



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA, CITOTOXICIDAD
Y BIOCOMPATIBILIDAD DE UN
CEMENTO ENDODÓNTICO
EXPERIMENTAL CON LA
INCORPORACIÓN DE MENTA, MUÑA,
PROPÓLEO JALKS Y TINTURA DE
PROPÓLEO”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTOR EN ESTOMATOLOGÍA

ERWIN DUILIO PICKLING GONZALES
POSADA

LIMA – PERÚ

2024

ASESOR

Dr. John Alexis Dominguez

JURADO DE TESIS

DR. ERIC HERNAN COAGUILA LLERENA

PRESIDENTE

DR. JOSE ANTONIO BALAREZO RAZZETO

VOCAL

DRA. DIANA ESMERALDA CASTILLO ANDAMAYO

SECRETARIA

DEDICATORIA.

A mis padres que me enseñaron la perseverancia.

A mi esposa Nash, por su constante apoyo.

A Valentina, por ser el motivo de mi vida.

AGRADECIMIENTOS.

A mis amigos por su apoyo

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

Tesis Autofinanciada

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA,
CITOTOXICIDAD Y BIOCOMPATIBILIDAD DE UN CEMENTO
ENDODÓNTICO EXPERIMENTAL CON LA INCORPORACIÓN DE
MENTA, MUÑA, PROPÓLEO JALKS Y TINTURA DE PROPÓLEO

ORIGINALITY REPORT

13% 	12%	11%	10%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	link.springer.com Internet Source	1%
2	bmcoralhealth.biomedcentral.com Internet Source	1%
3	journals.sbmu.ac.ir Internet Source	1%
4	pdfs.semanticscholar.org Internet Source	<1%
5	odontologia.uas.edu.mx Internet Source	<1%
6	Submitted to Universidad Estadual Paulista Student Paper	<1%
7	repositorio.unesp.br Internet Source	<1%
8	acikbilim.yok.gov.tr Internet Source	<1%

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN
ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	OBJETIVO	6
III.	MARCO TEÓRICO	7
IV.	METODOLOGÍA	29
V.	RESULTADOS	56
VI.	DISCUSION	68
VII.	CONCLUSIONES	75
VIII.	RECOMENDACIONES	76
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
X.	ANEXO	

RESUMEN:

Las propiedades antimicrobianas en los elementos naturales han atraído la atención de investigadores como complemento al cemento endodóntico (CE). Este trabajo se realizó en cuatro fases.

La primera fase identificó la efectividad antibacteriana de la *Mentha piperita* (menta), de la *Minthostachys mollis* (muña) y del *Própolis* (tanto en tintura de propóleo como en propóleo Jalks) en cepas de *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) de American Type Culture Collection (ATCC 2982). La segunda fase determinó la efectividad incorporada al CE, ambas con prueba de sensibilidad antibacteriana en dos medios de cultivo (infusión de cerebro y corazón (BHI), agar de cerebro y corazón (BHA)), luego se aplicó coloración Gram (verificado en microscopio). La prueba Mc Farland homogenizó la cantidad de bacterias en las placas Petri, se evaluaron a las 24 horas los halos con un Vernier.

La tercera fase determinó la prueba de viabilidad celular (CC50 – MTT), las células incubadas a una atmósfera al 5% de CO₂ con 37°C por 24 horas al 95% de humedad. La muestra se incubó con MTT hasta la formación de cristales (formazán), para luego eliminar el medio con 10 ml de dihidrogenasa. La solución solubilizadora (isopropanol 100 microlitros) hasta la completa solubilización y análisis con Enzyme Linkked Immunosorbent Assay (ELISA) (Thermo Fisher Inc, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos).

La cuarta fase determinó la biocompatibilidad del CE en un modelo In-Vivo de 12 ratas tipo WISTAR machos con 5 meses de edad (300gr a 400gr). Fueron depilados, desinfectados, anestesiados, con incisión (10mm largo por 2 mm profundidad) para las muestras y se suturó. Luego de 30 días se extrajeron y procesaron las muestras.

Los resultados en primera fase identificaron a la menta con la mayor inhibición (5.975mm). En la segunda fase, el CE control presentó la mayor inhibición (18.050 ± 0.451 mm), seguido del CE con menta (16.498 ± 0.460 mm). En la tercera fase el CE presento mayor viabilidad y en la cuarta fase el CE con propóleo presentó la mayor biocompatibilidad (4.00 ± 3.00 células).

Con el análisis estadístico de varianza (ANOVA) y la prueba post-hoc de Turkey se puede concluir que el efecto antibacteriano de la muña sola fue superior, y la de menor biocompatibilidad en el CE. El CE con menta fue mejor antibacteriano y obtuvo mayor porcentaje de viabilidad.

Palabras clave: BHA (Agar de cerebro y corazón), *Enterococcus faecalis*, Menta, Muña, Propóleo.

ABSTRACT:

The antimicrobial properties in natural elements have attracted the attention of researchers as a complement to endodontic cement (EC). This work was carried out in four phases.

The first phase identified antibacterial effectiveness of *Mentha piperita* (mint), of *Minthostachys mollis* (muña) and *Própolis* (in propolis tincture and propolis Jalks) in *Enterococcus Faecalis* (E. Faecalis) strains from the American Type Culture Collection (ATCC 2982). The second phase determined the effectiveness incorporated into the CE, both with antibacterial sensitivity testing in two culture media (brain and heart infusion (BHI), brain and heart agar (BHA)), then Gram staining was applied (verified under a microscope). The Mc Farland test homogenized the amount of bacteria in the Petri plate, the halos were evaluated after 24 hours with a Vernier.

The third phase determined the cell viability test (CC50 – MTT), the cells incubated in an atmosphere of 5% CO₂ with 37°C for 24 hours at 95% humidity. The sample was incubated with MTT until the formation of crystals (formazan), and then the medium was removed with 10 ml of dihydrogenase. The solubilizing solution (isopropanol 100 microliters) until complete solubilization and analysis with Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Thermo Fisher Inc, Waltham, Massachusetts, United States).

The fourth phase determined the biocompatibility of the CE in an-In-Vivo model of 12 5-month-old male Wistar-type rats (300g to 400g). They were depilated, disinfected, anesthetized, incised (10mm long by 2mm deep) for samples and sutured. After 30 days, the samples were extracted and processed.

The results in the first phase identified the mint with the greatest inhibition (5.975mm). In the second phase, the control CE presented the greatest inhibition ($18,050 \pm 0.451$ mm), followed by the CE with mint ($16,498 \pm 0.460$ mm). In the third phase the EC presented greater viability and in the fourth phase the EC with propolis presented the greatest biocompatibility (4.00 ± 3.00 cells).

With the statistical analysis of variance (ANOVA) and Turkey's post-hoc test it can be concluded that the antibacterial effect of muña alone was superior and its biocompatibility was lower in the CE. The CE with mint was better antibacterial and obtained a higher percentage of viability.

KEYWORDS: BHA (Brain and Heart Agar), *Enterococcus faecalis*, mint, Muña, Propolis.

I. INTRODUCCIÓN

El tratamiento de conductos radiculares es utilizado para la preservación de la pieza dentaria y el periodonto en la cavidad oral, está indicada en diferentes casos como son la pulpitis irreversible sintomática 44.9%, pulpitis irreversible asintomática 23.6%, necrosis pulpar 12.4%, pulpa sana 11.2% y pulpitis reversible 7.9% ¹. Y de estos casos, el 33% correspondían a *Enterococcus faecalis* (E. faecalis) ². Por ello, la preservación de la pieza dentaria es de suma importancia.

La preparación del conducto radicular incluye procedimientos de remoción y conformación de la cavidad (apertura), conductometría e instrumentación (con el proceso de irrigación donde se mantiene el conducto con un líquido que ayuda a desinfectar el conducto durante la preparación biomecánica y la remoción de todo el tejido extraído durante la preparación), secado y conometría (se toman las radiografías para el control de la medida del material de obturación) y obturación (donde el material de relleno se une con un cemento y sellan el conducto), en el 2017 Olczak *et al.*³, y antes en el 2014 Belladonna *et al.*⁴, agregaron a las propiedades de los cementos endodónticos el ser biocompatibles, no reabsorbibles, impermeables a la disolución de los fluidos tisulares, poseer sellado hermético y presentar buena manipulación, en el 2018 Modh *et al.* ⁵, coincidieron con esa definición.

Los materiales de relleno radicular aumentan el porcentaje de éxito del tratamiento mediante la reducción de microfiltraciones sepultando las posibles bacterias remanentes en los espacios dentro del conducto radicular como lo mencionaron en el 2015 Mokhtari *et al.*⁶, que la eficacia de un material está en estrecha relación entre el sellado adecuado de los espacios del conducto radicular, que a su vez está establecida por las propiedades físicas y químicas, así como de su manipulación como lo mencionaron en el 2017 Jorgensen *et al.*⁷

En el 2018 Huang *et al.*⁸, detallaron que los espacios de los tercios radiculares sin rellenar tanto en coronal como en apical pueden albergar microfiltraciones y reinfecciones debido al sistema de los conductos radiculares que podrían contribuir con fallas en el tratamiento, como lo refirieron en el 2018 Yanpiset *et al.*⁹, y Jain *et al.*¹⁰, describieron que los cementos endodónticos en combinación con los materiales de relleno favorecen el éxito del tratamiento.

En el 2004 Shipper *et al.*¹¹, evaluaron la filtración de bacterias en los conductos radiculares obturados con un material de relleno radicular a base de polímeros sintéticos termoplásticos contra la gutapercha, utilizando dos técnicas de obturación (lateral y vertical) durante un período de 30 días. Para esta prueba se colocaron en la parte superior de la cámara pulpar el *Streptococo mutans* (*S. mutans*), y en el inferior solo el relleno y fueron controladas por 30 días. Se demostró desde el primer día que los cementos basados en rellenos poliméricos termoplásticos impiden con mejor eficiencia las filtraciones, idealmente han sido una aproximación atractiva por sus propiedades físicas y químicas como un material de obturación (cemento endodóntico) suficientemente rígido para ocupar el espacio existente en el conducto radicular lo que favoreció el sellado coronal y apical.

El desarrollo tecnológico en los cementos endodónticos hace que las propiedades físicas y químicas sean muy específicas es por ello se busca adicionar nuevas propiedades como la incorporación de agentes inhibitorios de bacterias descritas en el 2021 por Kitagawa *et al.*¹²

En este trabajo de investigación se inició con la aprobación del comité de ética institucional (Anexo 1 fig. 1-3) e incluyó la presencia de algunos elementos naturales conocidos (Anexo 2 fig. 4-5) como la menta (Anexo 2 fig. 6-9), muña (Anexo 2 fig. 10-14) y propóleo los cuales han tenido un aumento significativo en la cantidad de artículos publicados sobre ellos.¹³⁻¹⁵. Las tendencias globales hacia los productos naturales han sido estimuladas debido a su éxito en muchos trabajos

de no pierde la propiedad, esto ha favorecido el interés por la investigación, sobre el potencial en el área médica por parte de los elementos naturales. Estos se han usado como una medicina popular, ahora, en odontología se están utilizando para el control de la microflora, como lo refieren los estudios del 2017 de Baranwal *et al.*¹⁶, del 2021 Arora *et al.*¹⁷, y del 2019 Saha *et al.*¹⁸

El primero de estos elementos naturales es el propóleo, con compuesto similar a las resinas, es un compuesto balsámico, resinoso elaborado por las abejas a partir de los exudados de las plantas y es usado para proteger la colmena, capital del distrito y de la provincia de Oxapampa en el departamento de Pasco (1000 m.s.n.m. a 2300 m.s.n.m.) Oxapampa.¹⁹ En el 2018 Ahangari *et al.*²⁰, describieron que el propóleo está compuesto por 55% de resinas y bálsamos, de 30% a 40% de cera de abeja, de 5% a 10% de aceites esenciales o volátiles, 5% polen y de otros materiales orgánicos y minerales.

En el 2017 Vasudeva *et al.*²¹, evaluaron el nivel de desinfección de algunos productos naturales dentro de ellos el propóleo en gel. Para ello empleó 110 primeros premolares mandibulares humanos y los infectó con *E. faecalis* evaluándolos por 21 días a una profundidad de entre 200 a 400 micras. El resultado señaló que el más eficaz en la eliminación del *E. faecalis* fue la clorhexidina en gel, seguido por el propóleo. El estudio concluyó que el propóleo puede ser útil como un medicamento intraconducto por presentar buena acción antibacteriana contra el *E. faecalis*.

En el 2010 Kandaswamy *et al.*²², investigaron la actividad antimicrobiana del propóleo a una profundidad de 200 y 400 micras, para ello emplearon 180 piezas premolares mandibulares uniradiculares extraídas por razones ortodónticas recientes humanas que fueron infectadas con *E. faecalis* por 21 días, a los que se les evaluó al final del día 1, 3 y 5. Se recogieron las virutas de dentina a

profundidades de 200 micras y 400 micras. El estudio concluyó que estos productos (el propóleo entre ellos) tenían acción antimicrobiana.

El segundo elemento natural con propiedades antimicrobianas a mencionar es la menta, planta herbácea aromática con hojas verdes y flores blancas o violetas, utilizada como antibacteriano.²³, en la India se siembran en mayor porcentaje en Uttar Pradesh y Punjab. Existen 3 tipos (piperita, hierbabuena y menta poleo).²⁴

En el 2015 De Souza Barros *et al.*²⁵, evaluaron la composición química de varios tipos de menta, todas ellas mostraron propiedades antioxidantes, anticolinesterasa y antifúngica, así como monoterpenos en común como son el limoneno, isomentona, mentol, mentofurano, neoisomentol, eucaliptol. Los aceites de *Mentha piperita* y de *Mentha spicata* mostraron una buena inhibición de la acetilcolinesterasa con zonas de inhibición de 1,0 cm y 0,9 cm, respectivamente.²⁵

En el 2008 Shayegh *et al.*²⁶, estudiaron el efecto de inhibición fitoterapéutica de la placa dental supragingival de la *Mentha piperita* y *Cuminum cyminum* in vitro frente a *S. mutans* y *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) donde demostraron la propiedad antimicrobiana en comparación a la clorhexidina.

En el 2014 Benbelaïd *et al.*²⁷, evaluaron varios aceites esenciales en el tratamiento de infecciones orales causadas por el *E. faecalis*, concluyó que los aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas (menta piperita) pueden ser usadas en el tratamiento de infecciones orales, especialmente las causadas por el *E. faecalis* multi-drogo resistente.

El tercer elemento natural con propiedades antimicrobianas es la muña, un arbusto leñoso con una parte superior frondosa de flores blancas que se desarrolla en Cajamarca, en las regiones montañosas del Perú (2700 msnm y los 3400 msnm).²⁸

En el 2016 Lock *et al.*²⁹, describieron que el aceite esencial de muña posee una composición variable, pero principalmente, dos monotrepenos la pulegona y la mentona, además presentó mentol, limonene, carvacrol, nerolidol, carvone, caryophyllene, linalool, germacrene.

En el 2019 Quezada Moreno *et al.*³⁰, determinaron la técnica más adecuada para obtener la mayor cantidad de aceite esencial y diversidad de compuestos, en la muña. Como resultado, el método de extracción por vapor de agua a niveles de humedad media fue el que consiguió el mejor resultado.

En el 2021 Cecchini *et al.*³¹, describieron la actividad antibacteriana de la muña a las 24 horas en diferentes concentraciones, llegando a concluir que existe una inhibición en las concentraciones altas del producto.

El desarrollo de un cemento endodóntico (CE) con propiedades antibacterianas basado en un producto natural la sitúa como un producto novedoso, con un adicional de ser un producto fabricado en Perú, con mínima citotoxicidad y buena biocompatibilidad, creando un nexo importante entre los productos dentales y naturales junto con la aplicación de ellos de forma combinada para la apertura de nuevas aplicaciones.

II. OBJETIVO

Objetivo general

Caracterizar un CE con la incorporación de menta, muña, propóleo Jalks y tintura de propóleo.

Objetivos específicos:

1. Determinar la respuesta antibacteriana de los elementos naturales (menta, muña, propóleo Jalks y tintura de propóleo) mediante el método de sensibilidad bacteriana sobre las cepas de *E. faecalis* en AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC2982).
2. Determinar la respuesta antibacteriana del CE con la incorporación de los elementos naturales (menta, muña, propóleo Jalks y tintura de propóleo) seleccionados mediante el método de sensibilidad bacteriana sobre las cepas de *E. faecalis* (ATCC 2982).
3. Determinar el efecto citotóxico (CC50) (CYTOTOXIC CONCENTRATION 50 o MTT) del CE con la incorporación de los elementos naturales (menta, muña, propóleo Jalks y tintura de propóleo) seleccionado frente a la línea celular de MADIN-DARBY CANINE KIDNEY (MDCK, Darmstadt, Alemania).
4. Determinar la biocompatibilidad del CE con la incorporación de los elementos naturales (menta, muña, propóleo Jalks y tintura de propóleo) seleccionados mediante el conteo celular en un modelo animal.

III. MARCO TEÓRICO

CEMENTO ENDODÓNTICO

Dentro de los múltiples tratamientos que recibe una pieza dentaria para que se mantenga como parte integral del sistema estomatognático y evitar la extracción dental, se encuentra la terapia pulpar también llamada endodoncia.³²

La endodoncia consiste en la remoción de la parte más interna del diente (la pulpa dental), y que según su evaluación presenta diferentes diagnósticos que son: inflamación pulpar (pulpitis) irreversible sintomática, pulpitis irreversible asintomática, necrosis pulpar, pulpa sana, pulpitis reversible.^{1, 32}

Luego del diagnóstico del caso se inicia el tratamiento, que está dividido por fases y cada fase posee una serie de procedimientos, la primera fase consiste en la remoción y conformación de la cavidad (llamada apertura) donde se elimina el tejido dental comprometido, se hacen los desgastes complementarios, se realiza la conformación de la cavidad y termina con la ubicación de los conductos radiculares. La segunda fase inicia con la toma de la medida del conducto radicular (conductometría) e instrumentación de los conductos radiculares, en la que se realiza la irrigación del conducto para la preparación biomecánica y la remoción de los detritos ocasionados por preparación del conducto (lavado radicular). La tercera fase consiste en el secado del conducto radicular y la conometría, donde se prueba el relleno (gutapercha) para el espacio preparado mediante una radiografía (conometría). La cuarta fase inicia al embeber el material de relleno en una

sustancia que lo unirá con el diente preparado llamado CE, este cumple la función de adherir las estructuras y de rellenar aquellos espacios donde la preparación biomecánica no ha sido eficiente, por ello que el CE es de vital importancia para el tratamiento de conductos radiculares.³³

Uno de los primeros en utilizar cementos endodónticos fue Dr. Grossman quien en 1936 postuló la práctica diaria en la obturación de los conductos radiculares juntamente con los conos de gutapercha o de plata previa a la adaptación en el conducto radicular.³² Actualmente los cementos deben generar una respuesta tisular satisfactoria como lo demuestran los estudios en el 2018 de Bezerra *et al.*³⁴, quienes evaluaron la respuesta subcutánea en ratas a los 7, 21 y 63 días encontrando resultados satisfactorios en cuanto respuesta tisular (> al 50%).

En el 2015 Buchanan *et al.*³⁵, afirmaron que la utilización de los cementos unidos a los conos de gutapercha se ha convertido en un material indispensable y de alta importancia para producir el sellado en los conductos radiculares, y en muchos artículos los definen como elementos que producen un sellado casi perfecto o hermético no solo por la capacidad de adhesión hacia la dentina y al material de relleno, sino que incluye una adaptación a las técnicas que se utilizaron.^{3, 4, 32}.

En el 2010 Mayid y Dokr.³⁶, describieron precisiones sobre las técnicas de aplicación del cemento en las obturaciones actuales que utilizan a los conos de gutapercha como material de relleno son bajo dos técnicas, la primera de

prefabricación, y la segunda de termo plastificación. Por ello, en el 2018 Lone *et al.*³⁷, compararon dos diferentes cementos, uno a base de hidróxido de calcio y el otro a base de una resina, para ello se utilizó 70 piezas dentales que fueron instrumentadas e irrigar los conductos radiculares, se distribuyeron aleatoriamente. Posterior a la obturación fueron sumergidas en azul de metileno y llevadas al microscopio óptico. Los resultados demostraron que hubo una menor filtración en las piezas obturadas con el cemento a base de resina.

En el 2018 Colombo *et al.*³⁸, realizaron una comparación sobre las propiedades biológicas y físicas - químicas de cementos endodónticos a base de biocerámicos, hidróxido de calcio, a base de MTA y a base de resinas. Para ello utilizaron ATCC de fibroblastos tipo 1 de gingiva humana congelada (CRL-2014). Estos elementos fueron colocados en modelos de teflón cilíndricos y estériles inmediatamente después de haber sido extraídos y luego se les realizó la prueba de la difusión. Los resultados obtenidos demostraron que la viabilidad del cemento a base de MTA fue considerada tóxica, fue la de menor viabilidad celular.

Durante el proceso de sellado de los conductos radiculares tratados, se debe de tener en cuenta las características propias de los cementos.³⁹, es así como Grossman identificó las primeras características o requisitos principales que deberían poseer los cementos de los conductos radiculares y que fueron mencionados posteriormente por Tomson *et al.*⁴⁰

A) Ser adhesivo o pegajoso, producir una adhesión adecuada entre el material de obturación y la pared dentinaria del conducto radicular. Es una de las principales características de un CE porque de esta depende la unión entre el material de relleno (cono de gutapercha o cono de plata) y la dentina radicular eliminando los espacios vacíos que podrían estar presentes y convertirse en nichos microbianos.⁴¹

B) Conceder un sellado hermético. Las características de lacrado o sellado son de tener en cuenta, debido a la presencia de conductos laterales, terminaciones delta e incluso istmos por lo que es imprescindible su física horizontal o lateral en la zona apical o terminal, es igualmente necesario que la zona coronal o superior del conducto tratado endodónticamente selle de igual manera pues puede presentarse conductos laterales, istmos e irregularidades.³²

C) Radiográficamente debe visualizarse radiopaca. Para poder evaluar si una endodoncia está correctamente terminada se utiliza las radiografías de control de obturación final, y debe observarse el contraste de densidades radiopacas que permiten una mejor evaluación y precisión entre las diferentes estructuras, determinando si el tratamiento de conductos está dentro de los parámetros aceptables.³²

D) Granulado fino. El tamaño de las partículas influye en la mezcla final del producto, mientras más pequeñas se combinan con mejor facilidad y la capa de

cemento será de menor grosor permitiendo penetrarla con mayor profundidad dentro de los tejidos.³²

E) Contracción volumétrica estable. Es necesario mantener una adecuada estabilidad dimensional para mantener un sellado adecuado, esta estabilidad debe ser tanto en contracción como en expansión hasta terminar de fraguar o polimerizar, evitando grietas o fracturas que puedan comprometer la integridad del tratamiento.³²

F) No teñir parcial ni totalmente alguna estructura dental. Esta propiedad debe conservarse no solo al aplicarlo, sino en el tiempo, debido a que esto podría translucirse en algunos tipos de restauraciones.³²

G) Capacidad antibacteriana. El requisito mínimo es no favorecer la colonización de bacterias sea que fueron parte de un proceso infeccioso o nuevas bacterias, es ideal que sea bacteriolítico.³²

H) Tiempo de fraguado lento. Una inconveniente importante es el fraguado adecuado sobre todo porque los elementos que fraguan rápido poseen mayor contracción que los de fraguado lento. Cabe recordar que el tiempo fraguado debe incluir un tiempo prudencial durante el procesamiento de la obturación debido a que ciertas técnicas requieren más tiempo que otras al incluir diferentes pasos y que

luego de ellos deben pasar un control radiográfico en cual podría ser identificado y en caso de ser un inconveniente se tendrá que desobturar, es por ellos que se prefiere un tiempo de trabajo lento para su manipulación.³²

I) Insolubilidad. Es una característica importante por la presencia de líquidos tisulares en la zona apical. Es preferible que esta característica sea permanente.³²

J) Biocompatibilidad. Es necesario que, al permanecer dentro del cuerpo humano, este elemento sea biocompatible con el mismo para evitar irritaciones, alergias y reacciones adversas.³²

K) Solubilidad. Es una característica que, de presentar sensibilidades posteriores por la invasión del cemento a otros tejidos, esta sustancia pueda tener una rápida remoción o disolución.³²

En nuestros días, a esta lista de características se le ha adicionado dos más, la primera hace referencia sobre eliminar la posibilidad de una reacción inmunológica por estar próxima a los tejidos periapicales y la segunda hace referencia sobre eliminar la posibilidad de ser mutagénico o carcinogénico. Ambas características son muy importantes en los cementos endodónticos.³²

CLASIFICACIÓN DE LOS CEMENTOS ENDODÓNTICOS

La última fase del procedimiento endodóntico es la obturación, éste inicia con la colocación del CE en toda la gutapercha (material de relleno), su función es adherir y rellenar los espacios vacíos y áreas no trabajadas en la dentina radicular. El CE debe cubrir la totalidad de las paredes del conducto radicular, mientras que, el centro de la obturación del conducto trabajado fue cubierto por la gutapercha. Es así como este procedimiento se ha comparado con otras especialidades dentro de ellos la ortodoncia donde se emplea un adhesivo para los brackets o en operatoria dental se emplea un adhesivo para las resinas.³⁰ Podemos concluir que el CE es una parte integral del proceso de obturación definitivo.⁴⁰

Actualmente, una de las clasificaciones más referenciada es la del 2014 de Tomson *et al.*⁴⁰, quienes evaluaron aspectos en la terapéutica y en la clínica, por ello, clasificaron a los CE de la siguiente forma: A) Base de Óxido de Cinc, B) Base de hidróxido de calcio, C) Base de ionómero de vidrio, D) Base de silicato de calcio y, E) Base de silicona. Cada una de ellas contiene propiedades específicas que las diferencian unas a otras.

Los primeros cementos utilizados fueron a base de óxido de cinc y eugenol presentando una buena capacidad antimicrobiana, aunque su preparación requería de un mayor tiempo, por lo que causaba irritación transitoria, eran utilizados con portadores de calor y se reabsorbían en la extrusión. Los cementos a base de hidróxido de calcio son antibacterianos (dependiendo de la disolución) aunque

menos que los anteriores, estos destacan por ser menos tóxicos. Los cementos a base de ionómero de vidrio son más solubles, poseen menor capacidad antibacteriana que los dos anteriores, pero son complicados de eliminar en casos de corrección o retratamiento.³⁸ Los cementos a base de resinas no liberan formaldehído y poseen una capacidad de sellado superior (adhiriéndose a la dentina) con poder antibacteriano, no se reabsorbe fácilmente, y la respuesta inflamatoria puede presentarse por unas pocas semanas. Los cementos a base de silicato de calcio pueden extruirse fácilmente y aún están en desarrollo. Son conocidos por sus excelentes propiedades de sellado y de biocompatibilidad. El cemento a base de silicona es de baja viscosidad para fluir dentro de los conductos radiculares, posee poca contracción y es biocompatible.⁴¹

En el 2015, Buchanan *et al.*³⁵, definieron que las técnicas de obturación más comunes son: A) La compactación lateral utilizando un cono principal y varios elementos accesorios; B) Un solo cono. En ambos casos la fluidez típica del CE mejora el desplazamiento de los conos por dentro del conducto radicular sobre en las paredes laterales, lo que implica que son importantes en la integridad del tratamiento del diente.

Las investigaciones preliminares sobre un nuevo sistema de obturación estuvieron a cargo de Kalman *et al.*⁴², ellos utilizaron energía sónica para la obturación de conductos en piezas dentarias sin cemento. Concluyeron que las piezas dentarias

obturadas sin cemento no eran mejores que las que si empleaban cementos endodónticos.

Los estudios realizados en el 2017 por Gjorgievska *et al.*⁴³, emplearon cuatro cementos endodónticos de diferentes bases (Endo N2, Endometasona N, Apexit Plus y AH Plus) y demostraron que, si bien la incorporación de agentes antibacterianos en los cementos alteró químicamente a algunos en sus cadenas de macro moléculas, esto afectó a la fuerza de compresión. Estos efectos no se aplicaron para cementos poliméricos y que en todo caso esos agentes aumentaron el poder de resistencia a la compresión por tener un grupo amina.

Por definición, los polímeros son moléculas grandes (macromoléculas) compuestas por la unión de varios enlaces de unidades más simples o moléculas llamadas monómeros. Estas unidades pequeñas pueden agruparse en cadenas largas gracias a las fuerzas de Van der Waals, formando puentes de hidrógeno o también llamadas reacciones hidrofóbicas. Al ser cadenas largas tienen como características tener masas elevadas (moléculas grandes), estas son tan grandes que pueden alcanzar millones de unidades de masa atómica (UMAs). Estas cadenas poliméricas poseen diversos ejemplos para ello los dividiremos en dos grupos, el primero compuesto por los polímeros naturales donde citaremos al almidón, la seda, la celulosa y el mismo ácido desoxirribonucleico (ADN), y el segundo grupo compuesto por polímeros sintéticos donde podemos citar al nailon, la baquelita y el polietileno.⁴⁴

El proceso por el cual se obtienen los polímeros desde unidades menores llamadas monómeros son de dos tipos (reacciones químicas). La primera de ellas llamada la reacción de condensación, es una unión donde de ambos monómeros es eliminada una molécula pequeña, que podría ser agua (solo como referencia). Es por ello por lo que las cadenas poliméricas no son múltiplos iguales a sus monómeros iniciales en su masa. La segunda reacción de donde se pueden obtener polímeros es conocida como polimerización por adición, en esta no hay pérdida de moléculas por lo que la masa del polímero es exacta a la suma de las masas de las moléculas de los monómeros.⁴⁴⁻⁴⁵

Así podemos obtener la resina epoxi (poliepóxido ó resina) que es un polímero termoestable, adicionalmente se puede polimerizar al combinarse con un agente catalizador o endurecedor que dentro de las más usuales (para resinas epoxi) son la epiclorohidrina y el bisfenol A.⁴⁵

Los cementos endodónticos poliméricos poseen propiedades en su fórmula tanto físicas como químicas semejantes a las resinas que producen una muy buena aceptación por los odontólogos que practican la endodoncia, este grupo de cementos endodónticos poseen como característica general tener una muy buena adhesión a las paredes dentinarias del conducto radicular, como consecuencia de la adhesión de estos cementos endodónticos el sellado apical resultante se volvió superior a otros grupos de cementos. Como ejemplo, podemos decir que los cementos Diaket® (ESPE, York, Philadelphia, EEUU), Lee Endofill (Lee

Pharmaceuticals, El Monte, CA. EEUU), AH26® (DeTrey/Dentsply, Ballaigues, Suiza) son los más destacados de este grupo.⁴⁶

La fórmula exacta del CE de Diaket está en posesión del grupo ESPE, se conoce que, desde en el año 1951 que se obtuvo de una mezcla de polímeros de vinilo adicionado con óxido de cinc y de fosfato de bismuto. Es presentado en polvo y líquido para realizar la combinación, un detalle de estos cementos es que son reactivos a condiciones ambientales. El polvo (óxido de cinc 98%, fosfato de bismuto 2% y 2,2-Dihidroxi-5,5 diclorodifenilmetano), el líquido (propionilacetofenona, trietanolamina, ácido caprónico, copolímeros de acetato de vinilo, cloruro de vinilo y éter isobutílico de vinilo).⁴⁶

Posteriormente, en 1954, Schroder introdujo una resina epóxica denominada AH26, inicialmente fue preparada como agente cemento, y dentro de sus propiedades podemos mencionar: estabilidad dimensional, adhesión, polimerización, puede trabajar bajo condiciones de humedad, radiopacidad, baja concentración, solubilidad, liberación del formaldehído (durante su fraguado) de manera momentánea, excelente sellado apical y ser fluido (al momento de trabajar) que son características muy positivas. Este compuesto por polvo (polvo de plata 10%, óxido de bismuto 60%, hexametenotetramina 25% y óxido de titanio 5%) y de un líquido (éter bisfenoldiglicídico 100%).⁴⁰ Adicionalmente Jafari *et al.*⁴⁷, destacaron como una característica importante la propiedad antibacteriana que sucede durante el fraguado de este cemento, para ello se tomó las muestras a las 24 horas, 48 horas,

72 horas y 7 días después. Concluyeron que el efecto antibacteriano del AH 26 fue superior y de halo más amplio estuvo en relación con la muestra de 24 horas que al resto de muestras.

Debido a sus múltiples características, propiedades y combinaciones de los polímeros, se le han realizado diversas investigaciones en los últimos 20 años, sobre todo como materiales endodónticos, esto ha desencadenado una serie de distintos materiales diseñados para proporcionar características biológicas y físicas ideales. El avance en el desarrollo de estas sustancias como la resina y su facilidad para combinarse con otros productos como hidróxido de calcio (AH26, AH plus, etc.), óxido de cinc (Diaket), etc.⁴⁸

Una de las ventajas de los cementos endodónticos poliméricos es combinar las propiedades físicas de las resinas que obtuvieron una menor filtración marginal con la adhesión del hidróxido de calcio que permitió una mejor reparación tisular.⁴⁵

En el 2017 Tandon *et al.*⁴⁹, establecieron que el *E. faecalis* posee una alta resistencia una vez establecido en el conducto radicular y que juega un papel importante en las fallas endodónticas, para ello evaluaron la actividad antimicrobiana de 4 cementos endodónticos a 1 hora, luego al primer, tercero, quinto y séptimo día posterior a la mezcla frente al *E. faecalis* por contacto directo. Demostraron la efectividad antibacteriana de los cementos sobre todo a la primera hora de haber sido colocados,

adicionalmente concluyeron que la efectividad del AH Plus ocupó un segundo lugar solo por debajo del óxido de cinc eugenol.

El CE que se empleó está compuesto por dos pastas.⁵⁰

Pasta A:

- o L-Iditol, (Merck, Darmstadt, Hesse, Alemania) con función de polialcohol
- o Aceite de ricino, (Merck, Darmstadt, Hesse, Alemania) composición grasa, mezcla a los componentes y disminuye la tensión superficial de todos.
- o Óxido de zinc, (Merck, Darmstadt, Hesse, Alemania) brida volumen
- o Carbonato de calcio, (Merck, Darmstadt, Hesse, Alemania) agente absorbente.

Pasta B:

- o Difencil metano, (Merck, Darmstadt, Hesse, Alemania) iniciador de la polimerización
- o Diisocianato, (Merck, Darmstadt, Hesse, Alemania) produce la adhesión

EL PROPÓLEO

El Própolis (Propóleo) según la Real Academia Española es en esencia un producto elaborado por las abejas de origen vegetal y que combinado con diferentes enzimas

producidas por ellas mismas dan como resultado un producto capaz de brindar una protección efectiva a la colmena, actualmente se le atribuye funciones antifúngicas, antibacterianas y antivirales.⁵¹

El propóleo molecularmente fue descrito por Gómez-Caravaca *et al.*⁵², como un polímero natural complejo, de tipo resinoso que es procesado por las abejas caseras (*Apis Mellifera*) siendo la de mayor cantidad y distribución a nivel mundial, estas se alimentan de algunos brotes y de plantas cercanas de su colonia. Estas plantas son combinadas con la secreciones salivales y enzimáticas para obtener un producto llamado propóleo. Existen diversas teorías sobre su función en el panal de abeja, la más reconocida es para construir y reparar el panal, pero además brinda protección contra los patógenos externos.⁵³, desde los estudios del 2018 de Karadal *et al.*⁵⁴, donde comprobaron que el propóleo propicia un ambiente inadecuado para la formación de muchos microorganismos (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella Enteritidis*).

En el 2001 De Castro *et al.*⁵⁵, estudiaron al propóleo y le encontró una amplia variedad de compuestos químicos llegando a identificar más de 300, dentro de los grupos que identificó tenemos a los polifenoles grupo de donde se derivan algunos metabolitos como los flavonoides (que se encargan de la eliminación de varios microorganismos), los terpenos, los fenólicos, los flavonoides y los triterpenos. Existen además otros grupos como los terpenoides, esterres, amino ácidos y diversos compuestos orgánicos descritos en el 2018 por Mitsui *et al.*⁵⁶, en el 2000 por

Bankova *et al.*⁵⁷ y en el 2018 por Hernández *et al.*⁵⁸. Cabe destacar que la composición de la colmena es variante por la diferente flora que se encuentra cerca de la colmena, así como de los climas y las distintas regiones, esto lo describieron en el 2016 Sforcin *et al.*⁵⁹

La composición de los propóleos también presentó variación entre los distintos continentes con regiones templadas similares como son Norte América, Asia y Europa. Se describió como principales constituyentes a los compuestos fenólicos (flavonoides), que se recolectaron a partir de árboles y arbustos comunes de la zona, dentro de ellos podemos mencionar varios tipos (*spp*) de álamos (*Populus spp*), el abedul (*Betula alba*) y el castaño de Indias (*Aesculus hippocastanum*).⁵⁹

En otras regiones como en las tropicales donde la vegetación es diferente, las abejas emplearon distintos tipos de plantas como insumo para la producción, y esto a su vez, repercutió en la composición química del propóleo, se identificó que en Brasil los principales componentes son terpenoides y derivados de los ácidos p-cumáricos como lo describieron en 1995 Marcucci *et al.*⁶⁰. Otros autores en 1998 como Valcic *et al.*⁶¹, describieron que el propóleo en Chile está compuesto en su mayoría por glicanos. Otros países como Venezuela y Cuba han descrito benzofenonas preniladas como las descritas en 1993 por Tomas *et al.*⁶², en el 2000 por Porto *et al.*⁶³, en el 2004 por Trusheva *et al.*⁶⁴, y en el 2005 Hernández *et al.*⁶⁵, se describieron que los polímeros de *Clusia spp*, *Araucaria heterophylla* y *Baccharis*

spp son predominantes en zonas tropicales.^{57, 60}, en el 2002 Park *et al.*⁶⁶, y en el 2003 Kumazawa *et al.*⁶⁷

Además, se ha identificado numerosas características biológicas, físicas y químicas del propóleo además de ser antimicrobiana (bactericida, antifúngica, antiviral), a las cuales también se le atribuye funciones antiinflamatoria, antitumoral, antioxidante como lo demostraron los estudios en 1991 de Dobrowolski *et al.*⁶⁸, en 1998 Burdock *et al.*⁶⁹, en 1999 Kujumgiev *et al.*⁷⁰, en el 2000 Koo *et al.*⁷¹, en el 2004 Keskin *et al.*⁷², y en el 2017 Corbellini *et al.*⁷³

El propóleo está presente en diferentes áreas, como en la industria farmacéutica, donde se elaboran diversos productos tanto para humanos como para animales, en el 2019 Keskin *et al.*⁷², describieron su presencia en otros campos como el agrícola, la cosmética y la alimentación. La industria alimentaria ha recibido diferentes aportes del propóleo tales como la fabricación de bebidas y alimentos como lo describieron en el 2001 Banskota *et al.*⁷⁴

En el Perú, el empleo del propóleo es muy amplio, no solo genera a la industria nuevos puestos de trabajo, sino que al ser un producto de consumo es regulado para mantener una calidad y una continuidad de su calidad. Muchas empresas lo utilizan como medicamento homeopático para el tratamiento de diversas enfermedades como puede ser las respiratorias. Además, se debe de tener en cuenta la poca bibliografía existente sobre la estandarización química para sugerir una calidad y

un nivel de seguridad eficiente para utilizarlo como tratamiento y sobre todo para ser recomendado como tratamiento en los sistemas de salud del Perú⁷⁵.

PODER DE DESINFECCIÓN DEL PROPÓLEO

En el 2017 Vasudeva *et al.*²¹, realizaron un estudio in vitro y evaluaron el nivel de desinfección de algunos productos naturales dentro de ellos el propóleo en gel. Para ello emplearon 210 primero premolares mandibulares humanos y los infectados con *E. faecalis* por 21 días con una modificación del método de Haapasalo, se realizaron los desgastes y se recogieron las virutas correspondiendo a la profundidad de 200 y 400 micras. Concluyeron que el elemento natural con mejor halo de inhibición fue el propóleo, y este podría ser útil como un medicamento intraconducto por presentar buena eficacia contra el *E. faecalis*.

La farmacodinamia fue revisada en el 2005 por Bankova *et al.*⁷⁶, quienes destacaron las propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antioxidantes y antineoplásicas. No obstante, muchas de estas cualidades aun requieren de una verificación adicional como lo describen en el 2015 Kalyoncuoglu *et al.*⁷⁷

En el 2010 Kandaswamy *et al.*²², investigaron la actividad antimicrobiana de la clorhexidina al 2%, el propóleo, jugo de morinda, yodopovidona al 2% e hidróxido de calcio a una profundidad de 200 y 400 micras, para ello emplearon el método de Haapasalo con 180 piezas dentarias humanas que fueron infectadas por 21 días con

E. faecalis, estas muestras las dividieron en 6 grupos y las evaluaron a los días 1,3 y 5. Concluyeron que la clorhexidina produce la mejor eficacia antimicrobiana, seguido de la yodopovidona, el propóleo, el jugo de morinda y que tanto la clorhexidina como el jugo de morinda podrían ser usados como antibacterianos.

LA MENTA

Es una planta herbácea aromática de hojas verdes y flores de color blanco o violeta, se utiliza en muchos países para los desórdenes digestivos y como antibacteriano entre otras. Existen varios tipos, los más conocidos son la piperita, la hierbabuena y menta poleo (Anexo 2 fig. 15).²³⁻²⁴

En el 2015 De Souza Barros *et al.*²⁵, determinaron algunos elementos naturales (10% a 20%) como el potasio, magnesio, manganezo, cinc, cobre y hierro. Algunos flavonoides (6% al 26%) especialmente los heterósidos, además, poseen ácidos fenólicos como el rosmarínico, palmítico, esteárico, oleico, ursólico, caféico, caprico, clirigénico. Taninos bajo un principio amargo, en el caso del aceite esencial este está compuesto con timol, cineol, carvacrol, borneol, betabisolobeno, limoneno, alfa-pineno, miceno, canfeno, alfa terpineno, mentona. Otros compuestos (8% al 20%) fueron acetato de metilo, mentofurano, felandreno, cadineno, ácido isovalérico, iso-valerianato de metilo, pulegona, alcohol amílico, alcohol iso-amílico. Además, encontraron vitaminas como niacina y beta- caroteno.

Existen diferentes estudios sobre sus propiedades como en el 2009 Rasooli *et al.*⁷⁸, evaluaron el efecto antibacteriano de los aceites esenciales de Menta, Eucalyptus y clorhexidina contra *S. mutans* y *S. pyogenes*. Se le sometió a la cromatografía de gases (GC), espectrometría de masas y la prueba de sensibilidad bacteriana. Identificando el efecto antibacteriano para la Menta, Eucalyptus y clorhexidina.

En el 2014 Benbelaïd *et al.*²⁷ evaluaron varios aceites esenciales en el tratamiento de infecciones orales causadas por el *E. faecalis*, llegando a concluir que los aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas pueden ser usadas en el tratamiento de infecciones orales, especialmente las causadas por el *E. faecalis* multi drogo resistente.

LA MUÑA

Es una planta tipo arbusto leñoso con su parte superior frondosa de flores blancas, se desarrolla en la zona de montaña de los Andes (2700 msnm a 3400 msnm) con mayor presencia en Apurímac, Ayacucho, Cajamarca, Huánuco, Pasco, Huancavelica y Puno conocida con su nombre científico como *Minthostachys mollis*.²⁸

En el 2016 Lock *et al.*²⁹, describieron que el aceite esencial tenía una composición variable pero principalmente dos monoterpenos como pulegona y mentona, además,

presenta mentol, limonene, carvacrol, nerolidol, carvone, caryophyllene, linalool, germacrene.

En el 2019 Quezada *et al.*³⁰, determinaron la cantidad de aceite esencial obtenido de la muña, y la composición química con muestras de plantas frescas y almacenadas. Para ello utilizaron el proceso de destilación a vapor y el análisis cromatográfico. Se demostró que los niveles óptimos de obtención estuvieron en condiciones de humedad media. Y el análisis de composición demostró que las muestras frescas tienen mayor cantidad de componentes (42 frescas a 24 almacenadas). Demostrando así que son potencialmente útiles para su empleo en la industria farmacológica (Anexo 2 fig. 16).

Otro estudio interesante sobre la actividad antimicrobiana fue realizado en el 2021 por Cecchini *et al.*³¹, quienes describieron la actividad antibacteriana de la *Minthostachys verticillata* (*M. verticillata*) contra el *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), mediante la extracción del aceite esencial por destilación, luego se aplicó la cromatografía de gases y la prueba de sensibilidad bacteriana. Concluyeron que existe una inhibición en las concentraciones altas del producto a las 24 horas.

EFECTOS DE LA INCORPORACIÓN DE OTROS PRODUCTOS EN LA FUERZA DE ADHESIÓN DE LOS CEMENTOS ENDODÓNTICOS

Existen diferentes estudios sobre si el poder de adhesión es afectado desfavorablemente por la incorporación de diferentes sustancias, como ejemplo en el artículo del 2013 Ustun *et al.*⁸⁰, investigaron si la resistencia de adhesión se veía alterada por el uso del hidróxido de calcio o el propóleo mediante la prueba de push-out. El estudio demostró que en el tercio medio y tercio coronal no existen diferencias significativas sobre el desprendimiento, pero que en el tercio apical el propóleo resiste mucho más debido a que los túbulos dentinarios están obstruidos por el cemento.

En el 2017 Ghabraei *et al.*⁸¹, presentaron un estudio sobre el efecto del hidróxido de calcio remanente antes de la irrigación ultrasónica y la remoción mediante la lima de tipo “K” manual en la fuerza de adhesión del AH-26 y el cemento EndoSequence Bioceramic (Brasseler, Savannah, Georgia. EE.UU.), Emplearon 102 piezas uniradiculares y se les realizó un tratamiento de conductos rotatorio. Concluyeron que los restos del hidróxido de calcio requieren del uso del ultrasonido para no alterar a fuerza de adhesión del cemento AH-26 y BC Sealer.

En el 2006 Hoelscher *et al.*⁸², evaluaron el efecto antibacteriano máximo que se le podía adicionar al CE antes de modificar sus propiedades frente el *E. faecalis*, estas zonas de inhibición se midieron a las 48 horas. Concluyeron que dicho porcentaje

representaba el 10% del peso total del cemento que podría adicionarse y que podría producir máxima efectividad antibacterial adicionada.

Más recientemente, en el 2010 Baer *et al.*⁸³, evaluaron in vitro la efectividad antibacteriana de tres cementos endodónticos con la adición de amoxicilina mediante el método de sensibilidad bacteriana, este estudio sobre el *E. faecalis* y se consideró el porcentaje de combinación máximo del cemento con el antibacteriano del 10% (amoxicilina) del peso total. Se concluyó que todos los cementos endodónticos inhibieron el crecimiento del *E. faecalis* después de 1, 3 y 7 días luego de ser medidos.

IV. METODOLOGIA

Con la aprobación del comité de ética institucional y animal, (Anexo 1 fig. 1-3) este trabajo se procedió al desarrollo en 4 fases.

Fase 1: Determinar la respuesta antibacteriana de los elementos naturales (menta, muña, propóleo Jalks y tintura de propóleo) mediante el método de sensibilidad bacteriana sobre las cepas de frente a *E. faecalis* ATCC 2982 (American Type Culture Collection 2982, Manassas, VA, USA).

Con la aprobación del comité de ética institucional y animal (Anexo 1 fig. 2) para esta fase del estudio experimental in vitro se aplicó la prueba de sensibilidad bacteriana o llamada halo de inhibición de los diferentes elementos naturales con propiedad antibacteriana al *E. faecalis* (ATCC 2982).

Procedimiento:

Se aplicó la prueba de sensibilidad bacteriana o llamada “Halo de inhibición” a los elementos naturales seleccionados que fueron el propóleo Jalks al 36% procedente de Oxapampa (Jalks, Lima, Perú); Tintura de propóleo al 25% procedente de Oxapampa (All Natura Perú, Lima, Perú); menta piperita al 5% procedente de Uttar Pradesh (Ekala, Lima, Perú); y muña 5% procedente de Cajamarca (EOP, Lima, Peru).^{27, 29, 30, 33}

Esta fase se procedió con los siguientes métodos:

A. ACTIVACIÓN DE LA BACTERIA

La activación de la bacteria inicio con su descongelación del estado de crioconservación (-70°C) a una temperatura de refrigeración (4°C) por 1 hora, luego se colocó 3 gotas dentro del tubo de BHI (BRAIN HEART INFUSION Merck, Darmstadt, Hesse, Alemania) 6 ml. a temperatura de medio ambiente (15°C a 27°C) por 24 horas (Anexo 3 fig. 17).

B. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Se preparó los materiales e instrumentales (Anexo 4 fig. 18-25), se inició con la medida de peso de 22.5gr de polvo en BHA (BRAIN HEART AGAR Merck, Darmstadt, Hesse, Alemania) y se mezcló con 400ml de agua destilada (Química Industrial, Surquillo, Lima, Perú), luego se pesó 4gr de polvo de BHI y se mezcló con 100ml de agua destilada según las instrucciones (Anexo 4 fig. 26-32). Posterior al mezclado del BHA se observaron partículas sin diluir (Anexo 4 fig. 33), en el fondo del vaso que necesitaron ser agitadas en forma circular por 30 segundos, mientras que el BHI requirió de colocarlo en el microondas (Samsung, Seúl Corea del Sur) y calentarlo por 20 segundos, se agitó de forma circular por 20 segundos (2 veces) y con esto se verificó la ausencia de partículas en ambas mezclas. Y se llevaron a la autoclave (Anexo 4 fig. 34-36).

Se encendió el mechero para obtener un área de bioseguridad, en la gradilla se colocaron 16 tubos de ensayo estériles a los que se les agregó aproximadamente 6ml de BHI por tubo, se cerraron y se reubicaron en la gradilla. Para el uso del medio BHA se emplearon 40 placas Petri estériles, a cada una de ellas se le aplicó aproximadamente 10ml de BHA y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente en la incubadora hasta que este medio se volvió gelatinoso (Anexo 4 fig. 37-39).

C. COLORACIÓN GRAM

Para corroborar el crecimiento bacteriano se emplearon dos técnicas, la primera que es de tipo visual en donde la presencia de turbidez en el medio de cultivo indicó el desarrollo de la bacteria en el tubo de ensayo. El segundo método para determinar el crecimiento de la bacteria fue la aplicación de la coloración de Gram que permitió teñir las bacterias y fue así como se reconocieron en el microscopio.

El segundo procedimiento inició con el encendido del mechero para obtener un área de bioseguridad entre la bacteria y el operador, se realizó la apertura del tubo de ensayo con la parte interna del dedo meñique desenroscándola hasta que se abrió la tapa (Anexo5 fig. 40). Se utilizó un asa de siembra estéril (se colocó en el mechero hasta llegar a un color rojo cerezo y se dejó enfriar) se sumergió dentro del tubo de ensayo moviéndola por 5 segundos para luego retirarla con el producto en el asa de siembra, inmediatamente se cerró el tubo de ensayo sin dejar que la tapa tuviera contacto con alguna superficie y finalmente se colocó este tubo de ensayo en la gradilla (Anexo 5 fig. 41).

El asa de siembra se colocó en la lámina porta objetos con el contenido y tomó la forma de gota, esta se extendió a través de la lámina de derecha a izquierda y de arriba hacia abajo, esto se repitió en cada una de las 3 láminas que se usaron y el tubo con BHI se depositó en la incubadora (Anexo 5 fig. 42).

A las láminas se les dejó secar (1 minuto), luego se aplicó cristal violeta que reposó por 60 segundos para fijarse en la pared celular, y el retiro de excesos se realizó con agua (15 segundos). Se aplicó el tinte llamado Lugol por 1 minuto donde se estabilizó con el cristal violeta, se enjuagó la muestra con agua por 15 segundos y se retiró los excesos, se escurrió por 20 segundos. Se aplicó por 30 segundos el alcohol acetona para disolver la pared celular de las bacterias Gram negativas y se lavó por 15 segundos y luego se aplicó la safranina que tiñe a las bacterias Gram negativas (30 segundos), para luego se retiró el exceso con agua (15 segundos). Finalmente se dejó secar por 3 minutos, se colocó en el microscopio y se observó a la bacteria *E. faecalis* (ATCC 2982) en la lámina porta objetos (Anexo 5 fig. 42-49).

D. ESCALA DE TURBIDEZ DE MC FARLAND 0.5

Se garantizó que la cantidad de bacterias empleadas en este trabajo es la misma que en otras bibliografías, y que todas las placas Petri tuvieron cantidades similares, por ello, se aplicó el método de estandarización de Escala de turbidez de Mc Farland al 0.5.^{29, 30, 86, 87}. La escala de turbidez representa un promedio de bacterias entre 1 X

$10^6 - 5 \times 10^6$ UFC / μ L., y requirió del empleo de 3 tubos de ensayo (Figura 3A), el primero donde están las bacterias activadas del BHI, el segundo tubo de ensayo con el BHI puro y el tercer tubo de ensayo con la escala de turbidez de Mc Farland al 0.5, este tercer tubo es de color blanco transparente para diferenciarlo.

El procedimiento se realizó con el encendido del mechero para obtener un área de bioseguridad entre la bacteria y el operador, el primer tubo de ensayo (BHI con las bacterias) fue agitado por 30 segundos antes de empezar la disolución. Los tubos de ensayo 1 y 2 se abren y en el primero se introduce la pipeta (5ml.) se extrajo las bacterias y se depositaron en el segundo tubo, una vez que se transfirió se comparó con el tercer tubo y se repitió esta operación hasta llegar a obtener una turbidez semejante a la del tubo de muestra de Mc Farland 0.5 (Anexo 6 fig. 50). Finalmente se cierran los tubos y se colocaron en una gradilla dentro de la incubadora (Anexo 6 fig. 51).

E. PRUEBA DE SENSIBILIDAD BACTERIANA

La técnica de Kirby-Bauer modificada consistió en el enfrentamiento de los elementos naturales seleccionados contra la bacteria *E. faecalis* (ATCC2982) en el medio BHA de consistencia gelatinosa la cual fue capaz de soportar el peso de los discos de Whatman con su carga.^{29, 30, 81, 82.}

Este proceso inició con el rotulado del nombre en la parte inferior de las 4 placas Petri, se encendió el mechero para obtener un área de bioseguridad, en cada una de las placas se depositaron 4 discos de Whatman estériles y se taparon. Luego se colocó el tip a la micropipeta y se extrajo 0.8 μ L del elemento seleccionado, se colocó en el disco de Whatman, esto se repitió 3 veces más y se obtuvo los 4 discos impregnados del producto dentro de las placas Petri rotuladas. Se repitió el mismo procedimiento para los otros elementos seleccionados y se dejó reposar por 1 minuto para que el elemento se homogenice en el papel correctamente antes de guardarlo en la incubadora.

El enfrentamiento se realizó de la misma forma para las 8 placas Petri, se empleó el medio de cultivo BHA y la bacteria que se sembró fue el *E. faecalis* (ATCC 2982) presente en el BHI, ambos extraídos de la incubadora, con todos los elementos en el campo de trabajo se prendió el mechero para obtener un campo de bioseguridad entre los materiales y el operador. Se inició rotulando en la parte inferior de la placa Petri una línea horizontal y otra vertical formando 4 cuadrantes a los cuales se les numeró de 1 al 4 en 4 placas y del 5 al 8 en las otras 4 placas.

El tubo de ensayo con la siembra homogenizada de BHI (a la que se aplicó la escala de Mc Farland 0.5) se agitó por 15 segundos de forma circular, se destapó y se introdujo un hisopo estéril e impregnarlo con las bacterias *E. faecalis* (ATCC 2982) por 5 segundos, luego se extrajo el hisopo y se cerró el tubo de BHI. Se abrió la placa Petri (con el agar gelificado) y se colocó el hisopo, éste se desplazó

suavemente sobre el agar de derecha a izquierda y de arriba hacia abajo (técnica de diseminado), una vez terminado se giró la placa Petri 120° y se aplicó otra capa de *E. faecalis* (ATCC 2982) sobre el agar y se diseminó, por último, se volvió a girar 120° más y se aplicó una capa de *E. faecalis* (ATCC 2982) que también se diseminó. Con esto la placa Petri quedó con una siembra homogénea, se repitió el procedimiento a las 7 placas restantes y se guardaron en la incubadora.

La colocación de los discos de Whatman en el BHA inició con la extracción de las placas Petri rotuladas que contenían los discos de Whatman impregnados con los elementos naturales y las placas Petri con el BHA sembrado de *E. faecalis* (ATCC 2982) de la incubadora, así mismo se encendió el mechero para tener un área de bioseguridad entre los elementos y el operador, se abrió la placa Petri para transferir con una pinza disco de Whatman para depositarlo en la placa Petri con BHA rotulada según el elemento y se cerró ambas placas Petri. Finalmente se voltearon todas las placas y se colocó en la cámara de anaerobiosis por 24 horas (Anexo 7 fig. 52-59).

Al día siguiente se encendió el mechero para obtener un campo de bioseguridad entre los agares y el operador, se esperó 24 horas para que el desarrollo de las bacterias deje un halo de inhibición claro y observable a simple vista, esto favoreció la medición de dichos halos mediante un vernier luego de ubicar las placas Petri sobre la mesa (Anexo 7 fig. 59-62).

Fase 2: Determinar la respuesta antibacteriana del CE con la incorporación de los elementos naturales (menta, muña, propóleo Jalks y tintura de propóleo) seleccionados mediante el método de sensibilidad bacteriana sobre las cepas de *E. faecalis* (ATCC 2982).

Para esta fase del estudio experimental in vitro se aplicó la prueba de sensibilidad bacteriana o llamada halo de inhibición al CE con la incorporación de los elementos naturales seleccionados sobre las cepas de *E. faecalis* (ATCC 2982).

Procedimientos:

A. La producción del CE empleó como referencia la fórmula “Polifil” (esta fórmula cumplió con los requisitos de: ser polímero, caracterización sencilla, insumos de importación accesible, no tener una patente o ser un compuesto de libre para producción, brindar un tiempo de trabajo y fraguado aceptable, viscosidad de entre 10mm a 30mm y estar dentro de los valores permitidos por la FDA) descrita por “Poliquil Araraquara Polímeros Químicos” descrito en la literatura, en donde se sintetizó en base a dos compuestos.⁵⁰

El primer compuesto o llamado PASTA A (Base) incluyó los 4 insumos del “Polifil” (Anexo 8 tabla 1), más el elemento natural seleccionado como quinto insumo que fue la variable del trabajo (Anexo 8 fig. 63).⁵⁰

La pasta A se mezcló en una platina de vidrio cuadrada de 10 cms. por 10 cms., en la que se colocó 0.04gr de L-Iditol y 0.09ml de aceite de ricino, se mezcló con la espátula de cemento Hu- Friedy (Chicago, Illinois, Usa) por 20 segundos, se combinó con 0.21gr de óxido de zinc por 20 segundos, finalmente se agregó 0.20gr de carbonato de calcio y se mezcló por 20 segundos más (Anexo 8 fig.64).

Luego de la mezcla se configuró con forma rectangular de 5cm de largo por 1cm de alto, a continuación, se dividió en 5 cuadrados de 1cm por 1 cm, a cada cuadrado se le agregó 0.06ml de uno de los elementos naturales seleccionados (menta, muña, propóleo Jalks, tintura de propóleo) se mezcló por 20 segundos. Estas fueron las variables del trabajo dejando un grupo libre que se evaluó como control sin adición.

La Pasta B se realizó en la misma platina de vidrio cuadrada de 10 cm por 10 cm, en esta se mezcló 0.20ml de difenil metano con 0.05ml de disocianato de isoforona, por 20 segundos (Anexo 8 fig. 65-69), luego con una micropipeta se aplicó 0.05 ml a cada una de las 5 pastas A y finalmente se mezcló por 20 segundos. Se comprobó que el rango de elasticidad de ambas pastas mezcladas estuvo dentro del promedio (10mm a 30mm) de los 5 cementos endodónticos preparados que luego se guardaron en la incubadora.

La fórmula del CE y del CE con los elementos naturales cumplió con los valores y las recomendaciones de diversos autores frente al porcentaje de cada insumo, tal como que el elemento natural adicionado no excedió el 10% del peso total del

compuesto listo para usar.⁸³, a fin de evitar una alteración en el comportamiento de la dureza y flexibilidad. Así mismo, el empleo del aceite de ricino fue cercana al 10% del peso total del producto.⁸⁴, y que el carbonato de calcio en el CE no excediera el 34.5%.⁸⁵ (Anexo 8 fig. 70-71)

B. ACTIVACIÓN DE LAS BACTERIAS

La activación de la bacteria inició con su descongelación del estado de crioconservación (-70°C) a una temperatura de refrigeración (4°C) por 1 hora, luego se extrajo 1 ml y se dejó a temperatura ambiente (15°C a 27°C) en un tubo de 6 ml de BHI por 24 horas.

C. COLORACIÓN DE GRAM

Para observar la viabilidad bacteriana, se procedió con dos técnicas, la primera es de tipo visual, en donde la presencia de turbidez en el medio de cultivo indica el desarrollo de la bacteria en el tubo de ensayo. El segundo método determinó el crecimiento de la bacteria, se aplicó la coloración de Gram que tiñó las bacterias y se reconocieron en el microscopio.

El procedimiento inició con el encendido del mechero para obtener un área de bioseguridad entre la bacteria y el operador, se realizó la apertura del tubo de ensayo con la parte interna del dedo meñique desenroscándola hasta que se abrió la tapa. Se utilizó el asa de siembra estéril (se colocó en el mechero y se obtuvo un color

rojo cerezo y se dejó enfriar) se sumergió dentro del tubo de ensayo moviéndola por 5 segundos, luego se retiró con el producto en el asa de siembra, inmediatamente se cerró el tubo de ensayo sin dejar que la tapa tuviera contacto con alguna superficie y finalmente se colocó este tubo de ensayo en la gradilla.

El asa de siembra se colocó en la lámina porta objetos y el contenido tomó la forma de gota, esta se extendió a través de la lámina de derecha a izquierda y de arriba hacia abajo, esto se repitió en cada una de las 3 láminas que se utilizó con el tubo con BHI y se depositó en la incubadora.

A las láminas se les dejó secar (1 minuto), luego se aplicó cristal violeta que reposó por 60 segundos donde se fijó en la pared celular, el retiro de excesos se realizó con agua (15 segundos). Se aplicó el tinte llamado Lugol por 1 minuto donde se estabilizó con el cristal violeta, se enjuagó la muestra con agua por 15 segundos y se retiró los excesos, se escurrió por 20 segundos. Se aplicó por 30 segundos el alcohol acetona para disolver la pared celular de las bacterias Gram negativas y se lavó por 15 segundos, se agregó la safranina que tiñó las bacterias Gram negativas (30 segundos) luego se retiró el exceso con agua (15 segundos). Finalmente se dejó secar por 3 minutos, se colocó en el microscopio y se observó a la bacteria *E. faecalis* (ATCC 2982) en la lámina porta objetos.

D. ESCALA DE TURBIDEZ DE MC FARLAND 0.5

Para estandarizar la cantidad de bacterias empleadas en este trabajo es la misma que en otras bibliografías y que todas las placas Petri tuvieran cantidades similares, se aplicó el método de estandarización de Escala de turbidez de Mc Farland al 0.5, esta escala de turbidez representó un promedio de bacterias entre $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ UFC / μ L. Esto requirió el empleo de 3 tubos de ensayo, el primero donde estuvieron las bacterias activadas del BHI, el segundo tubo de ensayo con el BHI puro y el tercer tubo de ensayo con la escala de turbidez de Mc Farland al 0.5, este tercer tubo es de color blanco transparente para diferenciarlo.

El procedimiento se inició con el encendido del mechero para obtener un área de bioseguridad entre la bacteria y el operador, el primer tubo de ensayo (BHI con las bacterias) se agitó por 30 segundos antes de empezar la disolución. Los tubos de ensayo 1 y 2 se abrieron y al primero se le introdujo la pipeta (5ml.), se extrajeron las bacterias y se depositaron en el segundo tubo, una vez que se transfirió se comparó con el tercer tubo y se repitió esta operación hasta llegar a obtener una turbidez semejante a la del tubo de muestra de Mc Farland 0.5, se cerraron los tubos y se colocaron en una gradilla dentro de la incubadora.

E. TÉCNICA DE KIRBY-BAUER MODIFICADA

La técnica de Kirby-Bauer modificada consiste en el enfrentamiento de los CE. con la incorporación de los elementos naturales contra la bacteria *E. faecalis* (ATCC

2982) en el medio de cultivo BHA de consistencia gelatinosa la cual fue capaz de soportar el peso del CE. ^{29, 30, 81, 82}

Se encendió el mechero y se obtuvo un área de bioseguridad entre el área de trabajo y el operador, se extrajo 8 placas Petri con BHA de la incubadora y se rotularon mediante una línea vertical y otra horizontal en las 8 placas formando 4 campos en cada placa. En las primeras 4 placas se colocó una numeración del 1 al 4 y para las otras 4 placas se colocó la numeración del 5 al 8.

Se extrajo de la incubadora el tubo de ensayo con la siembra homogenizada de BHI (a la que se aplicó la escala de Mc Farland 0.5), se agitó por 15 segundos de forma circular, se destapó para introducir un hisopo estéril e impregnarlo con las bacterias *E. faecalis* (ATCC 2982) por 5 segundos, luego se extrajo el hisopo y se cerró el tubo de BHI. Se abrió la placa Petri (con el agar gelificado) y se colocó el hisopo, este se desplazó suavemente sobre el agar de derecha a izquierda y de arriba hacia abajo (técnica de diseminado), una vez terminado se giró la placa Petri 120° y se aplicó otra capa de *E. faecalis* (ATCC 2982) sobre el agar y se diseminó, por último, se volvió a girar 120° más y se aplicó una capa de *E. faecalis* (ATCC 2982) que también se diseminó. Con esto la placa Petri quedó con una siembra homogénea, y se repitió el procedimiento a las 7 placas restantes. Finalmente, el tubo de BHI se guardó en la incubadora.

Luego, se extrajo la platina de vidrio con los CE. preparados y se colocó una porción de aproximadamente 6mm por 6mm de cada uno los CE. de la platina de vidrio en el BHA, estos se trasladaron con una espátula de cemento Hu Friedy (Chicago, Illinois, EE. UU.), se cerraron las placas Petri y se guardaron en la incubadora.

Los elementos evaluados fueron CE (sin ningún elemento natural adicionado), CE-MU (cemento endodóntico con la adición de muña), CE-ME (cemento endodóntico con la adición de menta), CE-PJ (cemento endodóntico con la adición de propóleo Jalks), CE-TP (cemento endodóntico con la adición de la tintura de propóleo, CHX (clorhexidina al 2%), NaCl (cloruro de sodio al 9/00).

Luego de 24 horas, se encendió el mechero para obtener un campo de bioseguridad entre los agares y el operador, este tiempo fue necesario para que las cepas desarrollaran y dejaran un halo de inhibición claro y que se observó a simple vista, se extrajeron las 8 placas de la incubadora, y con cuidado se depositaron en la mesa de trabajo, con un vernier se midieron todas las placas Petri (Anexo 8 fig. 72)

Fase 3: Determinar el efecto citotóxico (CC50) del CE con la incorporación de los elementos naturales seleccionado (menta, muña, propóleo Jalks y tintura de propóleo) frente a la línea celular de MDCK (Madin Darby Canine Kidney - Merck Darmstadt, Hesse, Alemania).

Esta fase se realizó en el Instituto de Investigación Nutricional de La Molina (IIN-LM), este trabajo de tipo experimental in vitro utilizó la prueba de citotoxicidad por reducción de las sales del tetrazolio o 3-(4.5-dimetiltiazol-2-y1)-2.5-difeniltetrazolio bromuro o MTT (Bromuro de tetrazolio) con la línea celular MDCK empleando 1 gramo de cada CE.

Procedimiento:

A. LA PRUEBA DE CITOTOXICIDAD IN VITRO

Se realizó de acuerdo con su protocolo de utilización de este IIN-LM, y evaluó el grado de viabilidad celular en este caso las células MDCK, que tuvieron contacto con diferentes grupos CE sin adicionar elementos naturales, CE-TP, CE-ME, CE-MU, CE-PJ). El proceso inició con la siembra de los fibroblastos en una microplaca de 96 pozos estériles con una concentración de 1×10^4 de células sanas (se diferenciaron por el color del medio o cuando fue sometida a una fluoroscopia) aproximadamente.

B. PRODUCCIÓN DEL CEMENTO DE ENDODONCIA

Se preparó el CE que empleó como referencia la fórmula “Polifil” descrita por “Poliquil Araraquara Polímeros Químicos” descrito en la literatura, en donde se sintetizó en base a dos compuestos.⁵⁰

El primer compuesto o llamado PASTA A (Base) incluyó los 4 insumos del “Polifil”, más el elemento natural seleccionado como quinto insumo que fue la variable del trabajo.⁵⁰

La pasta A se mezcló en una platina de vidrio cuadrada de 10 cm por 10 cm, en la que se colocó 0.04gr de L-Iditol, y 0.09ml de aceite de ricino, se mezcló con la espátula de cemento Hu- Friedy por 20 segundos, se combinó con 0.21gr de óxido de zinc por 20 segundos, finalmente se agregó 0.20gr de carbonato de calcio y se mezcló por 20 segundos más (Anexo 10 fig. 83-84).

Luego de la mezcla se configuró con forma rectangular de 5cm de largo por 1cm de alto, a continuación, se dividió en 5 cuadrados de 1cm por 1 cm, a cada cuadrado se le agregó 0.06ml de uno de los elementos naturales seleccionados (Propóleo Jalks, Tintura de propóleo, menta y muña) (Anexo 2 fig. 4), mezclados por 20 segundos. Estas fueron las variables del trabajo dejando un grupo libre que se evaluó como control sin adición (Anexo 10 fig. 83).

La Pasta B se realizó en la misma platina de vidrio cuadrada de 10 cm por 10 cm, en esta se mezcló 0.20ml de difenil metano con 0.05ml de disocianato de isoforona (Anexo 8 fig. 64). Luego con una micropipeta se aplicó 0.05ml a cada una de las 5 pastas A (Anexo 8 fig. 67) y finalmente se mezcló por 20 segundos. Se comprobó que el rango de elasticidad de ambas pastas mezcladas estuviese dentro del

promedio (entre 10mm a 30mm) de los 5 cementos endodónticos preparados que luego se guardaron en la incubadora (Anexo 8 fig. 69).

La fórmula del CE y del CE con los elementos naturales cumplió con los valores y las recomendaciones de diversos autores frente a los porcentajes de los insumos, tales como el de adición del elemento natural el cual no excedió el 10% peso total.⁸⁶, a fin de evitar una alteración en el comportamiento de la dureza y flexibilidad. Así mismo, otros estudios demostraron que la mejor proporción para el empleo del aceite de ricino era cercana al 10% del peso total del producto.⁸⁷, y que el peso total de carbonato de calcio en el CE está en referencia al 34.5%.⁸⁸

C. PREPARACIÓN DEL MTT

Luego, cada muestra de CE se colocó dentro de un tubo de ensayo pequeño cual se extrajo con una micropipeta y se agregó a los pocillos de la microplaca, y se incubó a una atmósfera de presión al 5% de CO² a 37°C por 24 horas en una incubadora al 95% de humedad bajo condiciones de esterilidad.⁸⁶

Se añadió el MTT en cada pozo y se incubó por 4 horas a 37°C para permitir la formación de cristales de formazán, luego se eliminó el medio con 10 ml de dihidrogenasa mitocondria para luego agregar una solución solubilizadora como el isopropanol (100 microlitros) que formo cristales morados y se dejaron incubar hasta que los cristales del formazán fueran solubilizados por completo (Anexo 9

fig. 73-81).^{85,86}. Se emplearon 2 columnas de disoluciones, en cada columna hubieron 6 pozos de cada uno de los 5 cementos estudiados (4 de ellos con los elementos adicionados y el restante sin ningún aditivo) (Anexo 9 fig. 82).

La citotoxicidad se evaluó con una densidad óptica de 545 nm de longitud para el método de lectura de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (Thermo Fisher Inc, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), se agitó la microplaca por 10 minutos a temperatura ambiente y se midió cinco veces cada grupo para obtener el promedio, esta muestra se calibro con cada grupo de control (medio de cultivo sin muestra) mediante la siguiente fórmula (Anexo 9 fig. 83).⁸⁷

Los valores registrados fueron comparados con el grupo del CE. sin el agregado de elemento natural, el resultado representó la actividad mitocondrial y se clasificó cualitativamente como severo (<30%), moderado (30%-60%), ligero (60%-90%) y no toxico (> 90%).^{89, 90}

El resultado final se obtuvo de la expresión en porcentaje de aquellas células vivas según la fórmula de densidad óptica en las células tratadas por 100 y este resultado se dividió por la densidad óptica de las células control, con esta fórmula se calculó la concentración producida por la reducción del porcentaje de viabilidad celular.

Fase 4: Determinar la biocompatibilidad del CE con la incorporación de los elementos naturales (menta, muña, propóleo Jalks y tintura de propóleo) seleccionados mediante el conteo celular en un modelo animal en ratas.

Con la aprobación de comité de ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Anexo 1, 2) se utilizó en este estudio 12 ratas tipo WISTAR machos de 5 meses y entre 300gr a 400gr de peso, la adquisición se hizo en el Bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, la cual se encuentra acreditada y otorga los certificados de sanidad de cada uno de los modelos animales. Tipo de estudio experimental in-vitro se realizó por selección.

Se tubo como referencia para la optimización de los modelos animales la publicación científica “National Center for the replecement, refinement and reduction of animals in reserch” conocido como las 3 “R” (reemplazo, reducción, refinamiento).⁹¹ (Anexo 10 fig. 84-85), donde se buscó el reemplazo del animal por cualquier otro tipo de metodología si fuera posible, se redujo el número de modelos en lo posible y se refinó las técnicas para aminorar su sufrimiento como lo describieron en el 2010 Kikenny *et al.*⁹². Y para el número de ratas se tomó en cuenta los artículos de Herrera *et al.*⁹³ y Campos *et al.*⁹⁴.

Procedimientos: Se preparó los materiales e instrumentales (Anexo 10 fig. 86-108), estos fueron divididos en 5 grupos y fueron distribuidos de la siguiente forma: CE

puro, CE con incorporación de tintura de propóleo, CE con incorporación de propóleo Jalks, CE con incorporación de menta, CE con incorporación de muña.

Manejo Preoperatorio

El procedimiento se inició con la reubicación de las ratas del sótano del Laboratorio de investigación y Desarrollo (LID) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) al Bioterio de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega (UIGV) donde permanecieron 7 días para la aclimatación respectiva (Anexo 10 fig. 109-114).

Mientras se usaron las instalaciones, se respetó los estándares de calidad requeridos como fueron la humedad (50% a 70% de humedad), la temperatura (21°C a 23°C). La alimentación fue específica para las ratas (Alimento balanceado) adquirido en la Facultad de Zootecnia de la Universidad Agraria de la Molina (60gr a 80gr diarios) y agua embotellada ad libitum (a voluntad) cambiándose 2 veces al día (35ml a 50ml por vez). Cada animal estuvo en una jaula individual.

La preparación del tubo de policloruro de vinilo (PVC de grado médico) como DISPOSABLE SCALP VEIN SETS de KDL (Longwan, Zhejiang, CHINA), se realizó 24 horas antes de la cirugía de las ratas, se fabricaron 24 unidades, los tubos de PVC se trabajaron en condiciones de esterilidad (se pasó por una lámpara luz ultravioleta por 1 hora en Germilamp (De Giorgi, Milán, Italia) y fueron obtenidos

como producto del corte de segmentos de un tubo a 6 milímetros con un diámetro de 2.3 milímetros y un espesor de la pared de 0.4 milímetros la mitad de los tubos preparados fueron rellenos empleando una cureta de dentina para aplicar el cemento al interior hasta observarlo compacto por dentro en el cual ingresa una cantidad de 0.09 gramos por tubo (Anexo 10 fig. 115-120), la otra mitad fueron usados como control (Anexo 10 fig. 121-124).

Se preparó el CE que empleó como referencia la fórmula “Polifil” descrita por “Poliquil Araraquara Polímeros Químicos” descrito en la literatura, en donde se sintetizó en base a dos compuestos.⁵⁰ El primer compuesto o llamado PASTA A (Base) incluyó los 4 insumos del “Polifil”, más el elemento natural seleccionado como quinto insumo que fue la variable del trabajo.

La pasta A se mezcló en una platina de vidrio cuadrada de 10 cm por 10 cm, en la que se colocó 0.04gr de L-Iditol, y 0.09ml de aceite de ricino, se mezcló con la espátula de cemento N°24 (Hu- Friedy 24 p/cemento mg6, Rockwell St, Chicago, EE. UU.) por 20 segundos, se combinó con 0.21gr de óxido de zinc, estas fueron mezcladas por 20 segundos, finalmente se agregó 0.20gr de carbonato de calcio y se mezcló por 20 segundos más.

La Pasta A se configuró con forma rectangular de 5cm de largo por 1cm de alto la cual se dividió en 5 cuadrados de 1cm por 1 cm, a las 4 primeras se le agregó 0.06ml de los elementos naturales seleccionados (Propóleo Jalcs, Tintura de propóleo,

menta y muña), que fueron las variables del trabajo dejando un grupo libre que se evaluó como control, finalmente a cada porción del cemento preparado que recibió el elemento natural se mezclaron por 20 segundos.

La Pasta B se realizó en la misma platina de vidrio de 10 cm por 10 cm, en esta se mezcló 0.20ml de difenil metano con 0.05ml de diisocianato de isoforona por 20 segundos luego se dividió la mezcla en 5 partes iguales (cada una de 0.05ml) las que se agregaron a cada una de las pastas A y se mezcló por 20 segundos. Se comprobó que el rango de elasticidad (10mm a 30mm) de los 5 CE preparados que luego se guardaron en la incubadora por 24 horas.

La fórmula del CE consideró los valores y las recomendaciones de los siguientes autores, como la recomendación sobre el porcentaje del peso total para el elemento natural seleccionado donde se evitó que excediera el 10% del total.⁸⁶, con ello se evitó una alteración en el comportamiento de la dureza y flexibilidad. Así mismo, otros estudios demostraron que la mejor proporción para el empleo del aceite de ricino era cercana al 10% del peso total del producto.⁸⁷. Se consideró los estudios referentes al peso total del carbonato de calcio que está en referencia al 34.5%.⁸⁸. Se colocaron dentro de los tubos 0.09 mg de cada CE y se guardaron en una incubadora a temperatura ambiente por 24 horas

Manejo Quirúrgico

Se preparó el área quirúrgica para la anestesia (dorsal de la rata) se depiló el área (orientada de cabeza hacia la cola) y se desinfectó con yoduro de povidona al 10% y alcohol al 70% (Anexo 10 fig. 125). Se realizó la incisión con un bisturí N°15 con mango N°3 donde se profundizó 2 mm y abarcó una longitud de 10mm. Posteriormente se insertaron las pizas de disección para realizar un bolsillo por lado de trabajo lo que permitió obtener dos cavidades, en la primera de ella se colocó el tubo de PVC correspondiente al material experimental y el otro fue el tubo de PVC como control (Anexo 10 fig. 126-129).

Luego de la cirugía se colocaron 2 puntos de suturas de seda negra trenzada 5/0 TC 15 (Cirugía Peruana, Breña, Lima, Perú) y se controló las suturas previniendo la posibilidad de infecciones hasta el día de la toma de la muestra donde se evaluó a través de un estudio histopatológico de la biocompatibilidad crónica (21 días) determinado por la presencia de tejido inflamatorio (neutrófilos, macrófagos y mastocitos) (Anexo 10 fig. 130-131). Así como el detalle de los pesos de los 7 días de adaptación (Anexo 10 fig. 132)

Manejo Post Quirúrgico

Posterior a la intervención y observarlos atentamente, los modelos fueron llevados a cada una de sus jaulas, se les modificó la textura de la dieta a blanda mediante la técnica de moler su comida y mezclarla con un poco de agua. Esto se mantuvo de

esta forma por 3 días, posterior a estos 3 días se le regresó a la textura habitual de la dieta.

Se observó que posterior a la cirugía el peso de los modelos disminuyó hasta el tercer día, luego del cual en los días siguientes recuperaron lo perdido (25gr a 35gr aproximadamente) (Anexo 10 figura 133).

Manejo del protocolo de beneficencia

El procedimiento fue iniciado con aplicación de solución sedante (Xilazina en clorhidrato 0.24 ml por cada 100 gramos con el nombre de dormixyl 2® (Agrovet, Lima, Perú)) y se colocó la solución anestésica (ketamina en clorhidrato 0.12 ml por cada 100 gramos con el nombre de ket-A-100® (Agrovet, Lima, Perú)), ambas de tipo intramuscular.

El proceso de beneficencia se realizó según los protocolos de recolección de muestras el día 21 posterior a la cirugía de implantación de los productos, para ello se realizó el mismo procedimiento de sedación y anestesia a las modelos de estudio y la cirugía incluyó la zona circundante donde estaban presentes los tubos de polietileno incluyendo el tejido conectivo subcutáneo, el tejido obtenido fue colocado en un recipiente rotulado y codificado con buffer formalin al 10% con un pH 7.0, fueron recogidas por el técnico encargado de la recepción de muestras del laboratorio del Hospital Nacional Arzobispo Loayza (Anexo 10 fig. 134-137).

Manejo del Enmascaramiento

El proceso de codificación de muestras solo está a conocimiento del investigador que posee tanto los códigos de las muestras como de la correspondencia del modelo animal, de tal forma que ni el técnico ni los intervinientes en la cirugía pudieron saber que muestra correspondía a que rata para evitar sesgos en las lecturas.

Estudio Histomorfométrico

Para su procesamiento histoquímico fueron embebidos en metacrilato de glicol y pigmentadas con hematoxilina y eosina HE, se obtuvieron series de 5 micras (longitudinal al eje axial del tubo) permitió observar las áreas donde el contacto del producto con el tejido de forma directa. El proceso de fijado inicia con el contacto con el formaldehído luego se descalcifico en ácido nítrico por 16 horas, para de allí se realizó la inclusión mediante la deshidratación en alcohol (etanoles) a diferentes concentraciones que fueron desde 50% hasta el 100% o alcohol absoluto por una hora y estas se agitaron al menos 3 veces luego pasaron por xileno las piezas se transfirieron por parafina líquida (3 veces) en una estufa entre 45° a 60°. Luego se hizo el bloque dentro del molde en donde se colocó la parafina líquida donde quedó ubicado para los cortes a la muestra. Se colocó encima el casete y se dejó enfriar donde se recortó los excesos y quedo listo para recortarlo en el micrótopo.

El análisis se describió con un microscópico que estuvo a cargo de un patólogo quien analizó las muestras a 10X de zoom, 40X de zoom, 100X y de 200X de zoom de magnificación bajo un Microscopio binocular (Zeiss Primo Star 415500-0051-

000, Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemania). El patólogo analizó las muestras de forma ciega e independiente, concluyó que los análisis no presentaron conflicto entre ellas (Anexo 10 fig. 135-137).

La reacción del tejido se comparó con la del control mediante un análisis descriptivo en el estéreo microscopio sobre la densidad celular, en concordancia con los parámetros establecidos como el ISO 10993-6 (2007) la evaluación a las reacciones de los tejidos y basado en estudios previos, hicieron que el conteo de la proliferación celular sea el más adecuado para este trabajo, así como el edema de la parte periférica del tejido, las cuales fueron puntuados minuciosamente.

De cada muestra se seleccionaron 5 repeticiones, que se contaron y se promediaron para obtener el resultado final. Para ello se empleó el programa IMAGE-J (National Institutes of Health, Softronic, Barcelona, España), el cual permite de una forma didáctica el conteo celular interviniendo en aquellas células que su diferenciación no sea tan clara.

El uso de esta aplicación inició cuando se cargó la imagen de alta resolución al programa, se aplicaron clics en aquellas células de tejido inflamatorio presente, y luego de esto se llevaron los datos a una hoja de cálculo para obtener los promedios totales.

PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE INFORMACIÓN

El análisis estadístico empleó 4 pruebas para certificar los resultados. La primera incluye una tabla con las pruebas descriptivas, exploratorias y la prueba de normalidad de Shapiro – Wilk, la segunda es la prueba Unidireccional de ANOVA de subconjuntos homogéneos con Honestly Significant Difference (HSD) de Tukey, la tercera es la prueba post hoc de comparaciones múltiples con HSD Tukey y la cuarta es la caja de bigotes para interpretar más claramente los resultados.

V. RESULTADOS

El presente estudio caracterizó un cemento endodóntico y le agregó elementos naturales (menta, muña, propóleo Jalks y tintura de propóleo) brindándole una propiedad antibacteriana controlada frente al *E. faecalis* ATCC 2982; para ello se realizó el estudio dividiéndose en 4 fases, la primera fase un control antibacteriano de cada uno de los elementos naturales, la segunda fase un control antibacteriano de cada uno de los elementos naturales incorporados en el cemento endodóntico caracterizado, la tercera fase el estudio de viabilidad celular en MTT y la cuarta fase un estudio de biocompatibilidad en ratas.

En la tabla 1, se observó los resultados del trabajo sobre la eficacia antimicrobiana mostraron que los elementos naturales (menta, muña, propóleo Jalks y tintura de propóleo) en BHA frente al *E. faecalis* (ATCC 2982) con escala de turbidez de Mc Farland a 0.5 presentaron inhibición en el crecimiento bacteriano en un rango de 2.10 mm a 6.10 mm, distribuido de la siguiente forma: El promedio del halo de inhibición más alto fue la muña (5.95mm), seguido de la menta (4.45mm), luego el propóleo Jalks (4.25mm) y finalmente la tintura de propóleo (2.20mm).

En la tabla 2, los resultados del trabajo sobre la eficacia antimicrobiana mostraron que el CE tanto solo como con los elementos naturales en BHA frente al *E. faecalis* (ATCC 2982) con escala de turbidez de Mc Farland a 0.5 presentaron inhibición en el crecimiento bacteriano en un rango de 5.50 mm a 18.40 mm, distribuido de la siguiente forma: El promedio del halo de inhibición más alto fue el CE solo

(18.05mm), seguido del CE-ME (16.50mm), CE-MU (14.48mm), CE-TP (14.36mm) y finalmente CE-PJ (6.08mm).

En la tabla 3, los resultados de la prueba de citotoxicidad in vitro mediante la prueba de colorimetría basada en la reducción MTT del CE demostró los porcentajes de viabilidad en un valor mínimo de 0.614% y un máximo de 95.820% distribuido de la siguiente forma: El promedio de viabilidad más alto fue el CE (93.60%), seguido de CE-ME (77.44%), CE-MU (71.11%), CE-PJ (37.81%) Y CE-TP (14.67%).

En la tabla 4, los resultados sobre el conteo celular en base a histología (células de tipo inflamatoria neutrófilos, macrófagos y mastocitos) se basaron en la elección de un determinado segmento en la lámina porta objetos donde se visualizó el contacto entre el cemento evaluado y el tejido circundante, estos se expresaron mediante un conteo de la cantidad de células de tipo inflamatorias que va desde escaso (< 25), moderado (25 a 125) y severo (> 125 células). El rango en el que se presentó en este estudio fue un mínimo de 3 células y un máximo de 19 células, distribuidos de la siguiente forma: CE-MU (17.25 células), CE (16.25 células), CE-ME (13.00 células), CE-PJ (6.25 células) y CE-TP (4.00 células).

El análisis estadístico de la fase 1 demostró mediante las pruebas descriptiva, exploratoria que todos los grupos p eran mayores a 0.05 ($p > 0.05$), por lo tanto, no hubo diferencia significativa estadística entre los grupos (Shapiro-Wilk). Lo que se corroboró con la prueba unidireccional de ANOVA de subconjuntos homogéneos

con HSD Tukey (tabla 5) y la prueba de post hoc de comparaciones múltiples con HSD Tukey con una significancia mayor al 0.001 (tabla 6). El resultado se observó mediante la figura de la caja de bigotes (gráfico 1).

El análisis estadístico de la fase 2 demostró mediante las pruebas descriptiva, exploratoria que todos los grupos p eran mayores a 0.05 ($p > 0.05$), por lo tanto, no hubo diferencia significativa entre los grupos (Shapiro-Wilk). Lo que se corroboró con la prueba unidireccional de ANOVA de subconjuntos homogéneos con HSD Tukey (tabla 7) y la prueba de post hoc de comparaciones múltiples con HSD Tukey con una significancia mayor al 0.001 (tabla 8). El resultado se observó mediante la figura de la caja de bigotes (gráfico 2).

El análisis estadístico de la fase 3 demostró mediante las pruebas descriptiva, exploratoria que todos los grupos p eran mayores a 0.05 ($p > 0.05$), por lo tanto, no hubo diferencia significativa estadística entre los grupos (Shapiro-Wilk). Lo que se corroboró con la prueba unidireccional de ANOVA de subconjuntos homogéneos con HSD Tukey (tabla 9) y la prueba de post hoc de comparaciones múltiples con HSD Tukey con una significancia mayor al 0.001 (tabla 10). El resultado se observó mediante la figura de la caja de bigotes (gráfico 3).

El análisis estadístico de la fase 4 demostró mediante las pruebas descriptiva, exploratoria que todos los grupos p eran mayores a 0.05 ($p > 0.05$), por lo tanto, no hubo diferencia significativa estadística entre los grupos (Shapiro-Wilk). Lo que se

corroboró con la prueba unidireccional de ANOVA de subconjuntos homogéneos con HSD Tukey (tabla 11) y la prueba de post hoc de comparaciones múltiples con HSD Tukey con una significancia mayor al 0.001 (tabla 12). El resultado se observó mediante la figura de la caja de bigotes (gráfico 4).

Tabla 1

Valores descriptivos expresados en milímetros de los elementos naturales (menta, muña, propóleo Jalks y tintura de propóleo) enfrentados al *E. faecalis* (ATCC 2982)

Elemento Natural	N	Media	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo	Prueba de Normalidad (Shapiro-Wilk)
MU	4	5.950	0.129	5.800	6.100	0.972
ME	4	4.450	0.129	4.300	4.600	0.972
PJ	4	4.250	0.129	4.100	4.400	0.972
TP	4	2.200	0.070	2.100	2.250	0.161

Tabla 1: En donde la muña (MU), menta (ME), propóleo Jalks (PJ) y tintura de propóleo (TP)

Tabla 2

Valores descriptivos expresados en milímetros del CE y CE con elementos naturales (menta, muña, propóleo Jalks y tintura de propóleo) enfrentados al *E. faecalis* (ATCC 2982)

Elemento Natural	N	Media	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo	Prueba de Normalidad (Shapiro-Wilk)
CE	4	18.050	0.451	17.400	18.400	0.230
CE-ME	4	16.498	0.461	15.900	17.000	0.922
CE-MU	4	14.475	0.419	13.900	14.900	0.650
CE-TP	4	14.350	0.351	14.000	14.700	0.262
CE-PJ	4	6.075	0.650	5.500	7.000	0.399

Tabla 2: En donde el cemento endodóntico (CE), cemento endodóntico con menta (CE-ME), cemento endodóntico con muña (CE-MU), cemento endodóntico con propóleo Jalks (CE-PJ) y cemento endodóntico con tintura de propóleo (CE-TP) y el número de muestras (N).

Tabla 3

Valores descriptivos de la viabilidad celular del CE y CE con elementos naturales (menta, muña, propóleo Jalks y tintura de propóleo) expresados en porcentaje

Elemento Natural	N	Media	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo	Prueba de Normalidad (Shapiro-Wilk)
CE	4	93.600	0.450	91.620	95.820	0.404
CE-ME	4	77.440	3.855	70.372	83.190	0.252
CE-MU	4	71.110	0.971	67.302	76.210	0.755
CE-PJ	4	37.810	1.723	33.886	44.94	0.161
CE-TP	4	14.670	0.141	0.614	36.690	0.811

Tabla 3: En donde el cemento endodóntico (CE), cemento endodóntico con menta (CE-ME), cemento endodóntico con muña (CE-MU), cemento endodóntico con propóleo Jalks (CE-PJ) y cemento endodóntico con tintura de propóleo (CE-TP) y el número de muestras (N).

Tabla 4

Valores descriptivos de la biocompatibilidad celular del CE y CE con elementos naturales (menta, muña, propóleo Jalks y tintura de propóleo) expresados en unidades

Elemento Natural	N	Media	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo	Prueba de Normalidad (Shapiro-Wilk)
CE-MU	4	17.250	1.710	15.000	19.000	0.850
CE	4	16.250	1.500	15.000	18.000	0.224
CE-ME	4	13.000	0.820	12.000	14.000	0.683
CE-PJ	4	6.250	1.890	5.000	9.000	0.086
CE-TP	4	4.000	3.000	3.000	6.000	0.161

Tabla 4: En donde el cemento endodóntico (CE), cemento endodóntico con menta (CE-ME), cemento endodóntico con muña (CE-MU), cemento endodóntico con propóleo Jalks (CE-PJ) y cemento endodóntico con tintura de propóleo (CE-TP) y el número de muestras (N).

Tabla 5

Prueba Unidireccional de ANOVA de subconjuntos homogéneos con HSD Tukey

Grupo	N	1	2	3
MU	4	5.95		
ME	4		4.45	
PJ	4		4.25	
TP	4			2.20
Sig.		1.00	0.127	1.00

Tabla 5.- En donde la muña (MU), menta (ME), propóleo Jalks (PJ) y tintura de propóleo (TP).

TABLA 6

Prueba post hoc de comparaciones múltiples con HSD Tukey

(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Límite inferior	Límite superior
ME	PJ	0.200	0.083	0.127	0.046	0.446
PJ	ME	-0.200	0.083	0.127	-0.446	0.046

Tabla 6.- En donde la menta (ME), propóleo Jalks (PJ), realizado al intervalo de confianza 95%.

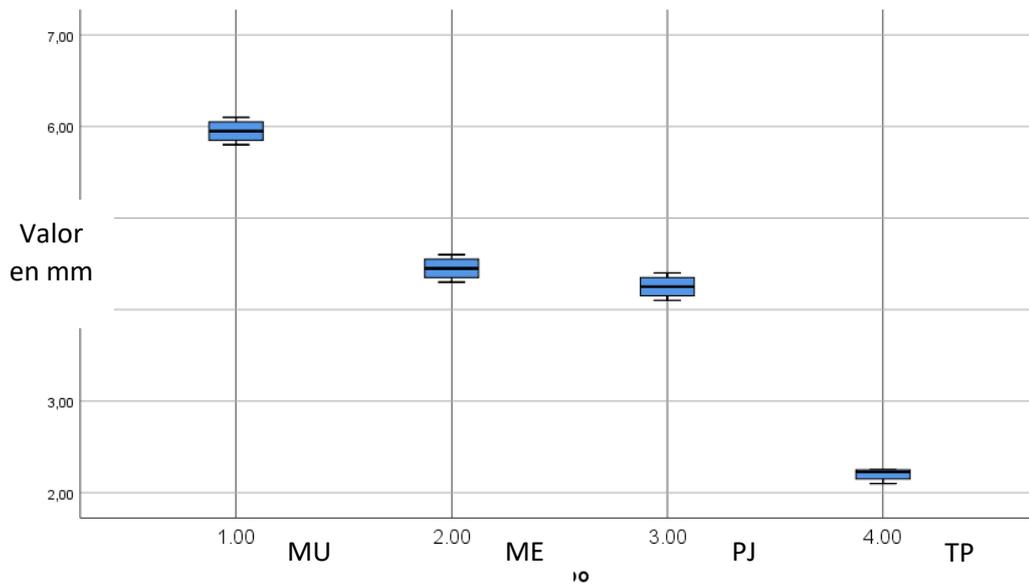


Gráfico 1.- Caja de bigotes de la respuesta antibacteriana de los elementos naturales (menta, muña, propóleo) mediante el método de sensibilidad bacteriana sobre las cepas de *E. faecalis* ATCC 2982. En donde muña (MU), menta (ME), propóleo Jalks (PJ) y tintura de propóleo (TP).

Tabla 7
Prueba post hoc de comparaciones múltiples con HSD Tukey

(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig	Límite inferior	Límite superior
CE	CE-ME	1.553	0.337	0.003	0.511	2.594
CE-ME	CE	-1.553	0.337	0.003	-2.594	-0.511
CE-MU	CE-TP	0.125	0.337	0.996	-0.916	1.166
CE-TP	CE-MU	-0.125	0.337	0.996	-1.166	0.916

Tabla 7.- En donde el cemento endodóntico (CE), cemento endodóntico con menta (CE-ME), cemento endodóntico con muña (CE-MU), cemento endodóntico con propóleo Jalks (CE-PJ) y cemento endodóntico con tintura de propóleo (CE-TP).

Tabla 8
Prueba Unidireccional de ANOVA de subconjuntos homogéneos con HSD Tukey

Grupo	N	1	2	3	4
CE-PJ	4	6.075			
CE-TP	4		14.350		
CE-MU	4		14.475		
CE-ME	4			16.498	
CE	4				18.050
Sig.		1	0.996	1	1

Tabla 8: En donde el cemento endodóntico (CE), cemento endodóntico con menta (CE-ME), cemento endodóntico con muña (CE-MU) y cemento endodóntico con tintura de propóleo (CE-TP), realizado al intervalo de confianza 95%.

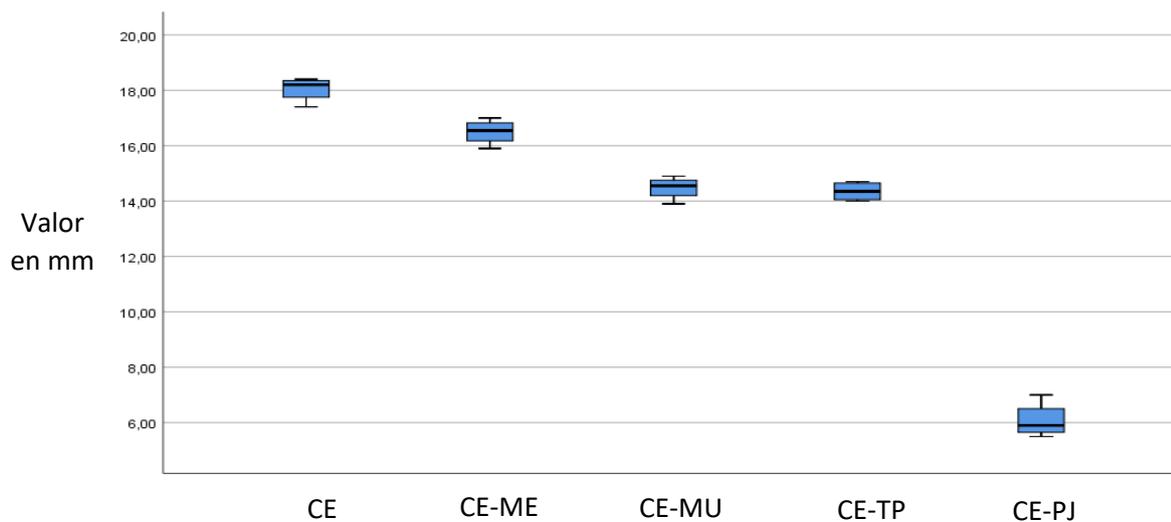


Gráfico 2: Caja de bigotes de la respuesta antibacteriana del CE con la incorporación de los elementos naturales seleccionados mediante el método de sensibilidad bacteriana sobre las cepas de *E. faecalis* (ATCC 2982). En donde el cemento endodóntico (CE), cemento endodóntico con menta (CE-ME), cemento endodóntico con muña (CE-MU), cemento endodóntico con tintura de propóleo (CE-TP) y cemento endodóntico con propóleo Jalks (CE-PJ)

Tabla 9

Prueba Unidireccional de ANOVA de subconjuntos homogéneos con HSD Tukey

Grupo	N	1	2	3	4	5
CE-TP	4	14.80				
CE-PJ	4		38.625			
CE-MU	4			69.850		
CE-ME	4				76.925	
CE	4					94.225
Sig.		1	1	1	1	1

Tabla 9: En donde el cemento endodóntico (CE), cemento endodóntico con menta (CE-ME), cemento endodóntico con muña (CE-MU), cemento endodóntico con propóleo Jalks (CE-PJ) y cemento endodóntico con tintura de propóleo (CE-TP) y el número de muestras (N).

Tabla 10

Prueba post hoc de comparaciones múltiples con HSD Tukey

(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Límite inferior	Límite superior
CE-ME	CE-MU	7.075	1.378	0.001	2.818	11.331
CE-MU	CE-ME	-7.075	1.378	0.001	-11.331	-2.819

Tabla 10: En donde el cemento endodóntico con menta (CE-ME), cemento endodóntico con muña (CE-MU), realizado al intervalo de confianza al 95%.

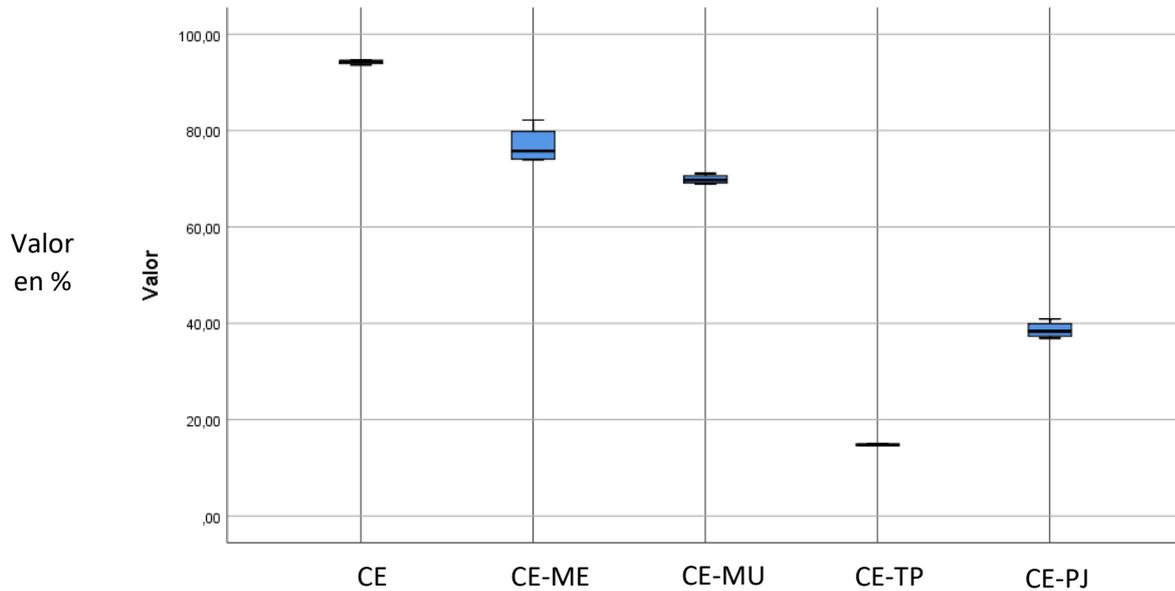


Gráfico 3: Caja de bigotes del efecto citotóxico del CE con la incorporación de los elementos naturales seleccionado frente a la línea celular de MDCK. Se observa el cemento endodóntico (CE), cemento endodóntico con menta (CE-ME), cemento endodóntico con muña (CE-MU), cemento endodóntico con tintura de propóleo (CE-TP) y cemento endodóntico con propóleo Jalks (CE-PJ)

Tabla 11

Prueba Unidireccional de ANOVA de subconjuntos homogéneos con HSD Tukey

Grupo	N	1	2	3
CE-TP	4	4.000		
CE-PJ	4	6.250		
CE-ME	4		13.000	
CE	4		16.250	16.250
CE-MU	4			17.250
Sig.		0.268	0.054	0.878

Tabla 11: En donde el cemento endodóntico (CE), cemento endodóntico con menta (CE-ME), cemento endodóntico con muña (CE-MU), cemento endodóntico con propóleo Jalks (CE-PJ) y cemento endodóntico con tintura de propóleo (CE-TP).

TABLA 12

Prueba post hoc de comparaciones múltiples con HSD Tukey

(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig	Límite inferior	Límite superior
CE-MU	CE	1.000	1.069	0.878	-2.299	4.299
CE-MU	CE-ME	4.250	1.069	0.009	0.951	7.549
CE	CE-MU	-1.000	1.069	0.878	-4.299	2.299
CE	CE-ME	3.250	1.069	0.054	-0.049	6.549
CE-ME	CE-MU	-4.250	1.069	0.009	-7.549	-0.951
CE-ME	CE	-3.250	1.069	0.054	-6.549	0.049
CE-PJ	CE-TP	2.250	1.069	0.268	-1.049	5.549
CE-TP	CE-PJ	-2.250	1.069	0.268	-5.549	1.049

Tabla 12: Cemento endodóntico (CE), cemento endodóntico con menta (CE-ME), cemento endodóntico con muña (CE-MU), cemento endodóntico con propóleo Jalks (CE-PJ) y cemento endodóntico con tintura de propóleo (CE-TP), realizado al intervalo de confianza 95%.

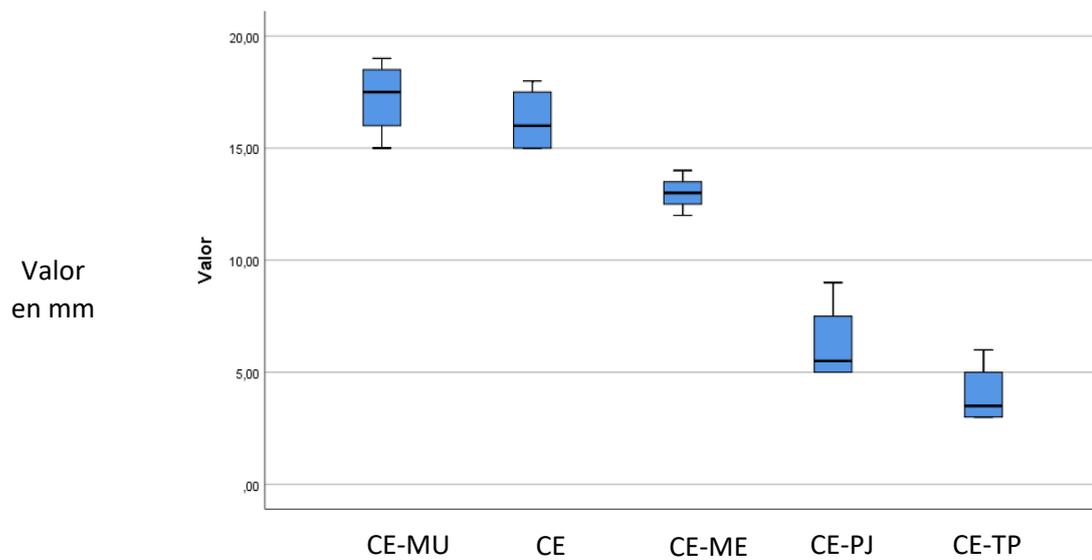


Gráfico 4: Caja de bigotes de la biocompatibilidad del CE con la incorporación de los elementos naturales seleccionados mediante el conteo celular en un modelo animal. Se observó que los valores de los grupos CE-MU y CE poseen algunos valores similares, el grupo CE-ME se ubicó más cerca a los valores de CE, así mismo los valores de los grupos CE-PJ y del CE-TP se encontraron próximo entre ellos.

VI. DISCUSION

En endodoncia, es fundamental el control y la erradicación de las bacterias por ser un área de difícil acceso, en este punto la presencia de bacterias recurrentes como el *E. faecalis* se han vinculado tanto en infecciones agudas como crónicas, esto se evidenció desde el trabajo de 1998 de Sundqvist *et al.*², donde determinaron la flora microbiana presente en los dientes con ambos tipos de enfermedades (agudas y crónica), luego de una falla en el tratamiento de conductos encontrando al *E. faecalis* como la bacteria con más frecuencia.

En tiempos donde la resistencia bacteriana ha aumentado, el uso de los elementos naturales en odontología ha ganado importancia tanto para el paciente como para el operador, el conferir propiedades antibacterianas a los elementos utilizados, se convirtió en una meta cada vez más instaurada en los productos dentales.¹⁷

Por ello, esta investigación evaluó las propiedades antimicrobianas, citotoxicidad y biocompatibilidad de 4 elementos naturales dentro de un CE, este trabajo se realizó en 4 fases.

En la primera fase, se determinó el efecto antibacteriano de cada uno de los elementos naturales frente al *E. faecalis* (ATCC 2982). En el caso de la Muña podemos citar el trabajo del 2016 de Torrenegra-Alarcón *et al.*⁹⁷, que identificaron

el efecto antibacteriano, al igual que en este trabajo (5.98 mm). En el caso de la menta se citó el trabajo de 1995 Sivropoulou *et al.*⁹⁸, quienes identificaron el efecto antibacteriano que en este trabajo se obtuvo un halo de 4.45 mm, hay que remarcar que a pesar de venir de distintos países ambos son de regiones de altura. Finalmente, para los estudios del propóleo se empleó como referencia los artículos del 2017 de Haripriya *et al.*⁹⁹, en el 2017, y en el 2008 Ahangari *et al.*¹⁰⁰, quienes obtuvieron los siguientes resultados, el propóleo Jalks (4.25mm) y la tintura de propóleo (2.2 mm) comprobando que todos los elementos estudiados produjeron un efecto antibacteriano, la diferencia pudo deberse a las distintas concentraciones de cada uno pues ambos provienen de la misma región natural. Se le realizó las pruebas estadísticas correspondientes y se identificó que no hubo diferencia significativa entre los productos MU, ME o PJ y TP.

En la segunda fase se combinaron los elementos naturales con el CE y se comprobó la presencia del efecto antibacteriano con todos los elementos naturales como fue en el caso de la menta (16.50 mm), la muña (14.48 mm), la tintura de propóleo (14.35 mm) y el propóleo Jalks (6.08 mm). En el estudio del 2016 de Kangarlou *et al.*¹⁰¹, quienes midieron los halos de la inhibición de diversos productos adicionados (amoxicilina, triple pasta antibiótica y nano partícula de plata), demostraron que es posible conferir propiedades antibióticas al CE a partir de otros productos (CE con amoxicilina 11.5 mm, CE con triple pasta 19.5 mm y CE con nano partícula de plata 12.0 mm). Otros autores en el 2008 como Hoelscher *et al.*⁸², emplearon doxiciclina con halos de 19.6 mm, clindamicina con un halo de 13.9 mm, y metronidazol con

un halo 0.6 mm, con ello corroboramos la obtención del efecto mediante la combinación con otros productos.

Es posible que la síntesis de los elementos naturales intervino de alguna forma en los resultados obtenidos, por ello, a pesar de tener un proceso estandarizado denominado destilación por arrastre de vapor de agua de las partes aéreas, que permite controlar la pureza y cristalinidad del producto, se debe tener en cuenta que la técnica de obtención es sencilla, económica y eco amigable en donde pudo existir un rango de discrepancia entre los valores obtenidos y de aquellos revisados en la literatura, sin embargo, existen otras técnicas como la obtención del producto mediante el prensado el cual tiene desventajas como ser un proceso discontinuo, una menor velocidad de proceso, elevado espacio necesario y aumentar la mano de obra. Existe otra técnica denominada extracción con solventes volátiles pero el proceso de obtención del producto no es tan exacto y esto podía producir márgenes de variación mayores y, por ende, valores diferentes a los obtenidos debido a que requiere de tiempos más largos y el contenido de trazas de los solventes utilizados limita su uso en la industria de los alimentos o farmacéutica.

Esta bacteria fue elegida por estar presente en un mayor porcentaje (44%) en los procesos infecciones apicales como lo describe el estudio en 1998 de Sundqvist *et al.*², su artículo sobre el análisis microbiológico de los dientes que han fallado al tratamiento endodóntico y que resultaron en un retratamiento conservador, hicieron una revisión etiológica sobre todos los microorganismos recuperados del conducto

radicular después de remover el contenido de la raíz. Otros estudios como el de 2009 de Pardi *et al.*¹⁰², identificaron alrededor de 60% de *E. faecalis* en piezas dentales donde fracaso el tratamiento de conductos debido a la facilidad de esta bacteria a vivir dispuesta en cadena o en pares, ser Gram positiva, anaerobia facultativa, inmóvil, no esporulada, sobrevive en ambientes tóxicos para otras bacterias y es resistente al Hidróxido de Calcio. Por lo antes expuesto, el CE y la incorporación de elementos naturales al producto le confieren una propiedad antibacteriana lo que redujo el porcentaje de fracasos debido a la contaminación bacteriana. Las pruebas estadísticas demostraron que no hubo diferencia significativa entre los grupos.

En la tercera fase se demostró el efecto citotóxico (cc50) in vitro mediante la prueba MTT de líneas celulares de mamíferos MDCK (Madin Darby Canine Kidney) de ATCC (American Type Culture Collection), esta línea celular es la más usada en el Perú debido a ser una de las más accesibles en los laboratorios que trabajan cultivos celulares de forma particular respaldadas por ser un medio que permite hasta la replicación de virus.¹⁰³, aunque el estudio del 2016 Arun *et al.*¹⁰⁴, evaluaron la citotoxicidad de 4 cementos endodónticos y concluyeron que existe la más alta viabilidad en el Sealapex (96.80%) seguido del AH Plus (90.76%) fue realizado en fibroblastos. En este trabajo de investigación se obtuvo valores máximos en la viabilidad celular (94.23%) para el CE, debe de tenerse en cuenta todos los exámenes antes de tomar una decisión. El resultado estuvo muy próximo al realizado por Arun *et al.*¹⁰⁴.

Cabe resaltar que otros autores como en el 2018 Troiano *et al.*¹⁰⁵, obtuvieron una viabilidad media e inferior realizado en células osteoblásticas. Otro estudio de viabilidad como el del 2018 Szczurko *et al.*¹⁰⁶, que obtuvieron una viabilidad de la media realizada en fibroblastos de ligamento periodontal humano. Se le aplicaron las pruebas estadísticas correspondientes y se identificó que no había diferencia significativa entre los grupos.

En la fase 4, el CE y los CE con los elementos naturales adicionados se demostró ser biocompatibles y tuvieron diferencias estadísticas significativas en tres casos (CE-MU con CE, CE-ME con CE y CE-PJ con CE-TP. Los estudios del 2017 de Cintra *et al.*¹⁰⁷, realizados en ratas Wistar machos de 3 meses de entre 250 gr a 280 gr, determinaron que la reacción inflamatoria del producto estaba en la zona media (entre 25 a 125 células inflamatorias), los valores que se han encontrado en el trabajo realizado estuvieron entre 4 a 17 células de promedio.

Resultados similares como en el 2022 de Ashraf *et al.*¹⁰⁸, realizado en ratas Wistar machos de entre 400 gr a 500 gr, identificó que la reacción inflamatoria del producto estaba en una zona media (> 25 células inflamatorias), superiores a los valores de este trabajo.

Luego de realizar el estudio Histomorfométrico con el software Image J, se necesitó de un microscopio de luz multicabezal de 10X (Programa de dominio público desarrollado en el National Institutes de Health). Este programa permitió contar las células correspondientes al área determinada por captura previa de la imagen de las láminas histológicas, lo que se evidenció una relación entre el efecto antibacteriano y viabilidad celular y que estadísticamente no hubo diferencias significativas entre las muestras.

Finalmente, estos estudios demostraron que el CE-TP y el CE-PJ además de ser antibacterianos, se encuentran en un nivel de alta biocompatibilidad por su nivel bajo de presencia de células inflamatorias, por ello el empleo de estudios in vivo, como son los modelos animales permite un nivel superior de exactitud para la elaboración de estos productos obteniéndose datos reales en tiempo real, es importante mencionar que la limitación principal está en el número máximo de modelos animales con la que se permitió trabajar este estudio. Existen literaturas que trabajan con muestras mínimas superiores a 20 animales por grupo y el tiempo de evaluación fue más extenso.

Se debe considerar emplear este tipo de productos, tanto en el efecto antibacteriano como en su efecto de biocompatibilidad, ya que por ahora no existe un CE que cumpla con los objetivos ideales. Estos cementos endodónticos cuentan con un nuevo concepto y cumple con la normativa necesaria, sería esencial para su producción considerar nuevas investigaciones en esta línea para registrar una

patente que pueda utilizarse en casos clínicos posteriores y que sea implantada como parte de los protocolos del tratamiento pulpar en la clínica docente asistencial de la UPCH.

VII. CONCLUSIONES

1. Se identificó la propiedad antibacteriana en los 4 elementos naturales (muña, menta, propóleo Jalks y tintura de propóleo) dentro de los cuales la muña obtuvo el halo más grande 5.95 mm, frente a las cepas del *E. faecalis* (ATCC 2982).
2. Se determinó la sensibilidad bacteriana del CE (18.1 mm), y el CE-ME obtuvo el halo más grande (16.50 mm) de los CE adicionados.
3. Se determinó la viabilidad celular para el CE (94%), así como al CE-ME con un 74%.
4. Se determinó la biocompatibilidad del CE con toxicidad leve en todos los casos, el que menor cantidad de células inflamatorias presentó fue CE-TP (4 células inflamatorias), seguido del CE-PJ (6.25 células inflamatorias).

El CE a base de propóleos indujo una respuesta inflamatoria más leve que el CE por sí solo.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Desarrollar otros cementos endodónticos experimentales con distintos elementos naturales con el fin de evaluar el efecto antibacteriano.
2. Realizar investigaciones adicionales con un número mayor de modelos animal para validar aún más los resultados obtenidos en el estudio preliminar. Debido a la limitación en el número reducido de modelo animal permitido por el Comité Institucional de Ética para el uso de animales en la UPCH.
3. Realizar nuevas investigaciones sobre el CE evaluando no solo los halos de inhibición, citotoxicidad o biocompatibilidad, sino otras metodologías tales como compresión, módulos de elasticidad y espectrometría de Raman.
4. Realizar nuevas investigaciones del CE experimental utilizando otras técnicas de evaluación como volumen, reabsorción del material en diferentes periodos de tiempo.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Ruiz Torres JK. Prevalencia de enfermedades pulpares en pacientes atendidos en la clínica odontológica de la ULADECH, Chimbote 2018 [Tesis de pregrado]. Áncash: Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote; 2022. Recuperado a partir de: <https://repositorio.uladech.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13032/27183>.
- 2.- Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998; 85(1):8-93.
- 3.- Olczak K, Pawlicka H. Evaluation of the Sealing Ability of Three Obturation Techniques Using a Glucose Leakage Test. *Biomed Res Int.* 2017; 2017:2704094.
- 4.- Belladonna FG, Calasans-Maia MD, Novellino Alves AT, de Brito Resende RF, Souza EM, Silva EJ, Fidel SR, De-Deus G. Biocompatibility of a Self-adhesive Gutta-percha-based Material in Subcutaneous Tissue of Mice. *J Endod.* 2014; 40(11):1869-1873.
- 5.- Modh H, Sequeira V, Belur A, Arun N, Dhas S, Fernandes G. Newer Trends in Endodontic Treatment: A Review. *IOSR-JDMS.* 2018; 17(1):14-16.
- 6.- Mokhtari H, Shahi S, Janani M, Reyhani MF, Mokhtari Zonouzi HR, Rahimi S, Sadr Kheradmand HR. Evaluation of Apical Leakage in Root Canals Obturated with Three Different Sealers in Presence or Absence of Smear Layer. *Iran Endod J.* 2015; 10(2):131-134.
- 7.- Jorgensen B, Williamson A, Chu R, Qian F. The Efficacy of the WaveOne Reciprocating File System versus the Protaper Retreatment System in Endodontic Retreatment of Two Different Obturating Techniques. *J Endod.* 2017; 43(6):1011-1013.
- 8.- Huang Y, Orhan K, Celikten B, Orhan AI, Tufenkci P, Sevimay S. Evaluation of the sealing ability of different root canal sealers: a combined SEM and micro-CT study. *J Appl Oral Sci.* 2018; 26:e20160584.
- 9.- Yanpiset K, Banomyong D, Chotvorrarak K, Srisatjaluk RL. Bacterial leakage and micro-computed tomography evaluation in round-shaped canals obturated with bioceramic cone and sealer using matched single cone technique. *Restor Dent Endod.* 2018; 43(3):30.
- 10.- Jain S, Adhikari HD. Scanning electron microscopic evaluation of marginal adaptation of AH-plus, GuttaFlow, and RealSeal at apical one-third of root canals – Part I: Dentin-sealer interface. *J Conserv Dent.* 2018; 21(1):85-89.
- 11.- Shipper G, Orstavik D, Teixeira FB, Trope M. An Evaluation of Microbial Leakage in Roots Filled with a Thermoplastic Synthetic Polymer-Based Root Canal Filling Material (Resilon). *J Endod.* 2004; 30(5):342-347.

- 12.- Kitagawa H, Kitagawa R, Tsuboi R, Hirose N, Thongthai P, Sakai H, Ueda M, Ono S, Sasaki JI, Ooya T, Imazato S. Development of endodontic sealers containing antimicrobial polymer particles with long term antibacterial effects. *Dent Mater.* 2021; 37(8): 1248-1259.
- 13.- Guanche Gallardo D, Issac M. La vigilancia tecnológica y el proceso productivo del propóleos. *Econ. y Desarrollo.* 2023; 167(2), e14. Recuperado en 02 de mayo de 2024, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0252-85842023000200014&lng=es&tlng=es.
- 14.- Mat Hussin NF, Altarawneh HMD, Wan Nik WNN, Arzmi MH, Ismail A, Ab Ghani SM. Therapeutic effect of natural herbs in dentistry: a narrative review. *JUMMEC.* 2024; 1(1):187-203.
- 15.- Concentración in vitro del aceite esencial de muña sobre el crecimiento de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 [Internet]. Instituto Universitario de Innovación Ciencia y Tecnología Inudi Perú; 2022 [cited 2024 May 2]. Recuperado en: <https://editorial.inudi.edu.pe/index.php/editorialinudi/catalog/book/74>
- 16.- Baranwal R, Duggi V, Avinash A, Dubey A, Pagaria S, Munot H. Propolis: A Smart Supplement for an Intracanal Medicament. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2017; 10(4):324-329.
- 17.- Arora S, Saquib AS, Algarni YA, Kader MA, Ahmad I, Alshahrani MY, Saluja P, Baba SM, Abdulla AM, Bavabeedu SS. Synergistic Effect of Plant Extracts on Endodontic Pathogens Isolated from Teeth with Root Canal Treatment Failure: An In Vitro Study. *Antibiotics.* 2021; 10(1):552-562.
- 18.- Saha S, Dhinsa G, Ghoshal U, HussainAN, Nag S, GargA. Influence of plant extracts mixed with endodontic sealers on the growth of oral pathogens in root canal: An in vitro study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2019; 37(1):39-45.
- 19.- Díaz-Suyo JA, Proaño-de Casalino D. Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa-Perú, sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*. *Rev Estomatol Herediana.* 2011; 21(3):125-130.
- 20.- Ahangari Z, Naseri M, Vatandoost F. Propolis: Chemical Composition and Its Applications in Endodontics. *IEJ.* 2018; 13(3): 285-292.
- 21.- 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.
- 22.- Kandaswamy D, Venkateshbabu N, Gogulnath D, Kindo AJ. Dentinal tubule disinfection with 2% chlorhexidine gel, propolis, morinda citrifolia juice, 2% povidone iodine, and calcium hydroxide. *Int Endod J.* 2010; 43(5):419-423.

- 23.- De la Paz Naranjo J, Maceira Cubiles MA; Corral Salvado A, Gonzalez Campos C. Actividad antiparasitaria de una decocción de *Mentha piperita* Linn. *Rev Cub Med Mil.* 2006; 35(3):1-4.
- 24.- Quattrocchi, U. *CRC World Dictionary of Plant Names: Common Names, Scientific Names, Eponyms, Synonyms, and Etymology.* Reino Unido: CRC Press; Febrero 2023; p. 1658-1659
- 25.- De Sousa Barros A, De Moraes SM, Travassos Ferreira PA, Pinto Vieira IG, Aragao Craveiro A, Dos Santos Fontenelle RO, Silva Alencar de Menezes JE, Ferreira da Silva FW, Araújo de Sousa H. Chemical composition and functional properties of essential oils from *Mentha* species. *J Indcrop.* 2015; 76: 557-564.
- 26.- Shayegh S, Rasooli I, Taghizadeh M, Astaneh SD. Phytotherapeutic inhibition of supragingival dental plaque. *Nat Prod Res.* 2008; 22(5):428-39.
- 27.- Benbelaid F, Khadir A, Abdoune MA, Bendahou M, Muselli A, Costa J. Antimicrobial activity of some essential oils against oral multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* in both planktonic and biofilm state. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2014; 4(6): 463-472.
- 28.- Güisa DP y Rincón LM. Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* combinado con inactivación térmica sobre cepas de *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*. Bogotá DC 2007 [Tesis de preprago]. Cundinamarca: Pontificia Universidad Javeriana; 2007. Recuperado a partir de: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8194/tesis101.pdf>.
- 29.- Lock O, Perez E, Villar M, Flores D, Rojas R. Bioactive Compounds from Plants Used in Peruvian Traditional Medicine. *Nat Prod Commun.* 2016; 11(3): 315-37.
- 30.- Quezada WF, Quezada WD, Travez A, Arias G, Cevallos E, Zambrano Z, Brito H, Salazar K. Essential oil of *Minthostachys mollis*: extraction and chemical composition of fresh and stored samples. *AJMAP.* 2019; 5: 59-71.
- 31.- Cecchini ME, Paoloni C, Campra N, Picco N, Grosso MC, Soriano Perez ML, Alustiza F, Cariddi N, Bellingeri R. Nanoemulsion of *Minthostachys verticillate* essential oil. In-vitro evaluation of its antibacterial activity. *Heliyon.* 2021; 7: e05896.
- 32.- Leonardo MR. Endodoncia tratamiento de conductos radiculares. Araraquara – São Paulo Brasil: Artes médicas Latinoamérica; 2005; p 941-1048.
- 33.- Tyagi S, Tyagi P, Mishra P. Evolution of root canal sealers: An insight story. *Eur J Gen Dent.* 2013; 2: 199-218.
- 34.- Bezerra Da Silva LA, Bertasso AS, Pucinelli CM, da Silva RAB, de Oliveira KMH, Sousa-Neto MD, Consolaro A. Novel endodontic sealers induced satisfactory tissue response in mice. *Biomed Pharmacother.* 2018; 106:1506-1512.

- 35.- Buchanan LS, Endodontic Obturation Techniques: The State of the Art in 2015. *Dent Today*. 2015; 34(3):90-95.
- 36.- Mayid BU, Doky CM. Obturación con gutapercha termoplastificada. Informe de dos casos clínicos. *Odovtos - Int J Dent Sc*. 2011; (12):73-80.
- 37.- Lone MM, Khan FR, Lone MA. Evaluation of Microleake in Single-Rooted teeth obturated with Thermoplasticized Gutta-Percha Using Various Endodontic Sealers: An In-Vitro Study. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2018; 28(5):339-343.
- 38.- Colombo M, Poggio C, Dagna A, Meravini MV, Riva P, Trovati F, Pietrocola G. Biological and physico-chemical properties of new root canal sealers. *J Clin Exp Dent*. 2018; 10(2):120-126.
- 39.- Tedesco M, Chain MC, Bortoluzzi EA, da Fonseca Roberti Garcia L, Alves AMH, Teixeira CS. Comparison of two observational methods, scanning electron and confocal laser scanning microscopies, in the adhesive interface analysis of endodontic sealers to root dentine. *Clin Oral Investig*. 2018; 22(6):2353-2361.
- 40.- Tomson RM, Polycarpou N, Tomson PL. Contemporary obturation of the root canal system. *Br Dent J*. 2014; 216(6):315-322.
- 41.- Rathi CH, ChandakM, Nikhade P, Mankar N, Chandak M, Khatod S, Motwani N, Jaiswal A. Functions of Root Canal Sealers- A Review. *J Evolution Med Dent Sci*. 2020; 9(17): 1454-1458.
- 42.- Kalman L, Lui C. Preliminary investigation of a novel endodontic obturator. *J Res Dent*. 2017; 5(2):46-50.
- 43.- Gjorgievska ES, Nicholson JW, Coleman NJ, Booth S, Dimkov A, Hurt A. Component release and mechanical properties of endodontic sealers following incorporation of antimicrobial agents. *Biomed Res Int*. 2017; 2017:2129807.
- 44.- Beltrán M, Marcilla A. *Tecnología de Polímeros*. Alicante - España: Diazotec; 2012; p 19-27
- 45.- Narendra C, Kiran M, Pinki P, Jyoti C, Paridhi K. *Dental Polymers: Applications*. *Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials*. 2015; 2015:2501-2522.
- 46.- Lioni C. Agentes selladores. Relación entre la velocidad de reabsorción y la biocompatibilidad. *Electronic J Endod Rosario*. 2010; 9(2)1-462.
- 47.- Jafari F, Samadi Kafil H, Jafari S, Aghazadeh M, Momeni T. Antibacterial Activity of MTA Fillapex and AH 26 Root Canal Sealers at Different Time Intervals. *Iran Endod J*. 2016; 11(3):192-197.
- 48.- Abarca Alvarado CM, Lemus Melara ME, Núñez Escobar FR, Pacheco Cardona LG, Tobar Tobar, JE. Evaluación de las propiedades de los conos de guta-percha y cementos selladores utilizados en la obturación de conductos radicuales.

- 49.- Tandon B, Uppin VM, Hogade SA, Chaudhry S, Bansal S, Bansal S. Antibacterial Activity of Four Root Canal Sealers against *Enterococcus faecalis* at 1st, 3rd, 5th, and 7th Day Duration: An In Vitro Study. *Indian J Dent Sci.* 2017; 9(2): 98-104.
- 50.- Marín-Bauza GA, Silva-Sousa YT, da Cunha SA, Rached-Junior FJ, Bonetti-Filho I, Sousa-Neto MD, Miranda CE. Physicochemical properties of endodontic sealers of different bases. *J Appl Oral Sci.* 2012; 20(4):455-461.
- 51.- Real Academia Española. Diccionario de la lengua española. [Internet]. Madrid: RAE; 2023 [citado el 26 de mayo del 2024]. Própoli; p.1. Disponible en: https://es.wikipedia.org/wiki/Prop%C3%B3leo#cite_note-1
- 52.- Gómez-Caravaca AM, Gómez-Romero M, Arráez-Román D, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharm Biomed Anal.* 2006; 41(4):1220–1234.
- 53.- Garg P, Tyagi SP, Sinha DJ, Singh UP, Malik V, Maccune ER. Comparison of antimicrobial efficacy of propolis, *Morinda citrifolia*, *Azadirachta indica*, triphala, green tea polyphenols and 5.25% sodium hypochlorite against *Enterococcus fecalis* biofilm. *Saudi Endod J.* 2014; 4:122-127.
- 54.- Karadal F, Onmaz NE, Abay S, Yildirim Y, Al S, Tatyuz I, Akcay A. A study of Antibacterial and Antioxidant Activities of Bee Products: Propolis, Pollen and Honey Samples. *Ethiop J health Dev.* 2018; 32(2): 116-22.
- 55.- De Castro SL. Propolis: Biological and Pharmacological Activities. Therapeutic Uses of this Bee-product. *Ann Rev Biomed Sci.* 2001; 3(1):49-83.
- 56.- Mitsui T, Hotta S, Tazawa S, Arai Y, Kato K, Ichihara K. Chemical constituents of Brazilian Propolis from the state of Bahia and their growth inhibitory activities against cancer cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2018; 82(3):417-421.
- 57.- Bankova VS, De Castro SL, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apido.* 2000; 31:3-15.
- 58.- Hernandez MS, Abraham MR, Cerón A, Ozuna C, Gutierrez AJ, Segoviano JN, Ávila F. Flavonoids, phenolic content, and antioxidant activity of propolis from various areas of Guanajuato, Mexico. *Food Sci Technol.* 2018; 38(2):210-215.
- 59.- Sforcin JM. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. *Phytother Res.* 2016; 30(6):894-905.
- 60.- Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apido.* 1995; 26(2):83-99.
- 61.- Valcic S, Montenegro G, Timmermann BN. Lignans from Chilean Propolis. *Nat Prod Commun.* 1998; 61(6): 771-775.

- 62.- Tomas FA, García C, Vit P, Ferreres F, Tomas FL. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. *J Sci Food Agric*. 1993; 34:191-196.
- 63.- Porto AL, Machado SM, de Oliveira CM, Bittrich V, Amaral MC, Marsaioli AJ. Polyisoprenylated benzophenones from *Clusia* floral resins. *Phytochemistry*. 2000; 55(7):755-768.
- 64.- Trusheva B, Popova M, Naydenski H, Tsvethkova I, Gregorio Rodríguez J, Bankova V. New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis. *Fitoterapia*. 2004; 75(7-8):683-689.
- 65.- Hernández IM, Fernández MC, Cuesta-Rubio O, Piccinelli AL, Rastrelli L. Polyisoprenylated benzophenone derivatives from Cuban propolis. *J Nat Prod*. 2005; 68(6):931-934.
- 66.- Park YK, Alencar SM, Aguiar CL, Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J Agric Food Chem*. 2002; 50(9):2502-2506.
- 67.- Kumazawa S, Yoneda M, Shibata I, Kanaeda J, Hamasaka T, Nakayama T. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2003; 51(6):740-742.
- 68.- Dobrowolski JW, Vohora SB, Sharma K, Shah SA, Naqvi SA, Dandiya PC. Antibacterial, antifungal, antiamebic, anti-inflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacol*. 1991; 35(1):77-82.
- 69.- Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol*. 1998; 36(4):347-363.
- 70.- Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol*. 1999; 64(3):235-240.
- 71.- Koo MH, Gomes BP, Rosalen PL, Ambrosano GM, Park YK, Cury JA. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Arch Oral Biol*. 2000; 45(2):141-148.
- 72.- Keskin M, Keskin S, Kolayli S. Preparation of alcohol free propolis-alginate microcapsules, characterization and release property. *LWT*. 2019; 108: 89-96.
- 73.- Corbellini L, dos Santos D, Marinho F, Pegas Henriques JA, Ely M, Moura S. Red propolis: Chemical composition and pharmacological activity. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2007; 7(7):591-598.
- 74.- Banskota AH, Tezuka Y, Prasain JK, Matsushige K, Saiki I, Kadota S. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. *Nat Prod Commun*. 1998; 61(7):896-900.
- 75.- López Del Villar JÁ, Ubillús Celi, MM. Estandarización del propóleo de la provincia de Oxapampa, departamento de Pasco (Perú) como materia prima para su utilización a nivel industrial [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad

- Nacional Mayor de San Marcos; 2004. Recuperado a partir de: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/2328/>
- 76.- Bankova VS. Chemical diversity of propolis and the problema of standardization. *J Ethnopharmacol.* 2005; 100(1-2):114-117.
 - 77.- Kalyoncuoglu E, Gönülol N, Özsezer Demiryürek E, Bodrumlu E. Effect of propolis as a root canal irrigant on bond strength to dentin. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2015; 13(4):362-366.
 - 78.- Rasooli I, Shayegh S, Astaneh SDA. The effect of *Mentha spicata* and *Eucalyptus camaldulensis* essential oils on dental biofilm. *Int J Dent Hygiene.* 2009; 7: 196-203.
 - 79.- Alvino JY, Brioso WL. Caracterización de los principales componentes del aceite esencial de muña (*Minthostachys mollis*) y su aplicación para alargar la vida útil del queso fresco, Huánuco 2018 [Tesis de pregrado]. Huánuco: Universidad Nacional Hermilio Valdizán de Huánuco; 2018. Recuperado a partir de: <https://repositorio.unheval.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13080/3294/>
 - 80.- Üstün Y, Arslan S, Aslan T. Effects of calcium hydroxide and propolis intracanal medicaments on bond strength of resin-based endodontic sealer as assessed by push-out test. *Dent Mater J.* 2013; 32(6):913-919.
 - 81.- Ghabraei S, Bolhari B, Yaghoobnejad F, Meraji N. Effect of Intra-Canal Calcium Hydroxide Remnants on the PushOut Bond Strength of Two Endodontic Sealers. *Iran Endod J.* 2017; 12(2):168-172.
 - 82.- Hoelscher AA, Bahcall JK, Maki JS. In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Effects of a Root Canal Sealer-Antibiotic Combination Against *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2006; 32(2):145-147.
 - 83.- Baer J, Maki JS. In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Effect of Three Endodontic Sealers Mixed with Amoxicillin. *J Endod.* 2010; 36(7):1170-1173.
 - 84.- Saxena D, Saha SG, Saha MK, Dubey S, Khatri M. An in vitro evaluation of antimicrobial activity of five herbal extracts and comparison of their activity with 2.5% sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis*. *Indian J Dent Res.* 2015; 26(5):524-527.
 - 85.- World Health Organization. Expert Committee on Antibiotics & World Health Organization. Standardization of Methods for Conducting Microbic Sensitivity Test: second report of the Expert Committee on Antibiotics. World Health Organization. 1961; 1:10-60.
 - 86.- Dornelles NB Junior, Collares FM, Genari B, de Souza Balbinot G, Samuel SMW, Arthur RA, Visioli F, Guterres SS, Leitune VCB. of the addition of microsphere load amoxicillin in the physical, chemical and biological properties of an experimental endodontic sealer. *J Dent.* 2018; 68:28-33.

- 87.- Alaa MA, Yusoh K, Hasany SF. Pure polyurethane and castor oil based polyurethane: synthesis and characterization. *J Mech Eng Sci.* 2015; 8:1507-1511.
- 88.- Marques OC, Canevese S, Iamaguti P, Felisbino SL, Teodoro Pavan P, Carlos Vulcano L. Comparison Between Polyurethanes Containing Castor Oil (Soft Segment) and Cancellous Bone Autograft in the Treatment of Segmental Bone Defect Induced in Rabbits. *Journal of biomaterials applications.* 2007; 21:283-297.
- 89.- Silva GO, Cavalcanti BN, Oliveira TR, Bin CV, Camargo SE, Camargo CH. Cytotoxicity and genotoxicity of natural resins-based experimental endodontic sealers. *Clin Oral Investig.* 2016; 20(4):815-819.
- 90.- Shourgashti Z, Keshvari H, Torabzadeh H, Rostami M, Bonakdar S, Asgary S. Physical Properties, Cytocompatibility and Sealability of HealApex (a novel Premixed Biosealer). *Iran Endod J.* 2018; 13(3):299-304.
- 91.- Singh J. The national centre for the replacement, refinement, and reduction of animals in research. *J Pharmacol.* 2012; 3(1):87-9
- 92.- Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Animal research: Reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines. *BJP.* 2010; 160(7):1577-1579.
- 93.- Herrera HW, De Sermeño RF, Estrada Méndez NL, Morán Saget EM, Pascasio Hernández PC. Análisis histológico de la biocompatibilidad del cemento sellador de conductos radiculares sealapex, en ratones de laboratorio. *Crea cienc.* 2011; 7(11): 27–34.
- 94.- Campos Quintana I, Llamosas Hernández E, Morales de la Luz MR. Evaluación de la biocompatibilidad del cemento Portland implantado en tejido conectivo subepitelial de ratas. *Revista ADM.* 2003; 60(2):45-51
- 95.- Villegas AM, Naranjo E, Gomez DM. Pruebas de biocompatibilidad de los materiales de uso odontológico. *Revisión de la Literatura. Rev. Estomat.* 2008; 16(2): 38-44.
- 96.- Silva LAB, Azevedo LU, Consolaro A, Barnett F, Xu Y, Battaglino RA, Cañadas PS, de Oliveira KM, Silva RAB. Novel endodontic sealers induce cell cytotoxicity and apoptosis in a dose-dependent behavior and favorable response in mice subcutaneous tissue. *Clin Oral Investig.* 2017; 21(9):2851-2861.
- 97.- Torrenegra-Alarcón M, Granados-Conde C, Durán-Lengua M, León-Méndez G, Yáñez-Rueda X, Martínez C, Pájaro-Castro N. Composición Química y Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de *Minthostachys mollis*. *Orinoquia.* 2016; 20(1):69-74.
- 98.- Sivropoupou A, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antimicrobial Activity of Mint Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.* 1995; 43(1):2384-2388.

- 99.- Haripriya S, Ajitha P, Comparative Evaluation of Dentinal Tubule Disinfection using Propolis, Morinda Citrifolia, Aloe vera. *J. Pharm. Sci. & Res.* 2017; 9(11):2042-2044.
- 100.- Ahangari Z, Samiee M, Yolmeh MA, Eslami G. Antimicrobial activity of three root canal irrigants on enterococcus faecalis: an in vitro study. *Iran Endod J.* 2008 ;3(2):33-37.
- 101.- Kangarlou A, Neshandar R, Matini N, Dianat O. Antibacterial efficacy of AH Plus and AH2 sealers mixed with amoxicillin, triple antibiotic paste and nanosilver. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospect.* 2016; 10(4):220-225.
- 102.- Pardi G, Guilarte C, Cardozo E.I., Briceño E.N. Detección de enterococcus faecalis en dientes con fracaso en el tratamiento endodóntico. *Acta odontol. Venez.* 2009; 47(1):110-121.
- 103.- Sartorius Stedim Biotech GmbH. 4Cell® MDCK CD Medium [Internet]. Göttingen: Sartorius; 2021[actualizado 27-05-2021; citado 28-03-2024]. Disponible en: <https://www.sartorius.com/download/808214/4cell-mdck-cd-medium>
- 104.- Arun S, Sampath V, Mahalaxmi S, Rajkumar K. A comparative Evaluation of the Effect of the Addition of Pachymic Acid on the Cytotoxicity of 4 Different Root Canal Sealers – An In Vitro study. *J Endod.* 2016; 43(1):96-99.
- 105.- Troiano G, Perrone D, Dioguardi M, Buonavoglia A, Ardito F, Lo Muzio L. In vitro evaluation of the cytotoxic activity of three epoxy resin-based endodontic sealers. *Dent Mater J.* 2018; 37(3):374-378.
- 106.- Szczerko G, Pawinska M, Luczaj-Cepowicz E, Kierklo A, Marczuk-Kolada G, Holownia A. Effect of root canal sealers on human periodontal ligament fibroblast viability: ex vivo study. *Odontology.* 2018; 106(3):245-256.
- 107.- Cintra LTA, Benetti F, De Azevedo Queiroz IO, Ferreira LL, Massunari L, Bueno CRE, Gomes-Filho JE. Evaluation of the Cytotoxicity and Biocompatibility of New Resin Epoxy-based Endodontic Sealer Containing Calcium Hydroxide. *J Endodontics.* 2017; 43(12):2088-2092.
- 108.- Ashraf H, Shafagh P, Mashhadi Abbas F, Heidari S, Shahoom H, Zandian A, Aghajanpour L, Zadsirjan S. Biocompatibility of an experimental endodontic sealer (Resil) in comparison with AH26 and AH-Plus in rats: An animal study. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.* 2022; 16(2):112-117.

X. ANEXO

ANEXO 1: REQUISITOS INSTITUCIONALES

Código SIDISI: 102508
Título Completo del Proyecto: Influencia en las propiedades físicas, químicas y actividad antimicrobiana de un cemento polimérico con incorporación de propóleo. Página 6 de 14
Nombre del Investigador Principal: Mg. Pickling Gonzales Posada, Erwin Duilio

Declaración de la Unidad de Gestión:

Certifico que mi Unidad de Gestión ha revisado y aprobado este proyecto según nuestros procedimientos internos, y nos comprometemos a apoyar y supervisar su realización 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 el desarrollo del proyecto y asumen la responsabilidad por los actos y consecuencias de la ejecución del proyecto en mi unidad de gestión.

UNIDADES DE GESTIÓN:

Facultad de Ciencias y Filosofía	<input type="checkbox"/>	Centro para la Sostenibilidad Ambiental	<input type="checkbox"/>
Facultad de Educación	<input type="checkbox"/>	Centro de Salud Global	<input type="checkbox"/>
Facultad de Enfermería	<input type="checkbox"/>	Fundación Cayetano Heredia	<input type="checkbox"/>
Facultad de Estomatología	X	Centro de investigación interdisciplinaria en sexualidad, SIDA y sociedad (CISSS)	<input type="checkbox"/>
Facultad de Medicina	<input type="checkbox"/>	Centro de investigación para el desarrollo y sostenible (CIDIS)	<input type="checkbox"/>
Facultad de Psicología	<input type="checkbox"/>	Otro (especificar)	<input type="checkbox"/>
Facultad de Salud Pública	<input type="checkbox"/>		
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia	<input type="checkbox"/>		
Inst. de Gerontología	<input type="checkbox"/>		
Inst. de Investigación de la Altura	<input type="checkbox"/>		
Inst. de Medicina Tropical	<input type="checkbox"/>		

Jefe o Coordinador de Investigación de la Unidad de Gestión	Vicedecano o Director de la Unidad de Gestión
Nombre y apellidos: (Firmado 12/04/2019)	Nombre y apellidos:
 Firma y sello: Dra. Coralith García Apac Jefa, Unidad Integrada de Gestión de Investigación, Ciencia y Tecnología Facultades de Medicina, de Estomatología y de Enfermería	Firma y sello:

Indique si el proyecto de investigación está registrado en la secretaría académica de alguna facultad para generar un grado académico:

¿El proyecto de investigación generará algún grado académico o título profesional? (Ej. tesis, trabajo de investigación)	NO	SI		
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Título	<input type="checkbox"/>
		<input type="checkbox"/>	Maestría	<input type="checkbox"/>
X		Doctorado	<input type="checkbox"/>	

Si su respuesta es NO y en algún momento cambia esta condición deberá informarlo a la DUICT.

F-2 Versión 3.0 de fecha Febrero del 2018



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
 Vicerrectorado de Investigación

Figura 1. – Autorización de la Unidad Integrada de Gestión de Investigación, Ciencia y Tecnología.



CONSTANCIA 071 - 08-19

El Presidente del Comité Institucional de Ética para el uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el proyecto de investigación señalado a continuación fue **APROBADO** por el Comité de Ética.

Título del Proyecto : "Influencia en las propiedades físicas, químicas, biocompatibilidad y actividad antimicrobiana de un cemento endodóntico polimérico con incorporación de propóleo".

Código de inscripción : 102508

Investigador principal : Pickling Gonzales-posada, Erwin Duillio

La aprobación incluyó los documentos finales descritos a continuación:

1. **Protocolo de investigación**, versión recibida en fecha 16 de agosto del 2019.

La **APROBACIÓN** considera el cumplimiento de los estándares de la Universidad, los lineamientos Científicos y éticos, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo investigador y la Confidencialidad de los datos, entre otros.

Cualquier enmienda, desviaciones, eventualidad deberá ser reportada de acuerdo a los plazos y normas establecidas. El investigador reportará cada seis meses el progreso del estudio y alcanzará un informe al término de éste. La aprobación tiene vigencia desde la emisión del presente documento hasta el **27 de agosto del 2020**. Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento

Lima, 28 de agosto del 2019.


Dr. Carlos Espinoza Monte
Presidente
Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales



/s/

Figura 2.- Aprobación del Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales

SOLICITO: Acceso a Laboratorio de Patología para realizar trabajo de investigación.

DOCTOR
HELARD VENTURA PONCE
JEFE
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE
MEDICINA Y CIRUGIA BUCOMAXILOFACIAL
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA
UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA
PRESENTE.-

S. J.D.:

Yo, Erwin Duilio Pickling Gonzales-Posada, alumno de Posgrado del Doctorado en Estomatología de la Facultad de Estomatología, me presente a usted con el debido respeto y expongo:

Que deseando realizar el trabajo de investigación, Titulado: "Influencia en las propiedades físicas, químicas, biocompatibilidad y actividad antimicrobiana de un cemento endodóntico polimérico con incorporación de propóleo" solicito a usted me autorice el acceso al Laboratorio de Patología, para revisar láminas histológicas y poder realizar el mencionado trabajo, que cuenta con la asesoría de la Dra. John Alexis Domínguez, docente del Departamento académico de clínica Estomatológica

POR TANTO:

Ruego a usted acceder a mi petición.

Lima, 12 de marzo de 2020


Erwin Duilio Pickling Gonzales-Posada

DNI. 

Adj.:

- Hoja SIDISI
- Carta de aprobación de Comité de ética
- Hoja Registro de Investigadores



Figura 3.- Solicitud de acceso al Laboratorio de Patología

ANEXO 2: SELECCIÓN DE ELEMENTOS NATURALES

ELEMENTO	MARCA	VOLUMEN DE PRESENTACIÓN	VOLUMEN DE USO POR PRUEBA	REGISTRO	CIUDAD Y PAÍS
Tintura de Propóleo	Fórmula Magistral	30 mL	30 μ L	R.S. F64006N/NA IKGL	Oxapampa Perú
Propóleo Jalks	Jalks	30 mL	30 μ L	R.S. P9307217N/ NADSJL	Oxapampa Perú
Menta	Ekala	5 mL	30 μ L	RUC: 20543066282 COD: E1000428	India
Muña	EOP	10ml	30 μ L	RUC: 20110366605 COD: E1000432	Cajamarca

Figura 4.- Características de los elementos naturales seleccionados

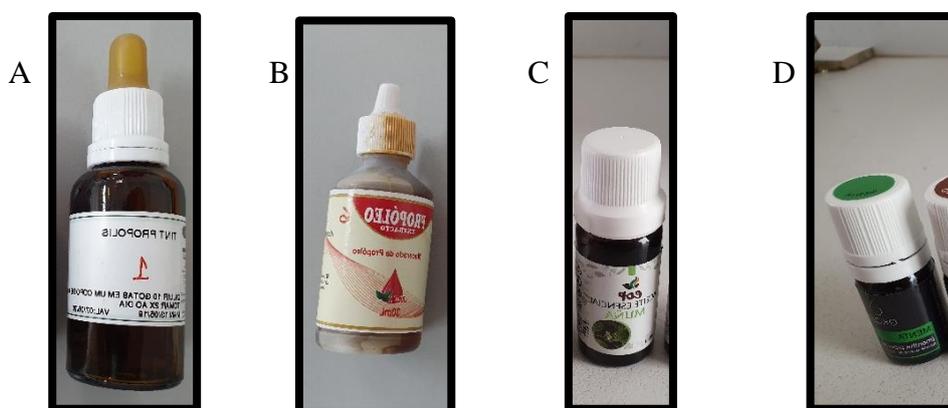


Figura 5. – Elementos naturales A: Tintura de propóleo, B: Propóleo Jalks, C: Muña, D: Menta.



CERTIFICADO DE ANALISIS

Producto:	Aceite Esencial de Menta
Nombre Botánico:	<i>Mentha x piperita</i>
Lote Nº:	8412-SNN-2023-2
Fecha de Destilación:	Abril 2023
Fecha de Vencimiento:	Abril 2025
Color:	Traslucido, incoloro
Aroma:	Mentolado, indica sensación de frescura
País de Origen:	India
Método de Extracción:	Destilación por Arrastre de Vapor de las hojas

PROPIEDADES FISICO QUIMICAS	ESPECIFICACION	RESULTADOS
Gravedad específica @ 20 °C	0.900 – 0.916	0.9018
Índice de refracción @ 20 °C	1.457 – 1.467	1.460
Rotación óptica @ 20 °C	-10° – 30°	-24.70°

ES AROMATERAPIA EIRL – Calle Venecia 147, Dpto. 201, San Borja
Teléfono: 337-2290 Celular: 977 779 444
www.ekala.ape

Figura 6.- Certificado de análisis



GCMS
 Aceite Esencial de Menta
Mentha x piperita

Peak	Compound	RT	Area Sum %
1	cis-2-Hexenol	7.965	0.03
2	α -Thujene	9.371	0.04
3	α -Pinene	9.649	0.9
4	Camphene	10.173	0.03
5	3-Methylcyclohexanone	10.384	0.03
6	Thuja-2,4(10)-diene	10.477	0.12
7	Sabinene	11.923	0.23
8	β -Pinene	11.984	1.25
9	1-Octen-3-ol	12.54	0.07
10	m-Menthane	12.828	0.02
11	1-Octen-3-ol	12.947	0.03
12	β -Myrcene	13.183	0.26
13	3-Octanol	13.536	0.15
14	α -Phellandrene	13.771	0.07
15	δ^3 -carene	14.172	0.03
16	α -Terpinene	14.643	0.15
17	1-p-Menthene	14.931	0.04
18	p-Cymene	15.203	0.30
19	Limonene	15.528	1.96
20	1,8-Cineole	15.644	5.90
21	2-Ethylhexanol	15.849	0.09
22	(Z)- β -Ocimene	16.431	0.07
23	(E)- β -Ocimene	17.135	0.06
24	γ -Terpinene	17.685	0.18
25	cis-Sabinene hydrate	18.256	0.13
26	Octanol	19.049	0.06
27	α -Terpinolene	19.866	0.12
28	trans-Sabinene hydrate	20.627	0.05
29	Linalool	21.114	0.12
30	Amyl isovalerate	21.482	0.03
31	unknown	22.459	0.05

ES AROMATERAPIA EIRL – Calle Venecia 147, Dpto. 201, San Borja
 Teléfono: 337-2290 Celular: 977 779 444
www.ekala.ape

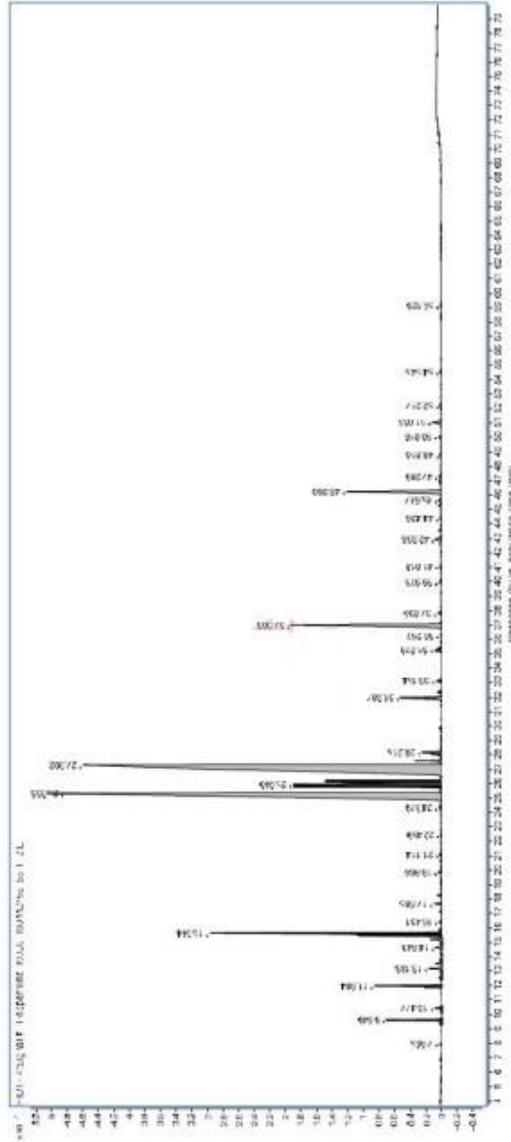
Figura 7.- Composición de la menta



Peak	Compound	RT	Area Sum %
32	Isopulegol	24.379	0.15
33	Menthone	25.333	26.41
34	Isomenthone + Menthofura	25.940	6.06
35	Neo-Menthol	26.109	3.41
36	Menthol	27.202	37.28
37	Isomenthol	27.599	0.75
38	Neoisomenthol	28.113	0.24
39	α -Terpineol	28.215	0.52
40	Pulegone	31.987	1.16
41	Carvone	32.387	0.13
42	Piperitenone	33.154	0.18
43	neo-Menthyl acetate	35.278	0.22
44	Dihydroedulan I	35.838	0.06
45	Dihydroedulan II	36.257	0.04
46	Menthyl acetate	37.003	5.73
47	Isomenthyl acetate	37.83	0.13
48	Bicycloelemenene	39.975	0.07
49	α -Cubebene	41.018	0.05
50	α -Copaene	42.936	0.25
51	β -Bourbonene	43.55	0.1
52	β -Elemene	44.426	0.06
53	unknown	45.303	0.1
54	unknown	45.647	0.1
55	β -Caryophyllene	46.26	3.28
56	unknown	46.859	0.04
57	β -Copaene	47.008	0.08
58	unknown	47.289	0.07
59	α -Humulene	48.816	0.06
60	(E)- β -Farnesene	50.016	0.1
61	Germacrene D	51.035	0.33
62	Bicyclogermacrene	52.217	0.12
63	δ -Cadinene	54.545	0.08
64	Caryophyllene oxide	58.435	0.06
65	Viridiflorol	59.129	0.04
	Total identified		99.64%

ES AROMATERAPIA EIRL – Calle Venecia 147, Dpto. 201, San Borja
 Teléfono: 337-2290 Celular: 977 779 444
 www.ekala.ape

Figura 8.- Composición de la menta



ES AROMATERAPIA EIRL – Calle Venecia 147, Dpto. 201, San Borja
Teléfono: 337-2290 Celular: 977 779 444
www.ekala.ape

Figura 9.- Análisis del aceite esencial



NATURAL SOURCING®

Cosmetic and Personal Care Ingredient Specialists
PROUDLY SERVING YOU FOR OVER 20 YEARS

Andean Mint (Menthastachys Mollis)

Sample:

Client: | **Natural Sourcing**
Sample: | **Andean Mint (Menthastachys Mollis)**
Batch # | **PIU050818**
CAS Number |
Type: | **Essential Oil**

Conclusion:

- No adulterants, diluents, or contaminants were detected via this method.
- This oil meets the expected profile for genuine oil of Andean Mint (Menthastachys Mollis).

ESSENTIAL VALIDATION SERVICES | 747 SW 2nd AVE GAINESVILLE, FLORIDA 32601 | 317-361-5044



X

Validated By: Digitally signed by Adam Christensen
Date: 2018.10.09 10:14:39 -04'00'

Essential Validation Services

747 SW 2nd Ave, Gainesville, FL 32601

Phone: [Redacted] E-mail: [Redacted]

Summary of Analyses

A fresh sample of Andean Mint (Menthastachys Mollis) (10 uL in .5to.5 mL Hexane + ETOH) was prepared and analyzed via split injection GC/EI-MS.

Essential Validation Services

- This report is the digitally signed and will only be considered valid if the signature is intact.
- This report may not be published without the consent of Essential Validation Services.
- Chromatograph image may not show full run time

10/9/2018

Figura 10.- Certificado de análisis de la muña



ESSENTIAL VALIDATION SERVICES | 747 SW 2nd AVE GAINESVILLE, FLORIDA 32601 | 317-361-5044

Main Compounds	Percentages
Pulegone	28.65%
Menthone	25.16%
cis-Dihydrocarvone	5.44%
Carvone	4.32%
Geranyl acetate	3.06%
beta-Caryophyllene	2.83%
Carvacryl acetate	2.74%
Piperitone	2.07%
gamma-Terpinene	1.99%
Limonene	1.95%
Linalool	1.53%
Isopulegone	1.48%
para-Cymene	1.29%

Monoterpenes	Sesquiterpenes	Monoterpenols	Sesquiterpenols	Ketones
7.98%	6.34%	4.60%	0.18%	70.85%

Esters	Ethers	Aldehydes	Phenols	Other
7.57%	0.21%	0.40%	0.04%	1.83%

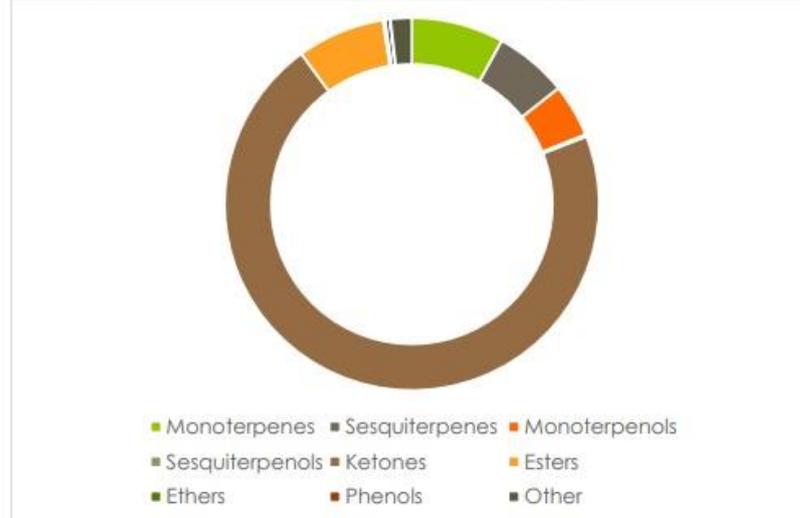


Figura 11.- Análisis de composición del aceite esencial

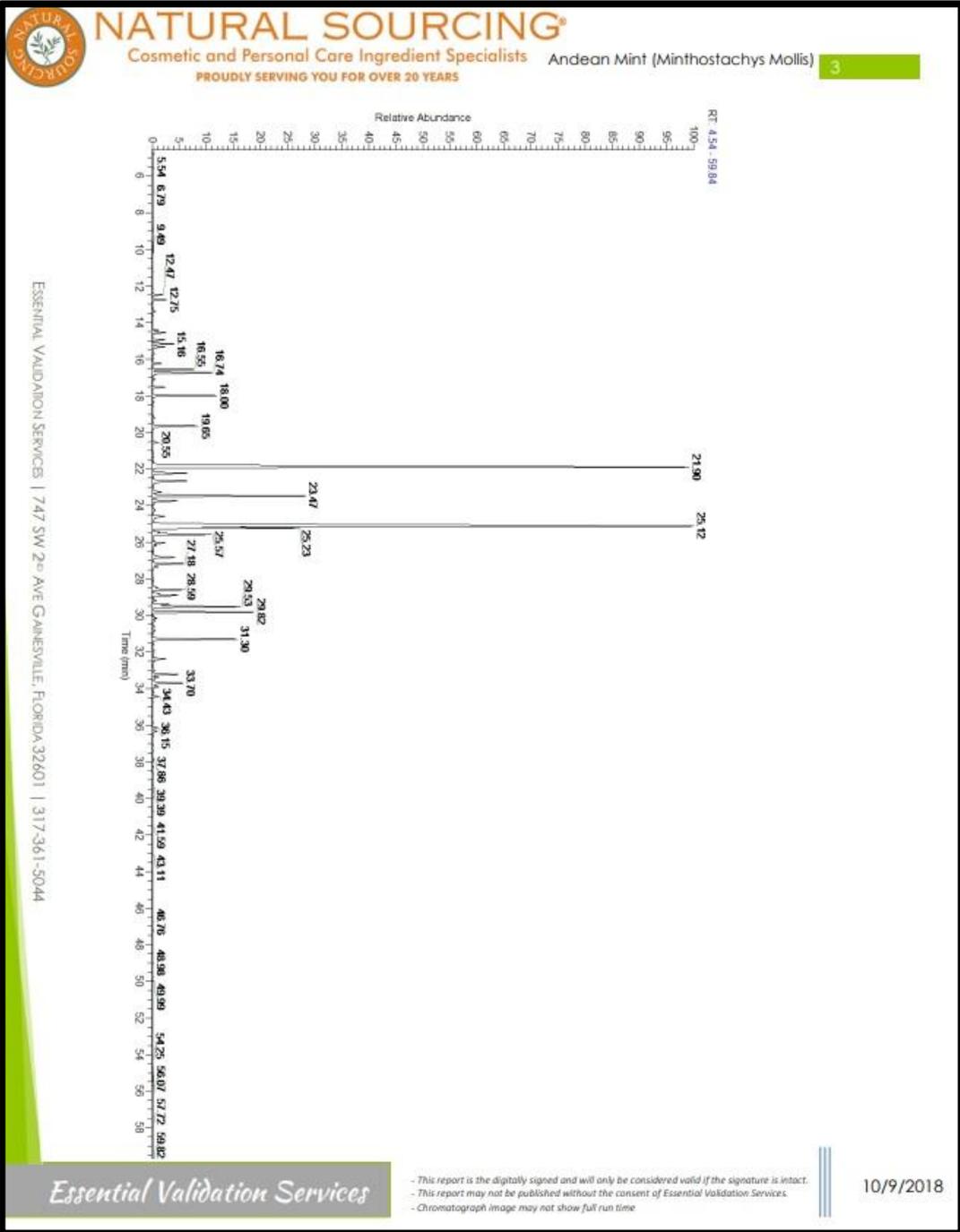


Figura 12.- Análisis del aceite esencial



NATURAL SOURCING®

Cosmetic and Personal Care Ingredient Specialists
PROUDLY SERVING YOU FOR OVER 20 YEARS

Andean Mint (*Minthostachys Mollis*)

4

Total Percentage		98.53%			
Peak Number	RT	Area %	Compound Name	RI	Chemical Family
1	12.47	0.30%	alpha-Thujene	927.80	Monoterpene
2	12.75	0.43%	alpha-Pinene	936.10	Monoterpene
3	14.43	0.19%	Sabinene	973.00	Monoterpene
4	14.56	0.42%	beta-Pinene	974.00	Monoterpene
5	14.94	0.36%	Octan-3-one	981.00	Aliphatic Ketone
6	15.16	0.62%	Myrcene	989.20	Monoterpene
7	15.33	0.36%	3-Octanol	992.00	Aliphatic Alcohol
8	15.71	0.05%	alpha-Phellandrene	1002.00	Monoterpene
9	16.23	0.26%	alpha-Terpinene	1014.00	Monoterpene
10	16.55	1.29%	para-Cymene	1024.30	Monoterpene
11	16.74	1.95%	Limonene	1029.50	Monoterpene
12	16.84	0.06%	1,8-Cineole	1031.80	Monoterpene Ether
13	17.10	0.06%	(Z)-beta-Ocimene	1037.80	Monoterpene
14	17.53	0.37%	(E)-beta-Ocimene	1047.70	Monoterpene
15	18.00	1.99%	gamma-Terpinene	1054.00	Monoterpene
16	18.34	0.02%	trans-Sabinene hydrate	1072.00	Monoterpenol
17	19.21	0.05%	Terpinolene	1092.10	Monoterpene
18	19.65	1.53%	Linalool	1099.00	Monoterpenol
19	20.55	0.18%	3-Octanol acetate		
20	21.90	25.16%	Menthone	1155.00	Monoterpene Ketone
21	22.23	1.18%	Isomenthone	1164.33	Monoterpene Ketone
22	22.66	1.48%	Isopulegone	1178.00	Monoterpene Ketone
23	23.26	0.30%	alpha-Terpineol	1191.71	Monoterpenol
24	23.47	5.44%	cis-Dihydrocarvone	1197.57	Monoterpene Ketone
25	23.74	0.86%	trans-Dihydrocarvone	1203.83	Monoterpene Ketone
26	23.92	0.07%	Verbenone	1213.80	Monoterpene Ketone
27	24.59	0.56%	Citronellol	1229.25	Monoterpenol
28	25.12	28.65%	Pulegone	1244.43	Monoterpene Ketone
29	25.23	4.32%	Carvone	1248.14	Monoterpene Ketone
30	25.46	0.18%	Geraniol	1255.29	Monoterpenol
31	25.57	2.07%	Piperitone	1258.50	Monoterpene Ketone
32	26.04	0.40%	Geranial	1272.00	Monoterpene Aldehyde
33	26.17	0.13%	isopiperitenone	1275.20	Monoterpene Ketone
34	26.67	0.03%	Bornyl acetate	1288.29	Monoterpene Ester
35	26.83	0.90%	Thymol	1288.15	Monoterpenol
36	27.18	1.11%	Carvacrol	1304.40	Monoterpenol
37	27.34	0.21%	cis-Dihydrocarveol acetate		
38	28.47	0.13%	delta-Elemene	1335.83	Sesquiterpene
39	28.59	1.13%	Piperitenone	1347.00	Sesquiterpene Ketone
40	28.81	0.19%	Citronellyl acetate	1357.83	Monoterpene Ester
41	28.90	0.84%	Thymyl acetate	1357.40	Monoterpene Ester
42	29.08	0.04%	Eugenol	1365.89	Phenylpropanoid
43	29.19	0.12%	Neryl acetate	1362.90	Monoterpene Ester

ESSENTIAL VALIDATION SERVICES | 747 SW 2nd AVE GAINESVILLE, FLORIDA 32601 | 317-361-5044

Essential Validation Services

- This report is the digitally signed and will only be considered valid if the signature is intact.
- This report may not be published without the consent of Essential Validation Services.
- Chromatograph image may not show full run time

10/9/2018

Figura 13: Análisis del aceite esencial

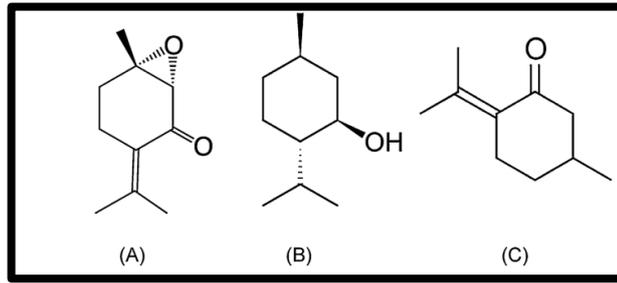


Figura 15.- Representación de las estructuras químicas de la menta. Fuente: De Sousa Barros A.⁶⁷. Donde: A.- Óxido de piperitenona, B.- Mentol, C.- Pulegona

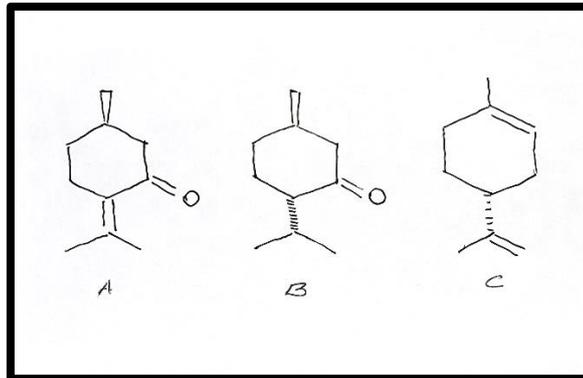


Figura 16.- Representación de las estructuras químicas de la muña. Fuente: Propia. Donde: A.- Pulegona, B.- Mentona, C.- Limoneno

ANEXO 3: ACTIVACIÓN DEL *E. FAECALIS* (ATCC 2982)

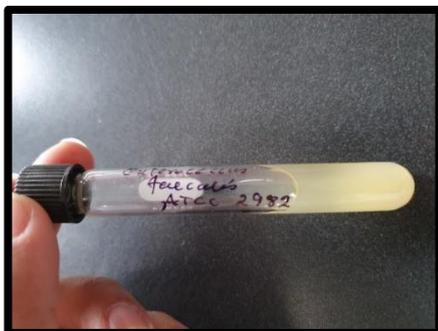


Figura 17.- Tubo de ensayo con BHI a las 24 horas de haber sido inoculado con *E. faecalis* (ATCC 2982), se observa un cambio de color con el BHI inicial.

ANEXO 4: PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS

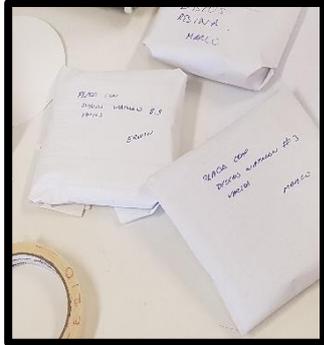


Figura 18.- Discos de Whatman N #3 (6 mm)

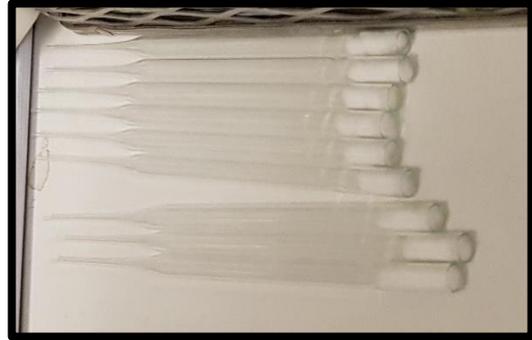


Figura 19.- Pipetas descartables



Figura 20.- Pipetas embaladas y rotuladas



Figura 21.- Tubos de ensayo en gradilla



Figura 22.- Micropipeta y Pipeta 10 ml estéril



Figura 23. - Vernier milimétrico manual



Figura 24.- Materiales Organizados y Rotulados



Figura 25.- Esterilizador de autoclave

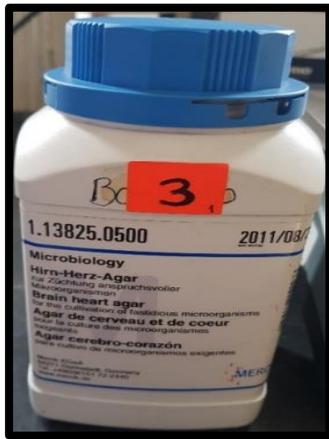


Figura 26.- Brain heart agar / Agar de cerebro y corazón



Figura 27.- Pesaje del BHA



Figura 28.- BHA en el recipiente



Figura 29.- Brain heart infusion / infusión cerebro y corazón



Figura 30.- Pesaje BHI separados



Figura 31.- Ambos productos pesados y



Figura 32.- Agua destilada medida para cada medio



Figura 33.- BHI y BHA mezclado con agua destilada



Figura 34.- Distribución de BHI en tubos de ensayos con tapado de forma pasiva



Figura 35.- Distribución en autoclave



Figura 36.- Se cierra la autoclave y se inicia el ciclo de auto clavado



Figura 37.- Se extraen los tubos de ensayo con BHI, se cierran y se dejan enfriar.



Figura 38.- Se extraen las placas Petri con BHA y se dejan enfriar



Figura 39.- Se empaquetan y se colocan en la incubadora

ANEXO 5: COLORACIÓN DE GRAM (CONTROL DE PRESENCIA BACTERIANA)

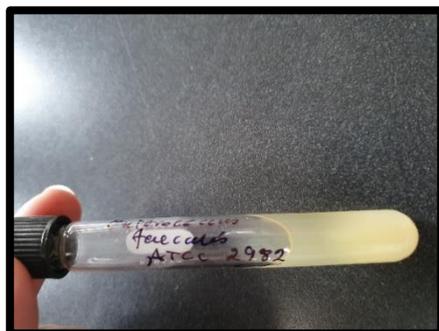


Figura 40.- Tubo de ensayo (BHI) con cambio de color por desarrollo bacteriano



Figura 41.- Insumos para coloración de Gram



Figura 42.- Lámina fijada de *E. faecalis* (ATCC 2982) con metanol



Figura 43.- Lámina con cristal violeta para teñir bacterias Gram +



Figura 44.- Lámina con yodo povidona (Lugol) para fijar el cristal violeta



Figura 45.- Lámina con Safranina que (Tiñe las bacterias Gram -).



Figura 46.- Microscopio estereoscópico



Figura 47.- Lámina ubicada para observación

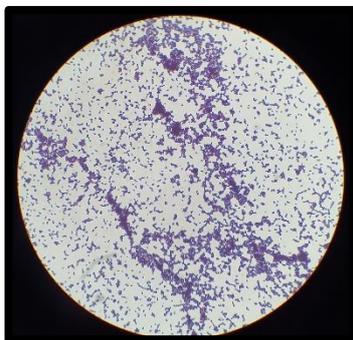


Figura 48.- Imagen a 10X (Colonia de cocos)

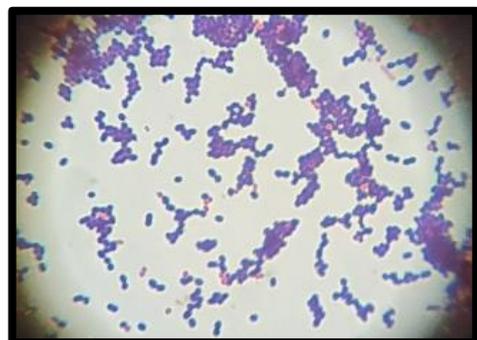


Figura 49.- Imagen a 40X (Colonias de cocos)

ANEXO 6: ESCALA DE TURBIDEZ DE MC FARLAND 0.5

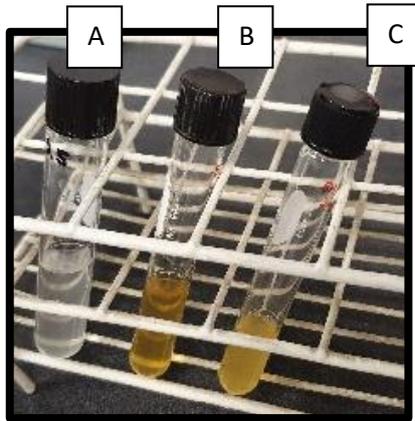


Figura 50.- A.- Tubo de control Mc. Farland
B.- Tubo con BHI / C.- Tubo con *E. faecalis*
(ATCC 2982) incubado



Figura 51.- Comparación de la turbidez
de Mc Farland 0.5 (A) con la alcanzada
en el tubo con BHI (B)

ANEXO 7: PRUEBA DE SENSIBILIDAD BACTERIANA (HALO DE INHIBICIÓN)



Figura 52.- Extracción de placas
con BHA estéril



Figura 53.- Carga de isopo estéril con
E. faecalis del tubo de ensayo con BHI



Figura 54.- Diseminación del *E. faecalis*
cargado con el (ATCC 2982) en placa con BHA

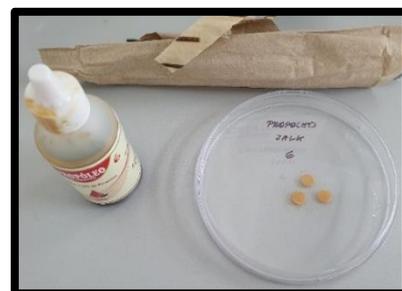


Figura 55.- Discos de Whatmann N° 3
elemento a evaluar

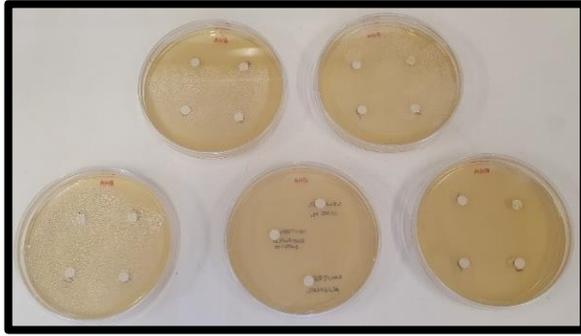


Figura 56.- Placas de BHA con el *E. faecalis* (ATCC 2982) diseminado y con los discos cargados y espaciados



Figura 57.- Cámara de Anaerobiosis



Figura 58.- Encendido de la cámara



Figura 59.- Colocación de la cámara en la incubadora por 24 horas.



Figura 60.- Extracción de placas luego de 24h.



Figura 61.- Medición de los halos de inhibición mediante un vernier manual

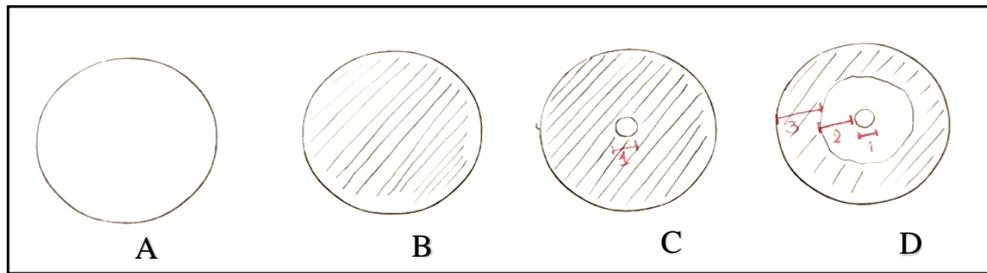


Figura 62 A: Placa Petri con BHA, B: Placa Petri con BHA y *E. faecalis* (ATCC 2982) diseminado, C: Placa Petri con BHA y *E. faecalis* (ATCC 2982) diseminado y la presencia del disco de Whatman (1), D: Placa Petri con BHA y *E. faecalis* (ATCC 2982) diseminado (3) con presencia del disco de Whatman (1) y halo de inhibición (2). Imagen propia.

ANEXO 8: PREPARACIÓN DEL CEMENTO ENDODÓNTICO (CE)



Figura 63. Insumos para la preparación de la pasta A: L-Iditol, B: Castor Oil (aceite de ricino), C: Zinc Oxide (óxido de zinc), D: Calcium carbonate (carbonato de calcio). Imagen propia.

NOMBRE	MARCA	CODIGO
Iditol-L 98%	SIGMA	C.S. 12352201-ZDI60350100
Aceite de Ricino	SIGMA	C.S. 12181600- Z2598530250
Oxido de Zinc 99%	SIGMA	C.S. 12352303-Z0964790500
Carbonato de Calcio 99%	SIGMA	C.S. 12352302-Z0C48300100

Figura 64. Elementos para preparar pasta A

NOMBRE	MARCA	CODIGO
Difenil metano 99%	SIGMA	C.S. 12352005-D2093170025
Disocianato de isoforona 98%	SIGMA	C.S. 12352118-Z3176240005

Imagen 65. Elementos para preparar la pasta B (Activador)



Figura 66. - A.- Diphenylmethane (difenil metano), B: Isophorone diisocyanate (Disocianato de isoforona). Pasta B.



Figura 67.- Pasta A con los compuestos A, B y C mezclados, cerca a esta se aplica el compuesto D

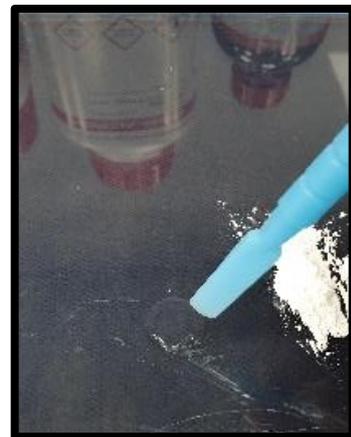


Figura 68- Pasta B lista para ser mezclada



Figura 69.- Pasta A y B mezclada



Figura 70.- Aplicación de diferentes C con elementos naturales en BHA

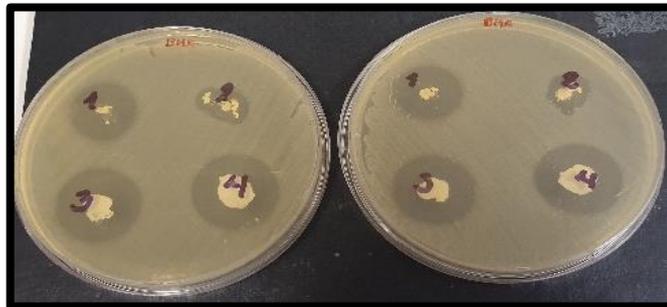


Figura 71.- CE luego de 24 horas de haber sido expuestos al BHA con *E. faecalis*

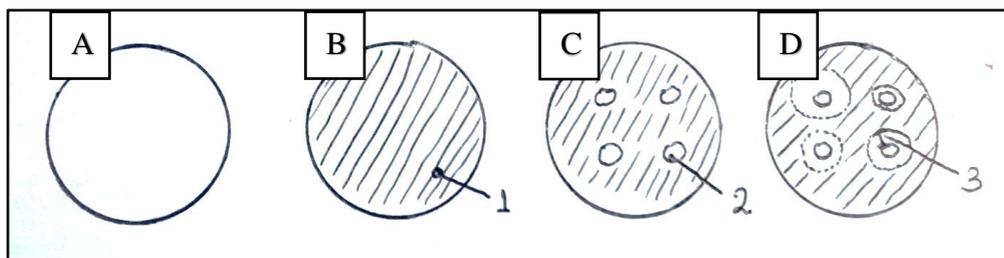


Figura 72.- CE con la incorporación de los elementos naturales seleccionados sobre las cepas de *E. faecalis* (ATCC 2982) A: Placa Petri con BHA, B: Placa Petri con BHA y *E. faecalis* (ATCC 2982) diseminado (1), C: Placa Petri con BHA y *E. faecalis* (ATCC 2982) diseminado y la presencia de 4 CE (2), D: Placa Petri con BHA y *E. faecalis* (ATCC 2982) diseminado (3) con presencia de CE y halo de inhibición (3). Imagen propia.

ANEXO 9: PRUEBA DE VIABILIDAD CELULAR DEL CE EN MTT



Figura 73.- Materiales para CE



Figura 74.- Elementos naturales seleccionados.

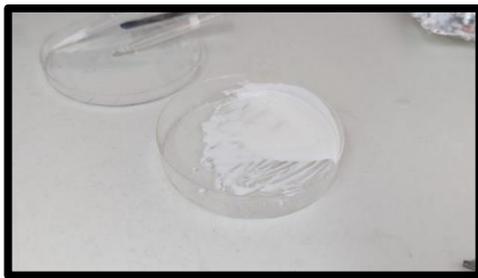


Figura 75.- Pasta A del CE

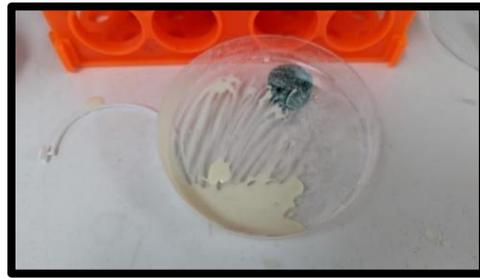


Figura 76.- CE terminado (Pasta A + B)

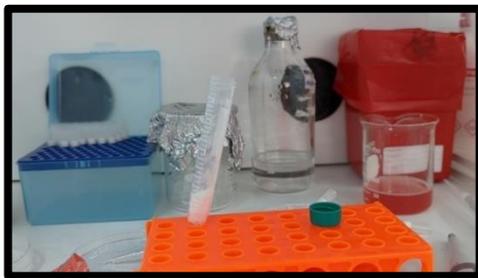


Figura 77.- Distribución del CE al tubo de ensayo

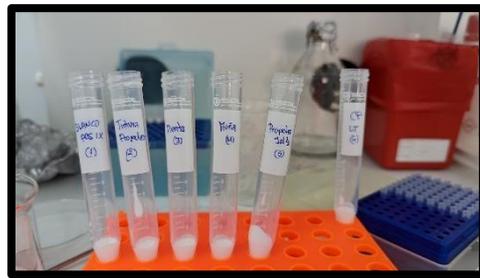


Figura 78.- Distribución final del CE a los tubos de ensayo.



Figura 79.- Distribución de los CE a los mini tubos de ensayo



Figura 80.- Distribución final del CE a los mini tubos de ensayo y el reactivo



Figura 81.- Tubo de ensayo con CE y se agrega 100 μ m de MTT

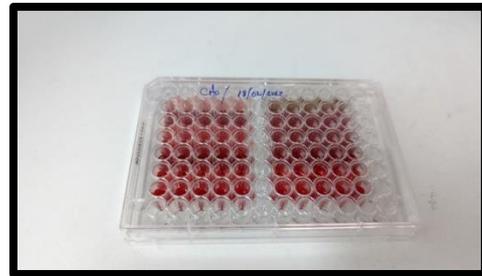


Figura 82.- Dilución en pocillos luego de 4 horas de reducción a 37°C

$$\text{Porcentaje de viabilidad celular} = \frac{A}{B \times 100}$$

Donde: A= Células viables en el experimento
 B= Células viables en el control

Figura 83.- Fórmula para calcular la viabilidad celular

ANEXO 10: BIOCOMPATIBILIDAD CELULAR DEL CE EN MODELO ANIMAL

GRUPO	MATERIAL	RATAS	DIAS DE TRABAJO
I	Cemento endodóntico (CE)	2	7 aclimatación + 21 poscirugía
II	Cemento endodóntico con Tintura de propóleo (CE-TP)	3	7 aclimatación + 21 poscirugía
III	Cemento endodóntico con propóleo Jalks (CE-PJ)	3	7 aclimatación + 21 poscirugía
IV	Cemento endodóntico con menta (CE-ME)	2	7 aclimatación + 21 poscirugía
V	Cemento endodóntico con muña (CE-MU)	2	7 aclimatación + 21 poscirugía

Figura 84.- Grupos experimentales en donde se detallan los componentes, los especímenes y los días que se emplearon en el trabajo

Valor	Descripción	Formas de valorar	Valor
0	Numero de vasos similares al tejido conjuntivo normal	0	Escaso
1	Mínima proliferación capilar focal	< 25 células	Leve
	Fibras colágenas bien formadas dispuestas en haces observadas entre los vasos		
2	Neoformación de vasos con células sanguíneas en su interior	25 a 125 células	Moderado
	Poca cantidad de fibras colágenas dispuestas entre ellas (con estructura de soporte de fibroblastos		
3	Presencia extensa de una banda capilar, con paredes delgadas y células rojas en su interior	> 125 células	Severo

Figura 85.- Análisis de valoración de biocompatibilidad descriptivo cualitativo / cuantitativo. Diseño de Silva *et al.*⁹³



Figura 86.- (A) Alcohol 70%,
(B) Yodopovidona al 10%

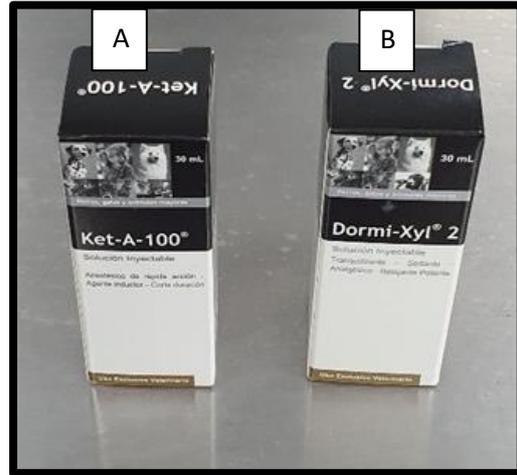


Figura 87.- (A) Ket-A-100 anestésico de acción rápida, (B) Dormi-Xyl 2 como sedante



Figura 88.- Rollo para esterilizar



Figura 89.- Sobre preparados



Figura 90.- Selección de instrumental



Figura 91.- Empaquetado del Instrumental



Figura 92.- Preparación para el sellado



Figura 93.- Sellado



Figura 94.- Conteo de equipos sellados



Figura 95.- Colocación en la esterilizadora



Figura 96.- Espátulas de cemento selladas



Figura 97. - Tips sellados



Figura 98. - Campos sellados



Figura 99. - Frascos

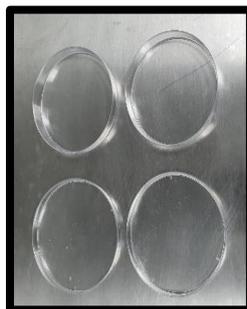


Figura 100. - Placas Petri



Figura 101. - Mandil descartable

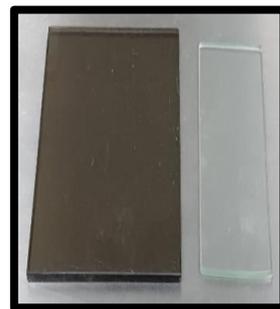


Figura 102. - Lámina de vidrio



Figura 103.- Jeringas 1cc



Figura 104.- Agujas mariposa

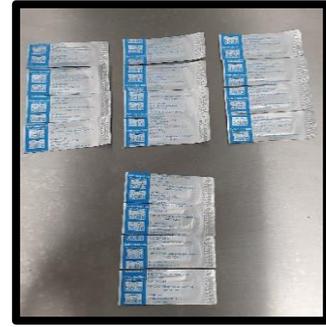


Figura 105. - Hoja de bisturí



Figura 106.- Sutura 3/0



Figura 107. - Guantes quirúrgicos



Figura 108. - Gasa con algodón



Figura 109.- Hojas de afeitar



Figura 110.- Frontal luz

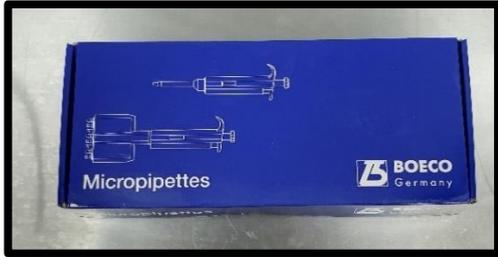


Figura 111- Micropipeta cerrada de 10 μ l – **Figura 102-** Micropipeta abierta de 10 μ l – 100 μ l
Figura



Figura 103- Calentador



Figura 104- Transportador de animales



Figura 105- Preparación de los bebederos para los modelos animales.



Figura 106- Alimento para los modelos animales



Figura 107- Viruta para los modelos animales



Figura 108.- Preparación y pesado de las comidas para los modelos animales.



Figura 109.- Ambiente con la climatización adecuada para los modelos animales



Figura 110.- Ubicación de los modelos animales en su habitación



Figura 111.- Ubicación de los modelos animales en su alojamiento final



Figura 112.- Balanza electrónica



Figura 113.- Medición del tubo de PVC



Figura 114.- Distribución de los tubos de PVC



Figura 115.- Insumos para confección del C.E.



Figura 116.- Elementos naturales



Figura 117.- Elaboración de la Pasta A



Figura 118.- Elaboración de la Pasta B



Figura 119.- Medición del producto confeccionado (5cm X 1cm)



Figura 120.- Se dividen 5 bloques (1cm) para cada grupo para evaluar.



Figura 121.- Se colocó el material dentro del tubo de PVC con ayuda de una cureta pequeña



Figura 122.- Primer tubo de PVC lleno del CE. con adición de propóleo



Figura 123.- Tubos de PVC terminados.



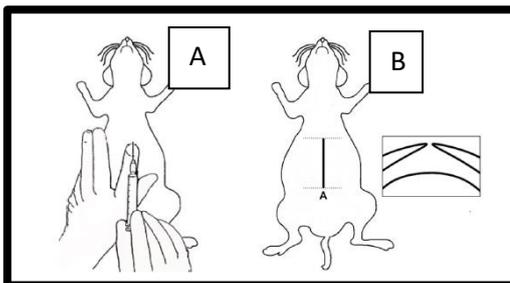
Figura 124.- Tubos de propileno sellados dentro del frasco



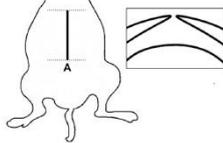
Figura 125.- Preparación de zona operatoria



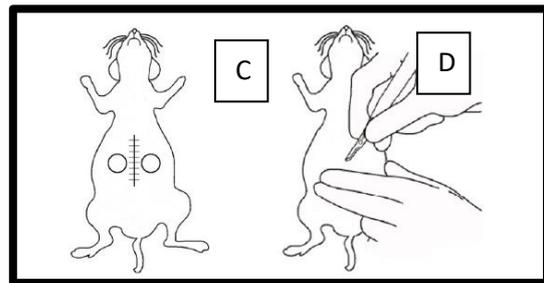
Figura 126.- Zona de incisión realizada



A



B



C

D

Figura 127 A: Procedimiento de la anestesia, B: Incisión y ventanas quirúrgicas, C: Suturas y disposición de los tubos de polietileno, D: Biopsia de los tejidos afectados y de los tubos con el material de experimentación. Imagen de Villegas *et al.*⁹²



Figura 128.- Introducción del tubo de PVC control en el lecho quirúrgico



Figura 129.- Revisión del tubo dentro del lecho



Figura 130.- Sutura de la zona de trabajo



Figura 131.- Control de la zona de trabajo

FECHA		16-MAR	17-MAR	18-MAR	19-MAR	20-MAR	21-MAR	22-MAR	CIRUGIA
NÚMERO DE DÍA		1	2	3	4	5	6	7	
PESO LIQUIDO	1	354	335	338	364	350	355	371	
	2	337	330	343	354	343	346	367	
	3	349	341	367	371	388	371	383	
	4	334	326	333	358	377	375	371	
	5	317	315	316	340	330	340	361	
	6	350	347	353	373	363	353	381	
	7	330	316	320	331	315	307	341	
	8	348	336	356	371	358	369	382	
	9	368	315	363	382	373	396	399	
	10	324	319	333	348	342	362	357	
	11	312	309	311	331	340	325	334	
	12	340	330	327	354	330	336	371	
PESO DE COMIDA		51	61	51	61	71	71	71	

Figura 132.- Pesos Pre-cirugía. Rojo es disminución de peso en relación con la muestra anterior, verde es aumento de peso en relación con la muestra anterior, negro es igualdad de peso en relación con la muestra anterior, en negrita el valor máximo o mínimo absoluto.

FECHA		23- MAR	24- MAR	25- MAR	26- MAR	29- MAR	31- MAR	2- ABR	4- ABR	6- ABR	8- ABR	10- ABR	12- ABR	CIRUGIA	
NUMERO DE DIA		1	2	3	4	7	9	11	13	15	17	19	21		
PESO LIQUIDO	1	357	337	315	319	260	304	300	319	288	299	316	325		
	2	346	333	303	309	254	294	303	325	320	322	324	330		
	3	361	342	314	319	271	302	305	335	312	324	332	342		
	4	346	332	290	292	256	279	290	327	274	251	286	303		
	5	336	316	283	297	248	266	265	300	331	298	329	341		
	6	346	334	308	312	278	301	304	326	291	322	340	346		
	7	309	306	290	290	254	286	282	296	315	296	313	316		
	8	361	339	319	332	277	319	315	336	354	359	360	360		
	9	386	357	320	322	297	310	325	357	370	357	377	373		
	10	346	330	290	304	267	297	310	322	325	306	342	343		
	11	315	305	285	301	264	301	297	309	323	317	324	327		
	12	339	327	296	310	286	295	308	340	347	309	327	340		
PESO DE COMIDA		71	71	71	71	71	71	71	71	71	81	81	81		

Figura 133.- Pesos Pos-cirugía. Rojo es disminución de peso en relación con la muestra anterior, verde es aumento de peso en relación con la muestra anterior, negro es igualdad de peso en relación con la muestra anterior, en negrita el valor máximo o mínimo absoluto.



Figura 134.- Extracción quirúrgica de la zona trabajada



Figura 135.- Corte histológico de la zona control luego de 30 días (10X)

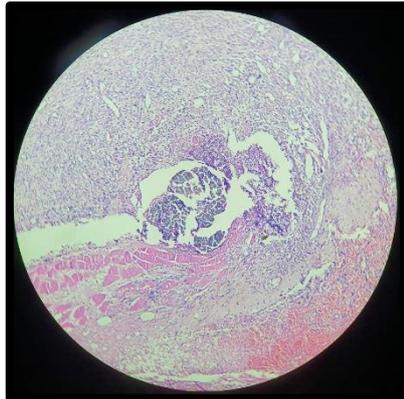


Figura 136.- Corte histológico de la zona a evaluar luego de 30 días (10X)

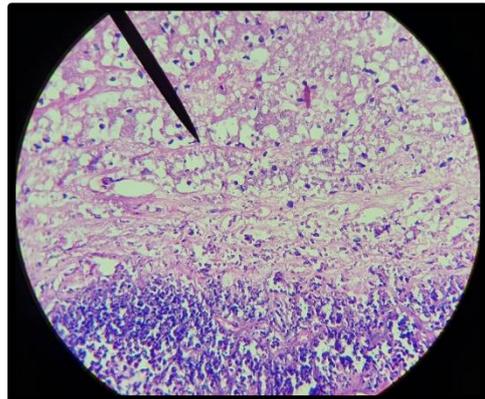


Figura 137.- Corte histológico de la zona a evaluar luego de 30 días a (40X)