CONSTANCIA

Directora de la Dirección Universitaria de Asuntos Regulatorios en Investigación - DUARI de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, hace constar que se aprobó de manera expedita la **ENMIENDA/MODIFICACIÓN** del proyecto de investigación señalado a continuación.

**Título del Proyecto** : "Eficacia antimicrobiana de la pasta trimix frente a la cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y *Candida albicans* (ATCC 24433) en comparación con la pasta fortrimax y pasta "experimental" doxiciclina-claritromicina-metronidazol in vitro"

**Código de inscripción** : 207393

**Investigador principal** :Nataly Parra Marcelo .

La **enmienda/modificación** corresponde a los siguientes documentos:

1. **Protocolo de investigación**, versión recibida en fecha 04 de junio del 2022.

Lima, 07 de junio del 2022

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Cinthia Hurtado".

Dra. Cinthia Hurtado  
Directora  
Dirección Universitaria de Asuntos  
Regulatorios en Investigación