



UNIVERSIDAD PRIVADA NORBERT WIENER
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA

“EFECTO INHIBIDOR DEL ACEITE ESENCIAL DE MUÑA
MEZCLADO CON HIDRÓXIDO DE CALCIO COMPARADO CON
CUATRO SOLUCIONES FRENTE A *Enterococcus faecalis*”.

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE CIRUJANO DENTISTA

Presentado por:

AUTOR: HUALLPA TUCTO, ELIZABETH EVELYN.

ASESOR: Dr. CD. FEDERICO MARTIN MALPARTIDA QUISPE.

LIMA – PERÚ

2017

Dedicatoria

En primer lugar, a Dios por protegerme y guiarme en cada paso que doy.

A mis padres Guillermo Huallpa Condorhuanca y Demetria Tucto Ambrosio por su amor, esfuerzo, motivación, consejos y apoyo incondicional durante toda mi vida; en particular durante la etapa universitaria, que a pesar de las condiciones económicas me brindaron la posibilidad de estudiar una carrera profesional.

A mis hermanos John y Angélica por su comprensión y apoyo.

A Joel y a todas mis amistades que me motivaron día a día para continuar con mi proyecto de investigación y no desistir hasta llegar a la titulación.

Agradecimiento

A mi docente, padrino de mi promoción y asesor de tesis Dr. CD. Federico Martin Malpartida Quispe por su dedicación, apoyo y orientación a lo largo del desarrollo de la presente investigación.

A mi alma mater la Universidad Privada Norbert Wiener, por brindarme sus instalaciones para la ejecución de mi proyecto de tesis; y al personal del laboratorio de Microbiología y material didáctico por las facilidades y buen trato.

A mis maestros de la Escuela Académica Profesional de Odontología por los conocimientos brindados en las diversas especialidades de la carrera de Odontología.

A mi amigo y colega Luis Antonio Zavala Vega por su amistad y apoyo en la ejecución del proyecto de tesis.

Asesor de tesis

Dr. CD. Federico Martin Malpartida Quispe

Jurados

- 1. Presidente:**
Adrianzen Acurio, Cesar Augusto.
- 2. Secretario:**
Cupé Araujo, Ana Cecilia.
- 3. Vocal:**
Pareja Cuadros, Elizabeth Irene.

ÍNDICE

	Pág.
1. CAPÍTULO I: EL PROBLEMA.....	12
1.1. Planteamiento del problema.....	12
1.2. Formulación del problema	13
1.3. Justificación	13
1.4. Objetivo	14
1.4.1. General	14
1.4.2. Específicos	14
2. CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	16
2.1. Antecedentes	16
2.2. Base teórica	20
2.3. Terminología básica	37
2.4. Hipótesis	38
2.5. Variables	39
3. CAPÍTULO III: DISEÑO METODOLÓGICO	39
3.1. Tipo y nivel de investigación.....	39
3.2. Población y muestra	39
3.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	40
3.4. Procesamiento de datos y análisis estadístico	45
3.5. Aspectos éticos	45
4. CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
4.1. Resultados	46
4.2. Discusión	62
5. CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	65
5.1. Conclusiones	65
5.2. Recomendaciones	66
REFERENCIAS	67
ANEXOS	73

ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS

Pág.

TABLA N°1: Efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con el aceite esencial muña frente a <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas.	46
GRÁFICO N°1: Efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con el aceite esencial de muña frente a <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas.	47
TABLA N°2: Efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con la pasta 3Mix-MP frente a <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas.	48
GRÁFICO N°2: Efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con la pasta 3Mix-MP frente a <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas.	49
TABLA N°3: Efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con el gluconato de clorhexidina al 2% frente a <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas.	50
GRÁFICO N°3: Efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con el gluconato de clorhexidina al 2% frente a <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas.	51
TABLA N° 4: Efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con la mezcla del gluconato de clorhexidina al 2% con hidróxido de calcio frente a <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas.	52
GRÁFICO N° 4: Efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con la mezcla del gluconato de clorhexidina al 2% con hidróxido de calcio frente a <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas.	53

TABLA N° 5: Efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con el aceite esencial de muña, pasta 3Mix-MP, gluconato de clorhexidina al 2% y mezcla de gluconato de clorhexidina al 2% con hidróxido de calcio frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) al cabo de 24 horas. ...54

GRÁFICO N° 5: Efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con el aceite esencial de muña, pasta 3Mix-MP, gluconato de clorhexidina al 2% y mezcla de gluconato de clorhexidina al 2% con hidróxido de calcio frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) al cabo de 24 horas.57

TABLA N°6: Efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con el aceite esencial de muña, pasta 3Mix-MP, gluconato de clorhexidina al 2% y mezcla de gluconato de clorhexidina al 2% con hidróxido de calcio frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) al cabo de 72 horas.58

GRÁFICO N°6: Efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con el aceite esencial de muña, pasta 3Mix-MP, gluconato de clorhexidina al 2% y mezcla de gluconato de clorhexidina al 2% con hidróxido de calcio frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) al cabo de 72 horas.61

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto inhibitor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con cuatro soluciones frente a *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Se aplicó el método de difusión en Agar por pozos, de 6 mm. de diámetro, para verter las sustancias a examinarse incluido el suero fisiológico (control negativo). Se midió los halos de inhibición a las 24 y 72 horas con registros de: 16,17 mm. y 15,36 mm. para el aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio; 9,18 mm. y 8,68 mm. para el aceite esencial de muña; 19,89 mm. y 17,09 mm. para la pasta 3Mix-MP; 21,40 mm. (en ambos periodos de tiempo) para el gluconato de clorhexidina al 2%; 17,89 mm. y 15,60 mm. para la mezcla del gluconato de clorhexidina al 2% con hidróxido de calcio. Se concluyó que el efecto inhibitor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio es menor al efecto inhibitor de la pasta 3Mix-MP, al efecto inhibitor del gluconato de clorhexidina al 2% y al efecto inhibitor de la mezcla del gluconato de clorhexidina al 2% con hidróxido de calcio, pero mayor al efecto inhibitor del aceite esencial de muña.

Palabras claves:

Enterococcus faecalis, muña, hidróxido de calcio, efecto inhibitor, gluconato de clorhexidina al 2%, pasta 3Mix-MP.

SUMMARY

The objective of this study was to evaluate the inhibitory effect the mix of muña's essential oil with calcium hydroxide compared with four solutions against *Enterococcus faecalis*'s strains (ATCC 29212). It was used the agar well diffusion method, with 6 mm of diameter for pouring the substances to be examined, including the physiological saline (negative control). The inhibition halos were measured at 24 and 72 hours with a result of 16,17 mm and 15,36 mm for muña's essential oil mixed with calcium hydroxide; 9,18 mm and 8,68 mm for muña's essential oil and 19,89 mm and 17,09 mm for 3Mix-MP paste; 21,40 mm (at the same period of time) for 2% chlorhexidine gluconate; 17,89 mm and 15,60 mm for the mix of 2% chlorhexidine gluconate with calcium hydroxide. It was concluded that the inhibitory effect of muña's essential oil mixed with calcium hydroxide is less in 3Mix-MP paste, 2% chlorhexidine gluconate and the mix of 2% chlorhexidine gluconate with calcium hydroxide, but is more effective in essential oil (muña)

Keywords:

Enterococcus faecalis, muña, calcium hydroxide, inhibitory effect, 2% chlorhexidine gluconate, 3Mix-MP paste.

CAPÍTULO I: EL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

Un tratamiento endodóntico exitoso implica desinfectar profundamente los conductos radiculares, que no se logran en su totalidad con el tratamiento convencional. El uso de medicamentos intraconductos se ha convertido en una necesidad, debido a la presencia de microorganismos resistentes, como el *Enterococcus faecalis* ATCC (29212). (1)

Se reportó la presencia del *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) en los casos fallidos de terapia endodóntica, en una proporción de 9:1 con respecto a las infecciones endodónticas primarias; en las patologías endodónticas secundarias en un 33% y en las infecciones persistentes en un 77%. (2,3)

Los conductos radiculares infectados constituyen la principal causa de irritación de los tejidos perirradiculares. El fracaso en el tratamiento endodóntico, es el resultado de la persistencia de microorganismos resistentes en el área apical de tales conductos infectados. (4)

El *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) es un coco Gram positivo anaerobio facultativo, su hábitat es intestinal pero se aisló de diversas áreas de la cavidad oral, incluso de conductos radiculares sellados; es predominante en la microbiota de las piezas dentales con periodontitis apical persistente. (5,6)

Fue considerado como el microorganismo ideal para probar diversos productos que puedan servir como medicamentos intraconductos, irrigantes y sustancias antisépticas. (7)

Estudios demostraron las propiedades terapéuticas de las plantas nativas del Perú; entre las cuales tenemos a la muña, que presenta efecto antimicrobiano y

es utilizada tradicionalmente en el tratamiento de las diversas dolencias digestivas y respiratorias. (6,8)

El hidróxido de Calcio es el antimicrobiano de elección, usado como medicamento intraconducto por su pH alcalino. El hidróxido de calcio es reconocido por su capacidad bactericida, dentinogénica y osteogénica; elimina microorganismos y repara tejidos dañados. (9,10)

La investigación de posible alternativa natural mezclada con un antimicrobiano sintético, podría generar una sinergia al asociarse y producir espectros antibacterianos más amplios con efecto prolongado, y resultaría un antimicrobiano opcional para erradicar microorganismos resistentes, como el *Enterococcus faecalis* ATCC (29212).

1.2. Formulación del problema

¿Cuál es el efecto inhibitor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con cuatro soluciones frente a cepas de *Enterococcus faecalis*?

1.3. Justificación

Es de importancia estomatológica, debido a los mecanismos de resistencia y adaptación bacteriana que presenta el *Enterococcus faecalis* ATCC (29212), que le permite penetrar profundamente la dentina intrarradicular y establecerse en zonas anatómicas complejas de los conductos radiculares infectados, que sirven como reservorio para el *Enterococcus faecalis* ATCC (29212), lo que conlleva al fracaso en la terapia endodóntica y a ser el principal causante de la periodontitis apical persistente.

El estudio se realizó con el objetivo de encontrar un producto alternativo y natural para la desinfección de los conductos radiculares, que en el futuro, luego de otras investigaciones, pueda usarse en la práctica diaria de manera frecuente para el tratamiento de las diversas patologías pulpares y periapicales.

El protocolo de laboratorio en la presente tesis podría ser utilizado por la EAP (Escuela Académico Profesional) de Odontología de la Universidad Privada Norbert Wiener para diversos estudios con plantas medicinales en la búsqueda de una sustancia antimicrobiana alternativa para la medicación intraconducto.

1.4. Objetivo

1.4.1 General

Evaluar el efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con cuatro soluciones frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212).

1.4.2 Específicos

1. Determinar el efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con el aceite esencial de muña frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas.
2. Determinar el efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con la pasta 3Mix-MP frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas.
3. Determinar el efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con el gluconato de clorhexidina

al 2% frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas.

4. Determinar el efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con la mezcla del gluconato de clorhexidina al 2% con hidróxido de calcio frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas.
5. Determinar el efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con el aceite esencial de muña, pasta 3Mix-MP, gluconato de clorhexidina al 2% y mezcla de gluconato de clorhexidina al 2% con hidróxido de calcio frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) al cabo de 24 horas.
6. Determinar el efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con el aceite esencial de muña, pasta 3Mix-MP, gluconato de clorhexidina al 2% y mezcla de gluconato de clorhexidina al 2% con hidróxido de calcio frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) al cabo de 72 horas.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Alaba y Jiménez (2016) compararon *In vitro* el efecto inhibitor del yoduro de potasio (IKI) al 2% y el aceite esencial de muña al 100% y al 50% frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212). Se usó el método de difusión en agar por discos (método Kirby-Bauer) en medio de cultivo agar Mueller Hinton y se controló a las 24, 48 y 72 horas. El aceite esencial de muña al 100% formó halos de inhibición de; 15,02 mm., 14,98 mm. y 13,43 mm. a las 24, 48 y 72 horas respectivamente. Se concluyó que el efecto inhibitor del aceite esencial de muña al 100% fue mayor al efecto inhibitor del yoduro de potasio al 2% y al efecto inhibitor del aceite esencial de muña al 50% frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212). (8)

Aguirre y Huatuco (2016) estudiaron la efectividad antibacteriana de la pasta de hidróxido de calcio con clorhexidina al 2% y la pasta de hidróxido de calcio con yodopovidona al 1% frente al *Enterococcus faecalis* ATCC (29212). Se usó el método de difusión en agar por discos (método Kirby-Bauer) en agar Mueller Hinton y se controló la sensibilidad bacteriana a las 24 horas, 48 horas, 7 días y 14 días. Se concluyó que la pasta de hidróxido de calcio con clorhexidina al 2% tiene mayor efectividad antibacteriana que la pasta de hidróxido de calcio con yodopovidona al 1% frente al *Enterococcus faecalis* ATCC (29212). (11)

Salcedo D. (2015) estudió *In vitro* el efecto antibacteriano de la pasta 3Mix-MP y Calen PMCC® en un biofilm conformado por tres bacterias predominantes en la periodontitis apical crónica: *Porphyromonas gingivalis*, *Enterococcus faecalis* y

Peptostreptococcus anaerobius. Se usó 32 premolares que fueron instrumentadas con sistema Mtwo hasta la lima 40.04, 22 premolares fueron seccionadas en forma mesiodistal y 10 no seccionadas. Se usó el método de difusión en agar por pozos en medio de cultivo Agar Shaedler; el hidróxido de calcio mezclado con suero fisiológico fue el control positivo y la glicerina el control negativo; se incubaron por 7 días por medio de anaerobiosis. Resultó halos de inhibición de 40mm. para la pasta 3Mix-MP y de 7mm. para la pasta Calen PMCC®. Se concluyó que el efecto antibacteriano de la pasta 3Mix-MP es mayor al efecto antibacteriano de la pasta Calen PMCC®. (12)

Huari G. (2014) determinó *In vitro* el efecto antibacteriano del aceite esencial de muña frente a *Streptococcus mutans*. Se usó el método de difusión en agar por discos, con 10 µl de aceite esencial de muña al 100%, 50% y 25%, 10 µl del dimetilsulfóxido (control negativo) y 25 µg de amoxicilina (control positivo) en medio de cultivo Agar Tripticasa de Soya (TSA) por medio de anaerobiosis bajo microaerofilia; se controló la sensibilidad bacteriana a las 24 horas. Resultó halos de inhibición de 10,79 mm. para el aceite esencial de muña al 100%; para el aceite esencial de muña al 50% halos de inhibición de 7,06 mm.; para el aceite esencial de muña al 25% halos de inhibición de 5 mm. y para la amoxicilina halos de inhibición de 49,3 mm. Se concluyó que el efecto antibacteriano del aceite esencial de muña al 100%, fue menor al efecto antibacteriano de la amoxicilina, pero mayor al efecto antibacteriano de sus diluciones (50% y 25%), frente a cepas de *Streptococcus mutans*. (13)

Labán Y. (2014) estudió *In vitro* el efecto inhibidor del aceite esencial de *Menta piperita* al 100% e hidróxido de calcio mezclado con *Menta piperita* al 100% y

paramonoclorofenol alcanforado frente a cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC (29212). Se usó el método de difusión en agar por pozos (método Kirby-Bauer modificado) en medio de cultivo agar Mueller Hinton; se controló la sensibilidad bacteriana a las 24 y 48 horas. Resultó halos de inhibición de 9,88 mm. y 7,48 mm. para el aceite esencial de *Menta piperita* al 100% y para la mezcla de *Menta piperita* al 100% con el hidróxido de calcio halos de inhibición de 9,92 mm. y 10,30 mm. frente a cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) a las 24 y 48 horas respectivamente para ambos casos. Se concluyó que el efecto inhibidor de la *Menta piperita* al 100% mezclado con el hidróxido de calcio, fue menor al efecto inhibidor de la mezcla del paramonoclorofenol alcanforado con el hidróxido de calcio y mayor al efecto inhibidor del aceite esencial de la *Menta piperita* al 100% a las 24 y 48 horas frente a cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC (29212). (14)

Zavala L. (2014) determinó *In vitro* el efecto inhibidor de la clorhexidina gel al 2% e hidróxido de calcio mezclado con solución de clorhexidina al 2%, paramonoclorofenol alcanforado y suero fisiológico frente a cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC (29212). Se usó el método de difusión en agar por pozos en medio de cultivo Agar Cerebro Corazón; controló la sensibilidad bacteriana al primer, séptimo y décimo-quinto día. El resultado para la mezcla del hidróxido de calcio con la clorhexidina en solución al 2% fue de 4,71 mm. , 2,71 mm. y 0 mm. al primer, séptimo y décimo-quinto día respectivamente. Se concluyó que el efecto inhibidor de la mezcla del hidróxido de calcio con la clorhexidina en solución al 2% fue menor al efecto inhibidor de la clorhexidina gel al 2%. (15)

Farinango H. (2013) estudió *In vitro* el efecto inhibitor del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) en comparación al paramonoclorofenol alcanforado y gluconato de clorhexidina al 2% frente a cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC (29212). Se usó el método de difusión en agar por pozos en medio de cultivo agar Mueller Hinton; el tween 80 fue el control negativo; se controló la sensibilidad bacteriana a las 24 y 48 horas. Se concluyó que el efecto inhibitor del gluconato de clorhexidina al 2% fue mayor al efecto inhibitor de las diversas concentraciones del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) (25%, 50% y 75%); pero no existió diferencia significativa entre el efecto inhibitor del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) al 100% y el efecto inhibitor del gluconato de clorhexidina al 2% al cabo de 24 y 48 horas. (16)

Ccallo N. (2013) determinó *In vitro* la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de muña frente a la actividad bacteriana del *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*. Se usó el método de macrodilución en caldo (tubos con caldo de cultivo con distintas diluciones de un antimicrobiano) del aceite esencial de muña en medio de cultivo caldo Mueller Hinton. La concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de muña resultó 0,448g/ml., que inhibió el 50% de los *Streptococcus mutans* y el 23,5% de las *Porphyromonas gingivalis*. Se concluyó que el aceite esencial de muña inhibe al *Streptococcus mutans* y a la *Porphyromonas gingivalis*. (17)

Malpartida F. (2010) estudió *In vitro* el efecto inhibitor del aceite esencial de muña en comparación al paramonoclorofenol alcanforado y al gluconato de clorhexidina al 2% frente a cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC (29212). Se usó el método de difusión en agar por pozos en medio de cultivo agar Mueller Hinton;

se controló la sensibilidad bacteriana a las 24 y 72 horas. Resultó halos de inhibición de 15,02 mm. y 13,80 mm. para el aceite esencial de muña y para el gluconato de clorhexidina al 2% halos de inhibición de 23,64 mm. y 23,41 mm., a las 24 y 72 horas respectivamente. Se concluyó que el efecto inhibidor del aceite esencial de muña fue menor al efecto inhibidor del gluconato de clorhexidina al 2% y al paramonoclorofenol alcanforado. (6)

2.2. Base teórica

La cavidad oral está constituida por una variedad de especies bacterianas, las cuales están compuestas por microorganismos aerobios y anaerobios, predominando este último; si los microorganismos que conforman la flora microbiana normal, son provistos de condiciones favorables para su desarrollo e ingresan a los tejidos estériles; como por ejemplo, el complejo dentino-pulpar y los tejidos periapicales, pueden comportarse como agentes patógenos y desencadenar la infección. (9)

Los microorganismos desempeñan una función importante en la iniciación y evolución de las diversas enfermedades del complejo dentino-pulpar y de los tejidos periapicales. (15)

El objetivo principal de la terapia endodóntica, es la eliminación de los agentes etiológicos (microorganismos) y de sus residuos metabólicos o subproductos. La preparación biomecánica y el uso de sustancias irrigantes antisépticas no es suficiente, debido al fracaso endodóntico que pueda presentarse, por una anatomía interna compleja e incluso por la presencia de mecanismos de resistencia bacteriana. (2,18)

El *Enterococcus faecalis* es el microorganismo comúnmente encontrado en las infecciones intrarradiculares, persistentes y secundarias asociadas a los fracasos endodónticos, y estos fracasos relacionados a su vez con la presencia de conductos abiertos para el drenaje y citas frecuentes. (4)

El éxito del tratamiento de conductos depende principalmente del conocimiento de los microorganismos; desde su hábitat, estructura, fisiología, resistencia, susceptibilidad y formación de biofilms. (19)

2.2.1. Microbiología endodóntica

Comprende el estudio de los microorganismos relacionados con las patologías pulpares y periapicales; la microbiología endodóntica usa las evidencias obtenidas en el laboratorio, para mejorar el manejo clínico de las infecciones pulpo-periapicales. (6)

El endodonto tiene conductos radiculares complejos debido a su forma y distribución (conductos amplios, conductos laterales, conductos accesorios, rectos, curvos, atrésicos, bifurcados y deltas apicales) dificultando el acceso de instrumentos endodónticos a estos microambientes; el tejido necrótico es utilizado como fuente nutritiva para los microorganismos, favoreciendo su crecimiento y persistencia. (15)

Los microorganismos que conforman la flora endodóntica de manera individual, por lo general tienen poca virulencia, pero al agruparse actúan como patógenos, a causa de la asociación de los siguientes factores: (16)

- ❖ Liberación de endotoxinas
- ❖ Sinergismo con otros microorganismos presentes en el conducto radicular
- ❖ Síntesis de enzimas que dañan los tejidos del huésped

❖ Capacidad de anular las defensas del huésped

La infección endodóntica se da por una diversidad de especies bacterianas, predominando las bacterias anaerobias estrictas, pero también se encontraron bacterias anaerobias facultativas y bacterias microaerófilas. (20)

Los microorganismos responsables de la infección endodóntica pueden haber sido implicados en las primeras fases de la invasión pulpar, a través de una lesión cariosa, seguida de una pulpitis hasta la descomposición de la pulpa, pero también pueden haber sido los últimos en colonizar aprovechando las condiciones del medio. (11)

Las bacterias y sus residuos presentes en el tejido necrosado, se trasladan desde el conducto radicular hasta el periápice produciendo inflamación perirradicular; sólo se logrará la reparación de los tejidos perirradiculares eliminando los microorganismos y sus residuos. (21)

2.2.2. Etiología de las infecciones

La infección se instala en un huésped, si un microorganismo logra invadir los tejidos, competir con las células de defensa y multiplicarse en cantidades suficientes. Es importante la puerta de acceso, la dosis de la infección y las características bacterianas para colonizar. Cuando la cantidad de microorganismos necesarios ha ingresado por la vía adecuada al huésped, tiene que adherirse a un sustrato. (15)

Las diferentes presentaciones de la enfermedad perirradicular pueden tener etiologías microbianas diferentes; los tipos de infecciones endodónticas (primarias, secundarias y persistentes) se asocian con diferentes condiciones clínicas. Para que un microorganismo este presente en la patogénesis de la enfermedad perirradicular, debe cumplir lo siguiente: (15)

- ❖ Presentación del microorganismo en cantidades suficientes.
- ❖ Expresión de los factores de virulencia.
- ❖ Localización espacial del microorganismo en el conducto radicular para que sus factores de virulencia accedan a los tejidos del periápice.
- ❖ Ambiente favorable para la supervivencia y expresión de los genes de virulencia de las bacterias.
- ❖ No debe existir inhibición de microorganismos en el ambiente intrarradicular.
- ❖ Presencia de defensa de los tejidos perirradiculares.

2.2.3. Tipos de infecciones endodónticas

Las lesiones perirradiculares varían según la presencia de los microorganismos y según el tipo de infección: (4)

2.2.3.1 Infección primaria del conducto radicular.

Causada por diversos tipos de microorganismos que invaden el tejido pulpar necrótico, predominando las bacterias anaerobias estrictas y bacterias Gram negativas.

2.2.3.2 Infección secundaria del conducto radicular.

Causada por microorganismos resistentes que no estaban presentes en la infección primaria, y que colonizaron el conducto radicular durante y al culminar el tratamiento endodóntico.

2.2.3.3 Infección persistente del conducto radicular.

El fracaso del tratamiento de conductos es caracterizado por la persistencia de la infección y de la lesión apical, que puede ser relacionada con la instrumentación, obturación o resistencia bacteriana, hay predominio de las bacterias Gram positivas asociadas a la infección secundaria o persistente, lo que dificulta la eliminación de la microflora bacteriana.

Infecciones primarias			
Lesión crónica	perirradicular	Absceso perirradicular agudo	Infecciones secundarias persistentes o
<i>Bacteroides</i>		<i>Porphyromonas</i>	<i>Enterococcus</i>
<i>Treponema</i>		<i>Treponema</i>	<i>Actinomyces</i>
<i>Prevotella</i>		<i>Fusobacterium</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Porphyromonas</i>		<i>Bacteroides</i>	<i>Candida</i>
<i>Fusobacterium</i>		<i>Prevotella</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>Peptostreptococcus</i>		<i>Streptococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Streptococcus</i>		<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Eubacterium</i>			
<i>Actinomyces</i>			
<i>Campylobacter</i>			

Cuadro 1: Diversos géneros de patógenos endodónticos frecuentemente relacionados a diferentes presentaciones de lesiones perirradiculares. (6)

2.2.4. Periodontitis apical

Existen factores químicos y físicos que provocan inflamación perirradicular, pero los microorganismos por lo general son los principales agentes de la irritación perirradicular. (4,9)

La periodontitis apical es la reacción inflamatoria de los tejidos periapicales, con presencia de bacterias en el interior del sistema de conductos radiculares de la pieza dental afectada, hay predominio de bacterias anaerobias estrictas. (15)

2.2.5. Periodontitis apical persistente

La periodontitis apical persistente es un subdiagnóstico, con un cuadro asintomático y con tratamiento de conductos previo. Se evidencia con la

radiolucidez periapical a partir de un examen radiográfico; la periodontitis apical persistente es causada por una o dos especies bacterianas, que son capaces de adaptarse a las nuevas condiciones del medio, provocando una situación terapéutica más compleja. (7)

Múltiples microorganismos fueron encontrados en los conductos radiculares infectados, los cuales pueden haber conformado la microbiota de la pulpa necrosada y haber resistido a los procedimientos de desinfección con el uso de sustancias químicas e instrumentación biomecánica, estableciéndose en los conductos no tratados que funcionan como reservorios; por ejemplo, las ramificaciones y los túbulos dentinarios intrarradiculares, donde no se instrumentó. (22)

El *Enterococcus faecalis*, fue encontrado con frecuencia en los conductos radiculares sellados de piezas dentales con patología periapical crónica. (4)

2.2.6. Microbiología en los fracasos endodónticos

La infección intrarradicular persistente y la infección intrarradicular secundaria, son causas principales del fracaso endodóntico, los problemas comunes para tal razón son: (6)

- ❖ Control aséptico insuficiente.
- ❖ Falta de localización de algunos conductos radiculares.
- ❖ Falta de instrumentación en algunas zonas de los conductos radiculares.
- ❖ Falta del diseño ideal para el acceso endodóntico.
- ❖ Escape de cementos de obturación.

El fracaso en la terapia endodóntica es atribuible a los microorganismos remanentes; sólo se producirá si estos microorganismos poseen suficiente

patogenicidad, se encuentran en número suficiente y llegan a los tejidos perirradiculares. (4)

Se reportó la presencia del *Enterococcus faecalis* en los casos fallidos de terapia endodóntica, en una proporción de 9:1 con respecto a las infecciones endodónticas primarias; en las patologías endodónticas secundarias en un 33% y en las infecciones persistentes en un 77%. (3)

2.2.7. *Enterococcus faecalis*

Es un coco Gram positivo anaerobio facultativo, habita en el intestino del ser humano, animales, genitales urinarios, heridas, en el suelo, en las plantas y en la cavidad oral (surco gingival, lengua y conductos radiculares), incluso en la zona periapical por su naturaleza anaerobia. (23, 24, 25)

El *Enterococcus faecalis* tiene varios factores de virulencia, entre ellas; las enzimas líticas, feromonas, citolisinas, sustancias de agregación y ácido tipoteicoico. El *Enterococcus faecalis* ingresa al huésped y expresa sus proteínas para competir con otras células bacterianas, altera la respuesta inmune del huésped y anula la acción del linfocito, influyendo en el fracaso endodóntico. (16)

El *Enterococcus faecalis* invade profundamente la dentina intrarradicular y sobrevive sin alimento por varios meses; el *Enterococcus faecalis* presenta resistencia bacteriana innata. (7,2)

El *Enterococcus faecalis* fue encontrado en piezas dentales tratadas en varias citas, e incluso cuando se ha dejado abierto la pieza dental para su drenaje, logrando invadir y colonizar de manera secundaria el sistema de conductos radiculares, resistiendo al tratamiento convencional de la terapia endodóntica. (15)

El género *Enterococcus* agrupa a un conjunto de especies morfológicamente similares a los *Streptococcus*; los *Enterococcus faecalis* están presentes en un 80 a 90%, y los *Enterococcus faecium* solo de 5 a 10%. (16)

2.2.8. Mecanismos de adaptación bacteriana

Existen diversos mecanismos de adaptación que utilizan las bacterias, por ejemplo; la formación de biopelículas, modificaciones genéticas y fisiológicas. La capacidad para formar biopelículas, es el mecanismo de adaptación más importante de las bacterias, para poder sobrevivir a los cambios ambientales provocados por el tratamiento de conductos. (7)

2.2.9. Medicación intraconducto

La preparación biomecánica y el uso de sustancias irrigantes reducen la cantidad de bacterias, pero se requiere de un medicamento intraconducto con función antimicrobiana, que maximice la desinfección del sistema de conductos radiculares infectados. (15)

Los mecanismos de acción de diversos antimicrobianos, es estudiado de forma constante, con el fin de erradicar los agentes infecciosos en el conducto radicular; las piezas dentales con terapia endodóntica y presencia de lesión periapical persistente, impulsa al endodoncista a buscar el equilibrio de la interacción entre el huésped y el patógeno, dirigido a un estado fisiológico sin signos ni síntomas, con el fin de restablecer la salud. (8)

El uso de sustancias antimicrobianas con acción farmacológica aplicadas en el interior de los conductos radiculares, es uno de los pasos más importantes en la terapia endodóntica antes de la obturación, debido a que tiene como objetivo principal la reducción de los microorganismos residuales, aumentando el porcentaje de éxito en las piezas dentales con infección. (6)

Los antisépticos utilizados de manera local como medicación intraconducto, pierden su efecto inhibitor con el tiempo o se eliminan del conducto a través del ápice, lo que exige buscar un producto antimicrobiano que permanezca por un tiempo prolongado, sin causar daño a los tejidos periapicales y estimulando la reparación tisular. (22)

Los propósitos de la medicación intraconducto, las técnicas utilizadas y las sustancias, difieren entre sí, en función al cuadro clínico de la pieza dental en tratamiento. La medicación intraconducto en una pulpitis, ayuda al control de la inflamación y en una pulpa necrosada, es indispensable para la eliminación de microorganismos, sobretodo en las zonas anatómicas donde no llegó el instrumento y los irrigantes; los medicamentos intraconductos deben tener un amplio espectro de acción. Entre las características beneficiosas que debe presentar un medicamento intraconducto son: (16)

- Disminución de la inflamación perirradicular.
- Reducción de los exudados periapicales.
- Erradicación de las bacterias persistentes.
- Inhibición de los productos tóxicos sintetizados por los microorganismos.

2.2.10. Plantas medicinales

El Perú tiene una riqueza variable de plantas medicinales, utilizadas desde el incanato hasta la actualidad de forma tradicional, por sus efectos terapéuticos en el restablecimiento de la salud. (26)

Diversos estudios han comprobado las creencias populares y tradicionales, sobre las propiedades curativas de las plantas de la serranía peruana, en base a sus principios activos y a las actividades biológicas que desempeñan en el organismo del ser humano. (8)

Existe mayor demanda de los productos naturales, por los beneficios terapéuticos que brindan, porque son accesibles y porque el impacto sobre el medio ambiente es insignificante debido a su origen natural; se encuentran en zonas rurales del país. (27)

El valor curativo de las plantas medicinales está en su principio activo; se desconoce su naturaleza química por su alta complejidad. (13)

2.2.11. Aceites esenciales

2.2.11.1. Definición

Son una mezcla de sustancias volátiles aromáticas denominadas terpénicas y fenilpropánicas, que se encuentran en una serie de tejidos secretores de los órganos vegetales aromáticos como; flores, frutos, hojas, raíces, semillas y en la corteza de los vegetales. Se forman en las partes verdes (con clorofila) del vegetal, se extraen por un proceso de destilación y son generalmente líquidos; se desconoce la función exacta del aceite esencial en la planta. (28, 29)

Los principios activos de los aceites esenciales de las plantas medicinales demuestran bioactividad como; antioxidante, antimicótico y antibacteriano. (30)

2.2.11.2. Composición

Los aceites esenciales son una mezcla compleja y variable de compuestos orgánicos de diferentes clases químicas, incluso es posible encontrar en los aceites esenciales más de 150 componentes. (28)

Entre los componentes de los aceites esenciales se encuentran; hidrocarburos alicíclicos denominados terpenos, sus derivados oxigenados denominados alcanfores, fenoles, aldehídos alifáticos, alcoholes, ésteres, cetonas, éteres y compuestos aromáticos. (13,31)

2.2.11.3. Propiedades físicas:

Entre sus propiedades físicas tenemos: (13)

- Obtención por arrastre de vapor de agua.
- Punto de ebullición mayor a 100 °C.
- Solubles en lípidos y disolventes orgánicos.
- Densidad menor a la del agua.
- Líquidos a temperatura de ambiente.

2.2.11.4. Extracción del aceite esencial

Los aceites esenciales pueden ser obtenidos por diferentes métodos, dependiendo del órgano de la planta; la destilación por arrastre de vapor de agua o hidrodestilación es el método más utilizado, donde no se altera las características organolépticas ni propiedades innatas de las plantas medicinales.

(22)

2.2.12. Destilación por arrastre de vapor de agua

La destilación (diferencia de los puntos de ebullición) con vapor de agua o también denominado hidrodestilación, es el método más usado para extraer el aceite esencial. El objetivo es separar las sustancias volátiles de las que no lo son en una mezcla compleja, se utiliza un equipo de destilación que consta de un sistema de destilación de doble balón, en el cual hay un balón que contiene agua destilada que lo someten a calor directo y el otro contiene las hojas de la planta licuada con un poco de agua destilada, que solo recibirá los vapores de agua. Los aceites esenciales son arrastrados por la corriente de vapor de agua que es generada en la fuente de vapor, posteriormente esta mezcla (vapor de agua y aceite) es condensada (se vuelven nuevamente líquidos, el agua y el aceite esencial) mediante su paso por un refrigerante de vidrio de temperatura menor,

para luego separar el aceite del agua por diferencia de densidades, y son recogidos en un recipiente estéril y cerrado donde se observa un estado difásico. (29,13)

2.2.13. Métodos de evaluación antimicrobiana

Se conocen dos métodos convencionales para observar y determinar la actividad antimicrobiana de bacterias y hongos, los cuales son; el método de difusión en agar (pozo o disco de papel) y el método de dilución (agar o caldo líquido). (32)

2.2.13.1. Método de difusión en agar

Describe el nivel de inhibición en el crecimiento de microorganismos, se hace uso de cualquier de los dos métodos para colocar el aceite esencial. Disco de papel (Omer *et. al.*, 1998) o en pozos fabricados en el agar (Lis-Balchin *et. al.*, 1998). (32)

2.2.13.2. Método de dilución

En medios bacteriológicos líquidos o sólidos se introducen sustancias antimicrobianas a medida, se inoculan los medios con las bacterias de prueba y se incuban. Este método consume tiempo y a la vez está limitado a situaciones especiales, por lo que surge la microdilución, que muestra el resultado cuantitativo, indicando la cantidad de sustancia antimicrobiana que se necesita para inhibir a los microorganismos a prueba. (13)

2.2.14. *Mintostachys mollis* (muña)

Mintostachys mollis es el nombre científico de la muña, planta arbustiva leñosa, oriunda de países como; Perú, Bolivia, Argentina, Colombia, Venezuela y Ecuador. La *Mintostachys mollis* en el Perú está constituida por 300 especies distribuidas en 200 géneros de plantas herbáceas. (30)

La muña crece a 2500 y 3500 m.s.n.m. en la primavera; es utilizada de forma tradicional en los males digestivos y respiratorios, además de ser un antimicrobiano; la *Mintostachys mollis* (muña) está compuesta por aceite esencial, glicósidos, mucílagos, saponinas, taninos, alcaloides, esteroides, carbohidratos, calcio, fósforo, hierro, vitamina B1, esencias y mentol. (8,26)

Estudios están valorando la utilización de los aceites esenciales de las plantas medicinales como alternativa antimicrobiana, debido a sus principios activos, siendo la *Minthostachys mollis* (muña) una de las más estudiadas. (28)

El mecanismo de acción del aceite esencial de la *Minthostachys mollis* (muña) no se conoce en toda su extensión, pero observaciones en el microscopio electrónico indican que provoca rotura de la membrana celular de los microorganismos sensibles a su acción. (6)

2.2.15. Gluconato de clorhexidina

Es un antiséptico catiónico bisguanídico, con actividad antimicrobiana frente a las afecciones orales; se comporta como agente bacteriostático y bactericida; su mecanismo de acción está dado por la absorción del medicamento, a través de la pared celular de la bacteria, provocando ruptura en los enlaces peptídicos de la membrana citoplasmática del microorganismo, conllevando a la pérdida del equilibrio osmótico y bloqueo del transporte de calcio y magnesio, por consiguiente la membrana plasmática se extruye, formándose vesículas y desencadenando precipitación y coagulación del citoplasma (en altas concentraciones del gluconato de clorhexidina) hasta lograr la muerte de la bacteria. (21,10,33)

Estudios han reportado que el gluconato de clorhexidina a las 48 ó 72 horas, a una concentración del 2%, presenta mayor actividad inhibitoria; el gluconato de

clorhexidina es conocido por su amplio espectro, actuando frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas, virus, esporas y levaduras lipofílicas. (22)

El gluconato de clorhexidina es utilizado en la terapia endodóntica como una sustancia irrigante y como un medicamento intraconducto por su biocompatibilidad, sustentividad y amplia actividad antimicrobiana. Se presenta comercialmente en altas concentraciones (bactericida) y en bajas concentraciones (bacteriostático), por ejemplo; en enjuagues bucales, hilos dentales, aerosoles, gomas de mascar, cremas dentales, geles de aplicación en cubetas y spray. (2,27)

2.2.16. Solución de clorhexidina al 2% asociada al hidróxido de calcio.

La clorhexidina fue reconocida por muchas investigaciones como un antiséptico de elección por su poder bacteriostático, bactericida, propiedad de sustentividad y baja toxicidad. Existen pocos estudios sobre la mezcla de la clorhexidina con el hidróxido de calcio; se sabe que la mezcla del gluconato de clorhexidina con el hidróxido de calcio actúa frente a bacterias anaerobias, controla el proceso inflamatorio y promueve la reparación tisular, debido al pH (potencial de hidrógeno) y al efecto bactericida. (25)

El hidróxido de calcio es utilizado desde hace varios años por su propiedad antimicrobiana, promueve un ambiente alcalino con pH aproximado de 12,59; la clorhexidina funciona como un medicamento local por su compatibilidad con los tejidos y por su amplia actividad antimicrobiana contra bacterias Gram (+) y Gram (-). (2)

2.2.17. Hidróxido de calcio

Es utilizado como medicamento intraconducto en la terapia endodóntica, en solución acuosa se desdobra en iones de calcio e hidroxilo. Su propiedad antibacteriana se manifiesta a partir de la liberación de iones hidroxilo, generando condiciones desfavorables para las bacterias anaerobias estrictas y para la mayoría de microorganismos presentes en los conductos radiculares infectados. (2,15)

Su mecanismo de acción está dado por la liberación de iones de calcio e hidroxilo, que ingresan a la membrana citoplasmática de la bacteria produciendo hidrólisis de las moléculas e inhibiendo actividades enzimáticas de las bacterias. Tiene la capacidad de disolver tejido pulpar y activar a la fosfatasa alcalina para dar lugar al proceso de mineralización. (10,21)

2.2.18. Pasta 3Mix-MP

En los últimos años, la Facultad de Odontología de la Universidad de Nigata en Japón, introdujo el concepto de "Esterilización de Lesiones y Reparación Tisular", conocida también como terapia LSTR para el tratamiento de piezas dentales con infección, compuesta por la mezcla de antibióticos con vehículos que permiten que se discurra a través de los conductos radiculares, hasta llegar al área periapical y ejercer su acción bactericida. (34)

Estudios preliminares demostraron la eficacia de la pasta 3Mix-MP en tratamientos endodónticos de piezas dentales permanentes, como por ejemplo; la medicación intraconducto en casos de retratamiento, infecciones recurrentes por *Enterococcus faecalis*, e incluso en lesiones periapicales crónicas por perforaciones radiculares. (20)

La minociclina, es una tetraciclina que tiene la capacidad de eliminar microorganismos presentes en los tejidos dentales infectados de piezas deciduas; esta tetraciclina fue relacionada con la decoloración y las posibilidades de afectar al diente permanente en desarrollo si se usa en dientes deciduos. (1,35)

2.2.18.1. Composición

La pasta 3Mix-MP está constituida por polvos (antibióticos) y líquidos (vehículos); El polvo está conformado por la mezcla homogénea del metronidazol, ciprofloxacino y minociclina en una proporción de 1:1:1, y el solvente o líquido por Macrogol y Propelinglicol en una proporción de 1:1. (34)

2.2.18.1.1. Solutos (antibióticos)

- **Metronidazol.-** Presenta actividad antimicrobiana frente a parásitos, protozoarios y bacterias anaerobias; inhibe la síntesis de los ácidos nucleicos en microorganismos anaerobios obligados. El tiempo de vida media del Metronidazol es de 8 horas. (35)
- **Ciprofloxacino.-** Antibiótico que tiene efecto bactericida por inhibición selectiva de la producción de ADN en la bacteria; fue utilizado en infecciones periapicales refractarias a los tratamientos endodónticos. El tiempo de vida media del ciprofloxacino es de 3 a 5 horas. (35)
- **Minociclina.-** Antibiótico bacteriostático de amplio espectro, perteneciente a la familia de las tetraciclinas. La terapia prolongada (más de 4 semanas) facilita el desarrollo de cepas bacterianas resistentes (Gram positivas) a este antibiótico; actúa inhibiendo la síntesis de proteínas de las bacterias; el tiempo de vida media de la minociclina es de 15 a 20 horas

aproximadamente, el uso prolongado de la minociclina ocasiona efectos adversos, como por ejemplo; la discromía (coloración amarilla y marrón) en los dientes. (20)

2.2.18.1.2. Solventes (vehículos)

- **Macrogol.-** Es un producto de policondensación de óxido de etileno y agua, utilizado como vehículo en farmacología dermatológica; el macrogol es muy soluble en el agua, en soluciones ácidas y alcalinas. (34)
- **Propelinglicol.-** Líquido incoloro y viscoso, utilizado como solvente en fármacos, cosméticos y ungüentos. El propelinglicol penetra la dentina de forma efectiva y rápida en comparación al agua destilada. (35)

2.2.18.2. Preparación de la pasta 3mix-mp

La pasta 3Mix-MP debe ser preparada el mismo día del tratamiento, en proporciones correctas; se retira la cubierta azucarada de los antibióticos, en caso que la contengan, antes de triturar los tres antibióticos en los tres recipientes estériles. La preparación de la pasta 3Mix-MP se realiza de la siguiente manera: (35)

- a) Se tritura el metronidazol en un recipiente estéril y se coloca una cucharadita en la platina.
- b) Se pulveriza el ciprofloxacino en otro recipiente estéril y se coloca en la platina, la misma cantidad que se colocó del metronidazol.
- c) El mismo procedimiento se realiza con la minociclina, recordando que las proporciones son de 1:1:1 exactamente.
- d) Se mezcla de forma homogénea los tres componentes sólidos (3Mix).

- e) En otra parte de la platina, se deja una cucharadita de Macrogol (M) y una gota de Propelinglicol (P) en proporciones de 1:1, se mezcla bien hasta obtener un solo compuesto homogéneo.
- f) Para la preparación propiamente dicha de la pasta 3Mix-MP, se mezcla una parte del vehículo MP (Macrogol-Propelinglicol) con 7 partes de la 3Mix (metronidazol, ciprofloxacino y minociclina).

2.3. Terminología básica.

- ✓ **Efecto inhibitor.-** Es un aturdimiento del crecimiento o muerte de las bacterias, a causa de la acción de una sustancia antimicrobiana natural o sintética, dependiendo del mecanismo de acción del agente antimicrobiano. (6)
- ✓ **Principio Activo.-** Sustancia química causante de la actividad farmacológica y del uso de una droga para el tratamiento de una enfermedad. (15)
- ✓ **Antiséptico.-** Agente físico o químico que actúa en oposición al desarrollo de microorganismos. (14)
- ✓ **Bacteriostático.-** Sustancia que impide el desarrollo y reproducción de una bacteria. (35)
- ✓ **Aceites esenciales.-** Son mezclas de sustancias volátiles con propiedades aromáticas, extraídos de plantas, que en su mayoría son por destilación, por lo general son líquidos y rara vez sólidos. Los

aceites esenciales son el producto final del metabolismo secundario de las células vegetales. (36)

Son químicamente una mezcla compleja y variable de hidrocarburos alicíclicos, denominados terpenos y sus derivados oxigenados llamados alcanfores. (13)

- ✓ **Medio de cultivo.-** Sustancia nutritiva que permite el desarrollo de los microorganismos. (37)
- ✓ **Cepa bacteriana.-** Organismos descendientes de un cultivo puro, con fenotipo y genotipo definido. (15)
- ✓ **ATCC.-** Colección americana de cultivos tipo. (22)

2.4. Hipótesis.

El efecto inhibitor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio es mayor comparado con cuatro soluciones frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212).

2.5. Cuadro de operacionalización de variables.

Variable	Tipo de variable	Indicador	Escala de medición	Valor
Medicación intraconducto	Variable Cualitativa Categórica Independiente	Características organolépticas de las sustancias	Nominal	<ul style="list-style-type: none"> ✚ Aceite esencial de muña + hidróxido de calcio. ✚ Aceite esencial de muña. ✚ Pasta 3Mix-MP. ✚ Gluconato de clorhexidina al 2%. ✚ Gluconato de clorhexidina al 2% + hidróxido de calcio.
Efecto inhibidor	Variable Cuantitativa Numérica Dependiente	Medida de los halos de inhibición	Razón	<ul style="list-style-type: none"> ✚ De 6 mm. a 21,40 mm.
Tiempo de exposición	Variable Cualitativa Categórica (Control)	Tiempo de acción antimicrobiana	Ordinal	<ul style="list-style-type: none"> ✚ 24 horas. ✚ 72 horas.

CAPÍTULO III: DISEÑO METODOLÓGICO.

3.1. Tipo y nivel de investigación.

- Tipo de estudio: Experimental, analítico, prospectivo y longitudinal.
- Nivel de investigación: Explicativo.

3.2. Población y muestra.

- Población: Bacterias propias de la periodontitis apical persistente.
- Muestra: 40 placas Petri con cepas de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212).

3.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.

3.3.1. Materiales, equipos y otros.

A. Materiales y equipos para la preparación del medio de cultivo Agar Mueller

Hinton y Caldo Caso o Caldo Tripticasa Soya:

- ✚ Balanza analítica
- ✚ 5 Litros de agua destilada
- ✚ Probeta
- ✚ 6 Frascos de agar
- ✚ Cuchara para agar
- ✚ Pipetas
- ✚ Propipeta
- ✚ 2 Tubos de ensayo con tapa rosca
- ✚ Gradilla
- ✚ 42 placas petri descartables (15 cm.)
- ✚ Caldo Caso
- ✚ Agar Mueller Hinton
- ✚ Incubadora
- ✚ Estufa
- ✚ Refrigeradora
- ✚ Suspensión de sulfato de bario(0,5 en la escala de Mac Farland)

B. Materiales y equipos para la prueba de sensibilidad antibacteriana:

- ✚ Micropipeta
- ✚ 2 paquetes de puntas descartables de micropipeta: Azules y amarillas
- ✚ Sacabocado N° 4
- ✚ Mechero bunsen

- ✚ Mango de asa de siembra
- ✚ Asa de siembra
- ✚ 40 Placas petri con agar Mueller Hinton
- ✚ Cepa de *Enterococcus faecalis*(ATCC 29212)
- ✚ 2 frascos de Aceite esencial de muña
- ✚ 2 pomos de Hidróxido de calcio
- ✚ 2 botellas de gluconato de clorhexidina al 2%
- ✚ 10 tabletas de metronidazol
- ✚ 10 tabletas de ciprofloxacino
- ✚ 10 tabletas de minociclina
- ✚ Macrogol
- ✚ Propelinglicol
- ✚ Platina de vidrio o papel
- ✚ Espátula de plástico
- ✚ Mortero y pilón estériles
- ✚ Cucharita dosificadora
- ✚ Hoja y mango de bisturí
- ✚ Jeringas descartables estériles
- ✚ Suero fisiológico
- ✚ Ficha de recolección de datos

C. Otros:

- ✚ Papel toalla
- ✚ Gasa
- ✚ Algodón
- ✚ Alcohol

- ✚ Fosforo
- ✚ Lapicero y lápiz
- ✚ Plumón de tinta indeleble
- ✚ Hojas bond A4
- ✚ Cámara digital
- ✚ Laptop
- ✚ Impresora
- ✚ Regla
- ✚ Ficha de recolección de datos.

3.3.2. Técnicas:

a. Solicitud y carta respuesta para la ejecución del proyecto de tesis.

Se presentó una Solicitud de autorización para el uso del Laboratorio de Microbiología, dirigida al Director de la Escuela Académica Profesional de Odontología de la Universidad privada Norbert Wiener, con el objetivo de realizar un estudio *In vitro* del efecto inhibitor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con cuatro soluciones frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212). **(Ver anexo N°1)**

Se obtuvo la carta de respuesta del Director de la Escuela Académica Profesional de Odontología de la Universidad privada Norbert Wiener para el uso del Laboratorio de Microbiología y levantamiento de la información obtenida en la ejecución del proyecto de tesis. **(Ver anexo N°2)**

b. Obtención del *Enterococcus faecalis* ATCC (29212).



Enterococcus faecalis ATCC (29212).

KWIK-STIK.

Seguido al permiso para el uso del laboratorio de Microbiología, se consiguió la cepa bacteriana *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) de la marca Microbiologics (**Ver anexos N°3 y N°4**), a través de la distribuidora SUPROM PERÚ S.A.C. Microbiologics es un proveedor líder de microorganismos de control de calidad listos para ser usados en pruebas de control de calidad en las industrias clínicas, farmacéuticas, de alimentos, etc.

Microbiologics tiene su sede en St. Cloud, Minnessota EE.UU. En la actualidad proporcionan microorganismos a todas los rincones del mundo a través de una extensa red de distribución. El *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) llegó al país a través de SUPROM PERÚ S.A.C., empresa distribuidora de reconocidas marcas como por ejemplo Microbiologics (cepas ATCC), Becton Dickinson (BD), Standard Diagnostics (pruebas rápidas).

Se obtuvo el *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) en forma de dispositivo KWIK-STIK, el cual presentó una sola cepa de microorganismo liofilizado, un depósito de fluido hidratante e hisopo de inoculación.

El *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) tuvo los siguientes cuidados:

- Se inició un KWIK-STIK en un agar no selectivo, como el agar tripticasa de soya, mueller hinton o agar sangre de oveja.
- No se realizó prueba microbiológica en la placa de granulación original.
- Se seleccionó colonias aisladas para la prueba microbiológica.
- En la prueba microbiológica se utilizó microorganismo fresco.
- No se realizó prueba microbiológica en colonias de una placa contaminada.

c. Obtención del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña)

- El aceite esencial de muña se obtuvo de la empresa Essential Oils Perú; se expide un certificado de pureza. **(Ver anexo N°5)**
- El transporte y conservación del aceite esencial de muña, se realizó conforme al protocolo brindado por la empresa Essential Oils Perú. **(Ver anexo N°6)**

d. Preparación del medio de cultivo

- El medio de cultivo Agar Mueller Hinton de la marca Oxoid fue preparado según las instrucciones del fabricante, se distribuyó el medio en 40 placas Petri (15 cm.) a un espesor de 4 mm. por placa. Luego se dejaron solidificar a temperatura ambiental por 15 minutos aproximadamente, se rotularon las placas en la parte posterior de las placas Petri, con la ayuda de una matriz de papel y un plumón indeleble el nombre de la sustancia a evaluar (aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio, aceite esencial de muña,

pasta 3Mix-MP, gluconato de clorhexidina al 2% y mezcla de gluconato de clorhexidina al 2% con hidróxido de calcio y suero fisiológico). Se realizó el control de esterilidad del medio incubando el material a 37°C por 24 horas.

(Ver anexo N°7)

e. Reactivación de la cepa bacteriana

La cepa bacteriana *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) fue reactivada y sembrada en dos placas petri que contenían agar Mueller Hinton y se colocó en la incubadora por un lapso de 24 horas a 37°C.

PRUEBA DE SENSIBILIDAD MICROBIANA

a. Método de difusión en agar por pozos

Posteriormente para evaluar los efectos inhibidores de las diversas sustancias, frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212), se usó el método de difusión en agar por pozos (Método Kirby-Bauer modificado), el cual se fundamenta en realizar socavados en el agar, de 6 mm. de diámetro. Se realizaron en total 6 pozos en la periferia de cada una de las 40 Placas Petri (15 cm.)

b. Preparación del inóculo

Luego para estandarizar la densidad del inóculo se usó una suspensión de sulfato de bario (0,5 en la escala de Mac Farland) como estándar de turbidez. Se tomaron 5 colonias aisladas del agar Mueller Hinton (cultivado 24 horas antes) y se procedió a ajustar el inóculo en Caldo Caso (TSB) por comparación visual hasta la turbidez ($1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ UFC/ml.) equivalente al tubo N°0,5 en la escala de Mac Farland, luego se procedió a tomar 100 μ l. de la suspensión bacteriana y se sembró en placas Petri que contenían agar Mueller Hinton.

c. Inoculación del principio activo

Se distribuyó de manera uniforme el inóculo en las placas Petri, con movimientos hacia todas las direcciones girando la placa, con el uso de hisopos estériles. Se tapó la placa y se dejó secar durante 5 minutos a temperatura ambiental antes de confeccionar los pozos. Se confeccionaron los socavados con sacabocado N° 4^a 6 mm. de diámetro, y se colocó las sustancias antimicrobianas al raz del agar.

Se prepararon las pastas de hidróxido de calcio a una proporción de 1:1, 1 gr. de polvo de hidróxido de calcio más 1ml. del vehículo (aceite esencial de muña o gluconato de clorhexidina al 2%).

La pasta 3Mix-MP se preparó retirando previamente la cubierta entérica de los antibióticos (metronidazol y ciprofloxacino), se trituró cada antibiótico en tres recipientes estériles diferentes, luego se colocó sobre un a platina de papel, con la ayuda de una cucharita dosificadora, en una proporción de 1:1:1 los 3 antibióticos pulverizados; se dividió en 7 partes para mezclarlas con el vehículo (MP). Se mezcló de forma homogénea los tres componentes sólidos (3Mix), y en otra parte de la platina se dejó una cucharadita de Macrogol (M) y una gota de Propelinglicol (P) en proporciones de 1:1; se mezclaron hasta obtener un solo compuesto homogéneo.

Para la obtención de la pasta 3Mix-MP, se mezcló una parte del vehículo MP (Macrogol-Propelinglicol) con 7 partes de la 3Mix (metronidazol, ciprofloxacino y minociclina).

La pasta 3Mix-MP y las pastas (muña + hidróxido de calcio y gluconato de clorhexidina al 2% + hidróxido de calcio), se administraron en los pozos de 6mm. de diámetro con jeringas descartables estériles hasta saturarlos completamente cada pozo.

Para el caso de las soluciones se administraron 20 µl. aproximadamente del aceite esencial de muña, gluconato de clorhexidina al 2% y suero fisiológico, con el uso de una micropipeta; se colocaron a la estufa a 37°C las 40 placas petri, siendo retiradas únicamente al cabo de 24 y 72 horas para medir los halos de inhibición bacteriana y llenar en la ficha de recolección de datos. **(Ver anexo N°8)**

d. Lectura

Se realizó la medición de los halos de inhibición bacteriana con un calibrador vernier a las 24 y 72 horas, y se registró en el instrumento de recolección de datos; para su procesamiento y análisis estadístico.

3.4. Procesamiento de datos y análisis estadístico.

El procesamiento de los datos se realizó con el programa estadístico SPSS versión 20; se aplicó la prueba estadística T de Student y el test de comparaciones múltiples HSD (Honestly-significant-difference) de Tukey. Las tablas fueron elaboradas en el programa Microsoft Excel 2016.

3.5. Aspectos éticos.

- a. Solicitud de autorización para el uso del Laboratorio de Microbiología, dirigida al Director de la Escuela Académica Profesional de Odontología de la Universidad privada Norbert Wiener, con el objetivo de realizar un estudio *In vitro* del efecto inhibitor de diferentes sustancias antimicrobianas frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212).

- b. Carta de respuesta del Director de la Escuela Académica Profesional de Odontología de la Universidad privada Norbert Wiener para el uso del Laboratorio de Microbiología y levantamiento de toda la información obtenida en la ejecución del proyecto de tesis.
- c. Protocolo de eliminación de las muestras y desechos biológicos según las normas establecidas por el área de Laboratorio de Microbiología y Oficina de Material Didáctico de la Universidad Privada Norbert Wiener. **(Ver anexo N°9)**

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. Resultados.

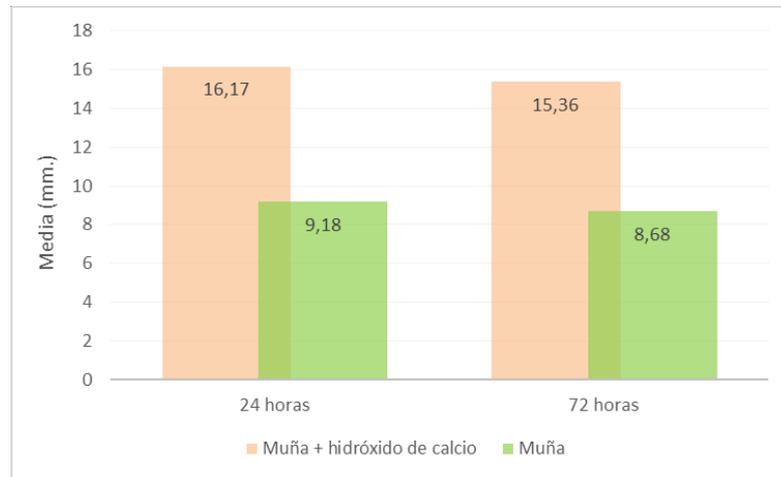
Tabla N° 1.- Efecto inhibitor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con el aceite esencial de muña frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas.

Tiempo	Sustancia	Efecto inhibitor		p	
		Media (mm.)	Sustancia		Media (mm.)
24 Horas	Muña + hidróxido de calcio	16,17	Muña	9,18	0,000
72 Horas	Muña + hidróxido de calcio	15,36	Muña	8,68	0,000

Prueba T de Student: $p=0,000 < 0,05$ existe diferencia estadísticamente significativa.

Gráfico N° 1.- Efecto inhibitor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con el aceite esencial de muña frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas.

Promedio de los halos de inhibición en mm.



Tiempo de exposición

1.- El efecto inhibitor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio fue mayor en comparación al aceite esencial de muña frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas. Diferencia que fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

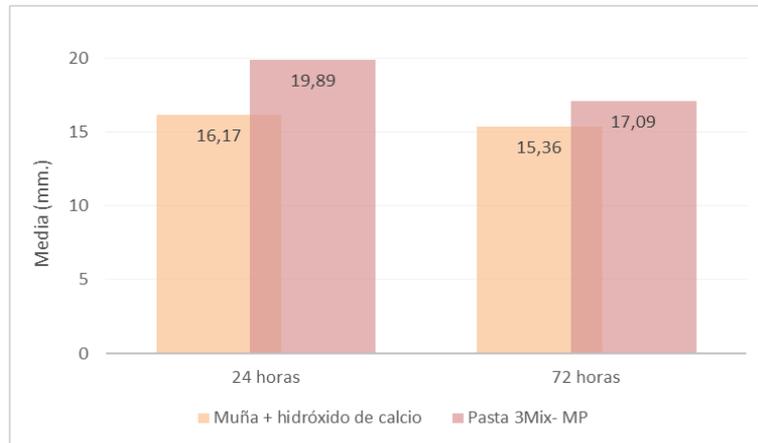
Tabla N°2.- Efecto inhibitor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con la pasta 3Mix-MP frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas.

Tiempo	Sustancia	Efecto inhibitor		p	
		Media (mm.)	Sustancia		Media (mm.)
24 Horas	Muña + hidróxido de calcio	16,17	Pasta 3 Mix-MP	19,89	0,000
72 Horas	Muña + hidróxido de calcio	15,36	Pasta 3 Mix-MP	17,09	0,000

Prueba T de Student: $p=0,000 < 0,05$ existe diferencia estadísticamente significativa.

Gráfico N°2.- Efecto inhibitor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con la pasta 3Mix-MP frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas.

Promedio de los halos de inhibición en mm.



Tiempo de exposición

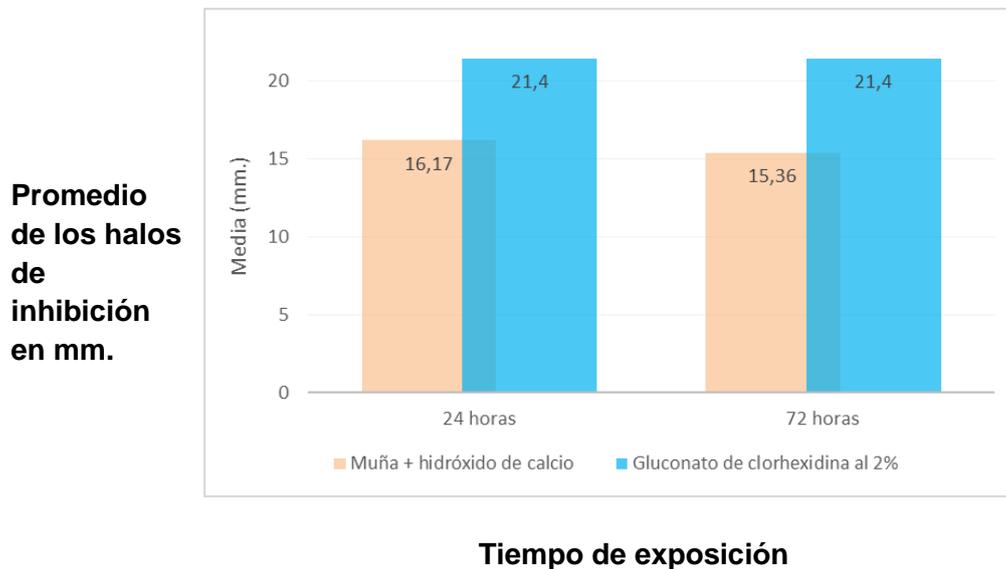
2.- El efecto inhibitor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio fue menor comparado con la pasta 3Mix-MP frente a *Enterococcus faecalis* al cabo de 24 y 72 horas. Diferencia que fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabla N°3.- Efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con el gluconato de clorhexidina al 2% frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas.

Tiempo	Sustancia	Efecto inhibidor		Media (mm.)	P
		Media (mm.)	Sustancia		
24 Horas	Muña + hidróxido de calcio	16,17	Gluconato de clorhexidina al 2%	21,40	0,000
72 Horas	Muña + hidróxido de calcio	15,36	Gluconato de clorhexidina al 2%	21,40	0,000

Prueba T de Student: $p=0,000 < 0,05$ existe diferencia estadísticamente significativa.

Gráfico N°3.- Efecto inhibitor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con el gluconato de clorhexidina al 2% frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas.



3.- El efecto inhibitor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio fue menor comparado con el gluconato de clorhexidina al 2% frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas. Diferencia que fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

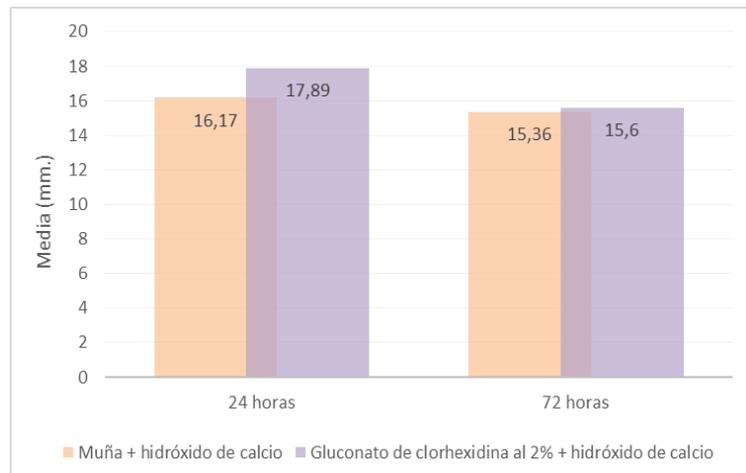
Tabla N°4.- Efecto inhibitor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con la mezcla del gluconato de clorhexidina al 2% con hidróxido de calcio frente a *Enterococcus faecalis* al cabo de 24 y 72 horas.

Tiempo	Sustancia	Efecto inhibitor		Media (mm.)	p
		Media (mm.)	Sustancia		
24 Horas	Muña + hidróxido de calcio	16,17	Gluconato de clorhexidina al 2% + hidróxido de calcio	17,89	0,000
72 Horas	Muña + hidróxido de calcio	15,36	Gluconato de clorhexidina al 2% + hidróxido de calcio	15,6	0,276

Prueba T de Student: No existió diferencia estadísticamente significativa a las 72 horas, ($p > 0,005$).

Gráfico N°4.- Efecto inhibitor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con la mezcla del gluconato de clorhexidina al 2% con hidróxido de calcio frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas.

Promedio de los halos de inhibición en mm.



Tiempo de exposición

4.- El efecto inhibitor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio fue menor comparado con la mezcla del gluconato de clorhexidina al 2% con hidróxido de calcio frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) al cabo de 24; a las 72 horas no existió diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,005$).

Tabla N°5.- Efecto inhibitor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con el aceite esencial de muña, pasta 3Mix-MP, gluconato de clorhexidina al 2% y mezcla de gluconato de clorhexidina al 2% con hidróxido de calcio frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) al cabo de 24 horas.

Sustancia estudiada	N	Media (mm.)	Desviación estándar (mm.)	P
Muña + CaOH ₂	40	16,17	0,59	0,000
Muña	40	9,17	0,44	
Pasta 3Mix-MP	40	19,89	1,67	
Gluconato de clorhexidina al 2%	40	21,40	1,25	
Gluconato de clorhexidina al 2% + CaOH ₂	40	17,88	1,16	

ANOVA (inter grupo): $p=0,000 < 0,05$

En la tabla se observó que existen diferencias significativas entre las medias de los halos de inhibición, formadas por las sustancias estudiadas a las 24 horas de exposición bacterianas.

Test de comparaciones múltiples HSD de Tukey.

Sustancia antimicrobiana (I)	Grupos (J)	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
<i>Minthostachys mollis</i> (muña) + Hidróxido de calcio (CaOH ₂)	<i>Minthostachys mollis</i> (muña)	6,99500*	0,000
	Pasta 3Mix-MP	-3,72000*	0,000
	Gluconato de clorhexidina al 2%	-5,23000*	0,000
	Gluconato de clorhexidina al 2% + hidróxido de calcio(CaOH ₂)	-1,71750*	0,000
<i>Minthostachys mollis</i> (muña)	<i>Minthostachys mollis</i> (muña) + Hidróxido de calcio (CaOH ₂)	-6,99500*	0,000
	Pasta 3Mix-MP	-10,71500*	0,000
	Gluconato de clorhexidina al 2%	-12,22500*	0,000
	Gluconato de clorhexidina al 2% + hidróxido de calcio(CaOH ₂)	-8,71250*	0,000
Pasta 3Mix-MP	<i>Minthostachys mollis</i> (muña) + Hidróxido de calcio (CaOH ₂)	3,72000*	0,000
	<i>Minthostachys mollis</i> (muña)	10,71500*	0,000
	Gluconato de clorhexidina al 2%	-1,51000*	0,000
	Gluconato de clorhexidina al 2% + hidróxido de calcio(CaOH ₂)	2,00250*	0,000
Gluconato de clorhexidina al 2%	<i>Minthostachys mollis</i> (muña) + Hidróxido de calcio (CaOH ₂)	5,23000*	0,000
	<i>Minthostachys mollis</i> (muña)	12,22500*	0,000
	Pasta 3Mix-MP	1,51000*	0,000
	Gluconato de clorhexidina al 2% + hidróxido de calcio(CaOH ₂)	3,51250*	0,000
Gluconato de clorhexidina al 2% + hidróxido de calcio(CaOH ₂)	<i>Minthostachys mollis</i> (muña) + Hidróxido de calcio (CaOH ₂)	1,71750*	0,000
	<i>Minthostachys mollis</i> (muña)	8,71250*	0,000
	Pasta 3Mix-MP	-2,00250*	0,000

	Gluconato de clorhexidina al 2%	-3,51250*	0,000
--	---------------------------------	-----------	-------

La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

En el Test de comparaciones múltiples HSD de Tukey, se observó que el promedio dado por los halos de inhibición del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio, fue mayor significativamente a la media de los halos de inhibición formados por el aceite esencial de muña ($p < 0,05$) a las 24 horas.

Se observó que el promedio de los halos de inhibición del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio fue menor significativamente a la media de los halos de inhibición formados por la pasta 3Mix-MP ($p < 0,05$), gluconato de clorhexidina al 2% ($p < 0,05$) y a la mezcla del gluconato de clorhexidina al 2% con hidróxido de calcio ($p < 0,05$) a las 24 horas.

Gráfico N°5.- Efecto inhibitor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con el aceite esencial de muña, pasta 3Mix-MP, gluconato de clorhexidina al 2% y mezcla de gluconato de clorhexidina al 2% con hidróxido de calcio frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) al cabo de 24 horas.



5.- El efecto inhibitor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con el aceite esencial de muña, pasta 3Mix-MP, gluconato de clorhexidina al 2% y mezcla de gluconato de clorhexidina al 2% con hidróxido de calcio frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) al cabo de 24 horas, tuvo las siguientes características:

- El aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio tuvo un efecto inhibitor mayor al aceite esencial de muña. La diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

- El aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio tuvo un efecto inhibitor menor a la pasta 3Mix-MP, gluconato de clorhexidina al 2% y a la mezcla del gluconato de clorhexidina al 2% con hidróxido de calcio. La diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabla N°6.- Efecto inhibitor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con el aceite esencial de muña, pasta 3Mix-MP, gluconato de clorhexidina al 2% y mezcla de gluconato de clorhexidina al 2% con hidróxido de calcio frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) al cabo de 72 horas.

Sustancia estudiada	N	Media (mm.)	Desviación estándar (mm.)	P
Muña + CaOH ₂	40	15,36	0,82	0,000
Muña	40	8,67	0,47	
Pasta 3Mix-MP	40	17,08	2,27	
Gluconato de clorhexidina al 2%	40	21,40	1,25	
Gluconato de clorhexidina al 2% + CaOH ₂	40	15,60	1,11	

ANOVA (inter grupo): $p = 0,000 < 0,05$

En la tabla se observó que existen diferencias significativas entre las medias de los halos de inhibición formados por las sustancias estudiadas a las 72 horas de exposición bacteriana.

Test de comparaciones múltiples HSD de Tukey.

Sustancia estudiada(I)	Grupos (J)	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
<i>Minthostachys mollis</i> (muña) + Hidróxido de calcio (CaOH ₂)	<i>Minthostachys mollis</i> (muña)	6,68500*	0,000
	Pasta 3Mix-MP	-1,72750*	0,000
	Gluconato de clorhexidina al 2%	-6,04000*	0,000
	Gluconato de clorhexidina al 2% + hidróxido de calcio(CaOH ₂)	-0,24000	0,000
<i>Minthostachys mollis</i> (muña)	<i>Minthostachys mollis</i> (muña) + Hidróxido de calcio (CaOH ₂)	-6,68500*	0,000
	Pasta 3Mix-MP	-8,41250*	0,000
	Gluconato de clorhexidina al 2%	-12,72500*	0,000
	Gluconato de clorhexidina al 2% + hidróxido de calcio(CaOH ₂)	-6,92500*	0,000
Pasta 3Mix-MP	<i>Minthostachys mollis</i> (muña) + Hidróxido de calcio (CaOH ₂)	1,72750*	0,000
	<i>Minthostachys mollis</i> (muña)	8,41250*	0,000
	Gluconato de clorhexidina al 2%	-4,31250*	0,000
	Gluconato de clorhexidina al 2% + hidróxido de calcio(CaOH ₂)	1,48750*	0,000
Gluconato de clorhexidina al 2%	<i>Minthostachys mollis</i> (muña) + Hidróxido de calcio (CaOH ₂)	6,04000*	0,000
	<i>Minthostachys mollis</i> (muña)	12,72500*	0,000
	Pasta 3Mix-MP	4,31250*	0,000
	Gluconato de clorhexidina al 2% + hidróxido de calcio(CaOH ₂)	5,80000*	0,000
Gluconato de clorhexidina al 2% + hidróxido de calcio(CaOH ₂)	<i>Minthostachys mollis</i> (muña) + Hidróxido de calcio (CaOH ₂)	0,24000	0,000
	<i>Minthostachys mollis</i> (muña)	6,92500*	0,000
	Pasta 3Mix-MP	-1,48750*	0,000

	Gluconato de clorhexidina al 2%	-5,80000*	0,000
--	---------------------------------	-----------	-------

La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

En la tabla se observó que el promedio dado por los halos de inhibición del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio fue mayor significativamente a la media de los halos de inhibición formados por el aceite esencial de muña ($p < 0,05$) a las 72 horas.

Se observó que la media de los halos de inhibición del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio fue significativamente menor al promedio de los halos de inhibición de la pasta 3Mix-MP ($p < 0,05$) y del gluconato de clorhexidina al 2% ($p < 0,05$) a las 72 horas.

Por último, la media de los halos de inhibición del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio fue menor que la mezcla del gluconato de clorhexidina al 2% con hidróxido de calcio; aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$) a las 72 horas.

Gráfico N°6.- Efecto inhibitor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con el aceite esencial de muña, pasta 3Mix-MP, gluconato de clorhexidina al 2% y mezcla de gluconato de clorhexidina al 2% con hidróxido de calcio frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) al cabo de 72 horas.



6.- El efecto inhibitor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con el aceite esencial de muña, pasta 3Mix-MP, gluconato de clorhexidina al 2% y mezcla de gluconato de clorhexidina al 2% con hidróxido de calcio frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) al cabo de 72 horas, tuvo las siguientes características:

- El aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio tuvo mayor efecto inhibitor comparado con el aceite esencial de muña. La diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$).
- El aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio tuvo menor efecto inhibitor comparado con la pasta 3Mix-MP, gluconato de clorhexidina al 2% y mezcla del gluconato de clorhexidina al 2% con el

hidróxido de calcio. La diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

- El aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio tuvo menor efecto inhibitorio comparado con la mezcla del gluconato de clorhexidina al 2% con el hidróxido de calcio. La diferencia no fue estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

4.2. Discusión.

En este estudio *In vitro* se tuvo como finalidad determinar el efecto inhibitorio del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con el aceite esencial de muña, pasta 3Mix-MP, gluconato de clorhexidina al 2% y mezcla de gluconato de clorhexidina al 2% con hidróxido de calcio frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212).

El *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) es un coco Gram positivo anaerobio facultativo, tiene función patogénica en el fracaso endodóntico, presenta mecanismos de adaptación bacteriana, entre ellos; la formación de biofilms. Sobrevive en situaciones escasas de nutrientes y fue señalado como el principal causante de la periodontitis apical persistente e infecciones endodónticas secundarias.

El aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio presentó halos de inhibición mayores comparado con el aceite esencial de muña a través del método de difusión en agar por pozos (método Kirby-Bauer modificado). Existió efecto inhibitorio del aceite esencial de una planta nativa del Perú asociada a un antimicrobiano sintético frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212), posiblemente debido a un sinergismo entre ambas sustancias, lo que quizás

conllevaría a obtener espectros antibacterianos más amplios. Tales conclusiones concordaron con **Labán Y. (2014) (14)** quien determinó el efecto inhibitor de la *Menta piperita* al 100% y la mezcla de *Menta piperita* al 100% con el hidróxido de calcio frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212). De igual forma se concordó con **Alaba y Jiménez (2016) (8)** y **Huari G. (2014) (13)** con referente a la presencia del efecto inhibitor de bacterias, del aceite esencial de muña que posiblemente influye, a través de un sinergismo con el hidróxido de calcio en potencializar sus efecto.

El aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio y el aceite esencial de muña tuvieron menor efecto inhibitor comparado con el gluconato de clorhexidina al 2%, coincidiendo con los estudios realizados por **Farinango H. (2013) (16)** y **Malpartida F. (2010) (6)**. El primero demostró el efecto inhibitor del gluconato de clorhexidina al 2% comparado con las diversas concentraciones del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* (manzanilla); mas no encontró diferencia significativa entre el efecto inhibitor del gluconato de clorhexidina al 2% y el aceite esencial de manzanilla al 100% a las 24 y 48 horas con el mismo método de aplicación en esta investigación, mientras que el segundo determinó el efecto inhibitor del aceite esencial de muña en comparación al paramonoclorofenol alcanforado y gluconato de clorhexidina al 2%, ambos estudios frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212).

El efecto inhibitor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio fue menor al efecto inhibitor del gluconato de clorhexidina al 2% mezclado con hidróxido de calcio (17,89 mm.) a las 24 horas, mas no fue significativo el valor a las 72 horas de exposición frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212), en

concordancia con **Aguirre y Huatuco (2016) (11)** quienes estudiaron la efectividad antibacteriana de la pasta de hidróxido de calcio con clorhexidina al 2% comparado con la pasta de hidróxido de calcio mezclado con yodopovidona al 1% frente al *Enterococcus faecalis*. Se concluyó que la pasta de hidróxido de calcio con clorhexidina al 2% tiene efectividad antibacteriana y es mayor comparada con la pasta de de hidróxido de calcio con yodopovidona al 1%; en discrepancia con **Zavala L. (2014) (15)** quien estudió *In vitro* el efecto inhibitor de la clorhexidina gel al 2% e hidróxido de calcio mezclado con diversos vehículos (solución de clorhexidina al 2%, paramonoclorofenol alcanforado y suero fisiológico) ante la presencia de *Enterococcus faecalis* ATCC (29212), obtuvo un promedio de halos de inhibición de 4,71 mm., diferencia evidente, posiblemente debida al tipo de agar (Cerebro Corazón) que utilizó el investigador.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

5.1. Conclusiones.

- 1) El efecto inhibitor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio fue mayor comparado con el aceite esencial de muña frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas.
- 2) El efecto inhibitor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio fue menor comparado a la pasta 3Mix-MP frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas.

- 3) El efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio fue menor comparado con el gluconato de clorhexidina al 2% frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas.
- 4) El efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio fue menor comparado con la mezcla del gluconato de clorhexidina al 2% con hidróxido de calcio frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) al cabo de 24 horas; a las 72 horas no existió diferencia significativa.
- 5) El efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio fue mayor comparado con el aceite esencial de muña, y menor al efecto inhibidor de la pasta 3Mix-MP, gluconato de clorhexidina al 2% y mezcla del gluconato de clorhexidina al 2% con hidróxido de calcio frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) al cabo de 24 horas.
- 6) El efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio fue mayor comparado al aceite esencial de muña, y menor al efecto inhibidor de la pasta 3Mix-MP, gluconato de clorhexidina al 2% y mezcla del gluconato de clorhexidina al 2% con hidróxido de calcio (no existió diferencia significativa) frente a *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) al cabo de 72 horas.

5.2. Recomendaciones.

- Realizar estudios sobre el efecto inhibitor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio frente a *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces israelii* y *Candida albicans*.
- Realizar estudios sobre otras sustancias antimicrobianas alternativas frente a cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC (29212).
- Realizar estudios de biocompatibilidad del aceite esencial de muña.
- Investigar sobre la tabla de componentes químicos de la muña, como por ejemplo el carvacrol.

Referencias.

1. Nalawade T., Bhat K. and Sogi S. Antimicrobial activity of endodontic medicaments and vehicles using agar well diffusion method on facultative and obligate anaerobes. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2016; 9(4):335–341.
2. Masoud S., Ali S., Hooman N., Mohammad R. M. and Hasan S. Antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*: A systematic review and meta-analysis. *J Appl Oral Sci.* 2014; 22(5): 356-65.
3. Leron K., Mor S., Shaul B., Yael H., Shunit C., Nurit B. and Ronen H. Phage therapy against *Enterococcus faecalis* in dental root canals. *J Oral Microbiol.* 2016; 8(10): 32157.
4. Pérez R., Díaz V., Algar J., Valencia De Pablo O., Estévez R. y Cisneros R. Actualización en microbiología endodóntica. *Cient. Dent.* 2013; 10(1): 27-39.
5. Ardila C., Maggiolo S., Dreyer E., Armijo J. y Silva N. *Enterococcus faecalis* en dientes con periodontitis apical asintomática. 2014; 18(4): 415-423.
6. Malpartida F. Efecto inhibitor del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en comparación al paramonoclorofenol alcanforado y gluconato de clorhexidina al 2% frente a cepas de *Enterococcus faecalis*. Estudio *In vitro*. [Tesis para optar el grado académico de Maestro en Estomatología]. Lima: Universidad Privada Alas Peruanas; 2010.
7. Chávez L. Redefining the persistent infection in root canals: Possible role of biofilm communities. *Journal of Endodontics.* 2007; 33(6):652-662.

8. Alaba W., Jiménez C. Efecto inhibitorio *In vitro* del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña) sobre colonias de *Enterococcus faecalis* ATCC (29212). Rev. Simiykita. 2016; 1(1): 15-22.
9. Pardi G., Guilarte C., Cardozo E. y Briceño E. "Detección de *Enterococcus faecalis* en dientes con fracaso en el tratamiento endodóntico". Acta Odontol. Venez. 2009; 47(1): 110-121.
10. Furuya A., Arroniz S., Vaca S, Paniagua G., Monroy E. y Hernández L. Evaluación de la actividad antibacteriana en una mezcla de hidróxido de calcio y clorhexidina al 0.12% como irrigante pulpar. Revista Oral. 2007; 8(24): 374-379.
11. Aguirre C. y Huatuco J. Efectividad antibacteriana de dos pastas medicamentosas frente al *Enterococcus faecalis*. Simiykita. 2016; 2(1): 16-25.
12. Huari G. Efecto antibacteriano *In vitro* del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en *Streptococcus mutans*. [Tesis para optar el título de Cirujano Dentista]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014.
13. Labán Y. Efecto inhibitor del aceite esencial de la *Menta piperita* al 100% e hidróxido de calcio mezclado con *Menta piperita* al 100% y paramonoclorofenol alcanforado frente a cepas de *Enterococcus faecalis*. [Tesis para optar el título de Cirujano Dentista]. Lima: Universidad Privada Norbert Wiener; 2014.
14. Zavala L. Efecto inhibitor de la clorhexidina gel al 2% y del hidróxido de calcio mezclado con tres diferentes vehículos (solución de clorhexidina al 2%, paramonoclorofenol alcanforado y suero fisiológico) ante la presencia del *Enterococcus faecalis*. Estudio *In vitro*. [Tesis para optar el título de Cirujano Dentista]. Lima: Universidad Privada Norbert Wiener; 2014.

15. Farinango H. Efecto inhibidor del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) en comparación al paramonoclorofenol alcanforado y gluconato de clorhexidina al 2% sobre cepas de *Enterococcus faecalis*. Estudio *In vitro*. [Trabajo de investigación previo a la obtención del título de Odontóloga]. Quito: Universidad Central del Ecuador; 2013.

16. Ccallo N. Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del *Mintostachys mollis* (muña), frente a la actividad bacteriana de *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*. [Tesis para optar el título de Cirujano Dentista]. Puno: Universidad Nacional del Altiplano; 2013.

17. Salcedo D. Efecto antibacteriano de las pastas 3 Mix-MP y Calen PMCC® en un biofilm de tres bacterias predominantes en periodontitis apical crónica. [Tesis para optar el grado académico de doctor en Estomatología]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2015.

18. Álamo J., Guardia S., Román L. y Guerra L. Efectividad de tres irrigantes sobre el número de colonias de *Enterococcus faecalis* en la preparación de conductos radiculares. Estudio *In vitro*. Kiru 2015; 12(1): 8-12.

19. Lakshmi L. and Vaishnavi C. Endodontic Microbiology. J. Conserv Dent. 2010; 13(4): 233-239.

20. Padilla E. "Efectividad de la pasta de Hoshino en tratamientos pulpares de niños de 3 a 6 años en el Hospital Nivel II EsSalud Huánuco 2016". [Tesis para optar el título de Cirujano Dentista]. Lima: Universidad de Huánuco; 2016.

21. Calderón V., Ximénez L. y Chávez E. Estudio comparativo *In vitro* de la capacidad antibacteriana de la clorhexidina, hidróxido de calcio y yoduro de

potasio yodado contra *Fusobacterium nucleatum*. Revista Odontológica Mexicana. 2007; 11 (1): 30-37.

22. Retto D. Efecto inhibitor del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) en comparación al gluconato de clorhexidina 2% frente a cepas de *Enterococcus faecalis*. Estudio *In vitro*. [Tesis para optar el título de Cirujano Dentista]. Lima: Universidad Privada Norbert Wiener; 2014.

23. Weckwerth P., Zapata R., Vivan R., Tanomaru Filho M., Maliza A. and Duarte M. *In vitro* alkaline pH resistance of *Enterococcus faecalis*. Brazilian Dental Journal. 2013; 24(5): 474-476.

24. Komiyama E., Lepesqueur L., Yassuda C., Samaranayake L., Parahitiyawa N., Balducci I. and Koga-Ito C. *Enterococcus* Species in the oral cavity: Prevalence, virulence factors and antimicrobial susceptibility. Plos one. 2016; 11(9): e0163001.

25. Wang L. y Siguas M. Estudio comparativo de la efectividad antibacteriana de la asociación de clorhexidina al 2%, de hidróxido de calcio, puntas de hidróxido de calcio y puntas de clorhexidina frente al *Enterococcus faecalis*. Kiru. 2007; 4(1): 14-16.

26. Cano C., Bonilla P., Roque M., y Ruiz j. Actividad antimicótica *In vitro* y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña). Rev. Perú Med. Exp. Salud pública. 2008; 25(3): 298-301.

27. Rivadeneira D. y Álvarez P. Aceite esencial de *Schinus molle* L. (Molle) como potencial antimicrobiano sobre *Streptococcus mutans*. Estudio *In vitro*. Kiru. 2015; 12(2):8-14.

28. Carhuapoma M., López S., Roque M., Velapatiño B., Bell C. y Whu D. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb “Ruyaq Muña”. Ciencia e investigación. 2009; 12(2): 83-89.
29. Borja F. Actividad antibacteriana y concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del *Cymbopogon citratus* frente al *Streptococcus mutans* *In vitro*. [Tesis para optar el título de Cirujano Dentista]. Lima: Universidad Nacional Federico; 2007.
30. Torrenegra M, Granados C, Durán M, León G, Yáñez X., Martínez C. y Pájaro N. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis*. Orinoquia. 2016; 20(1).
31. Aigaje A. “Efectividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (tipo) al 25, 50, 100 % frente a *Porphyromonas gingivalis* estudio *In vitro*”. [Trabajo de titulación previo la obtención del grado académico de odontólogo]. Quito: Universidad Central del Ecuador; 2016.
32. Del Pilar Guiza D. y Rincón L. Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* combinado con inactivación térmica, sobre cepas de *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*. [Trabajo de grado, presentado como requisito parcial para optar el título de Microbiólogo Industrial]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2007.
33. Lakhani A., Sekhar K., Gupta P., Tejolatha B., Gupta A., Kashyap S., V. Desai and Farista S. Efficacy of Triple Antibiotic Paste, Moxifloxacin, Calcium Hydroxide And 2% Chlorhexidine Gel In Elimination of *Enterococcus Faecalis*: An *In vitro* Study. J Clin Diagn Res. 2017; 11(1): zc06–zc09.

34. Quispe A. Evaluación del efecto antibacteriano de la combinación de drogas 3Mix en bacterias anaerobias prevalentes en necrosis pulpar. [Tesis para optar el título de Cirujano Dentista]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2007.
35. Ayala L. Efectividad antibacteriana *In vitro* de la pasta tri mix frente a *Actinomyces odontolyticus* y *Porphyromonas gingivalis*. [Tesis para optar el título de Cirujano Dentista]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2015.
36. Azaña I. Efectividad antibacteriana *In vitro* del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb (muña) sobre bacterias prevalentes en patologías periapicales crónicas de origen endodóntico. [Tesis para optar el título de Cirujano Dentista]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2010.
37. Negroni M. Microbiología estomatológica: Fundamentos y guía práctica. (Segunda edición). Buenos aires: Editorial médica panamericana; 2009.

ANEXOS.

ANEXO N°1

Lima, 10 de octubre del 2016

Solicito: Uso del laboratorio de
Microbiología para la ejecución del
proyecto de tesis.

Dr.

Carlos Michell Gálvez Ramírez.

Director de la Escuela Académica Profesional de Odontología.

Por medio de la presente yo Elizabeth Evelyn Huallpa Tucto, Bachiller en Odontología de la Universidad Privada Norbert Wiener, solicito el uso del laboratorio de Microbiología de la Universidad para la ejecución de mi proyecto de tesis: "Efecto inhibidor del aceite esencial de *Minthostachys mollis*" (muña) mezclado con hidróxido de calcio en comparación al aceite esencial de *Minthostachys mollis*" (muña), pasta 3Mix-MP, gluconato de clorhexidina al 2% y mezcla de gluconato de clorhexidina al 2% con hidróxido de calcio frente a cepas de *Enterococcus faecalis*. Estudio *In Vitro*. Lima 2016". Para optar el título de Cirujano Dentista.

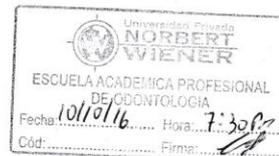
Sin otro particular me despido

Atentamente.



Elizabeth Evelyn Huallpa Tucto

D.N.I 44577608



ANEXO N°2



Lima, 11 de octubre de 2016

Señorita
Elizabeth Evelyn Huallpa Tucto
Alumna
Presente.

Es grato dirigirme a usted para saludarla cordialmente y en referencia a su solicitud presentada sobre la realización de su proyecto de investigación titulado: "Efecto inhibitor del aceite esencial de "Menthostachys mollis" (Muña) mezclado con hidróxido de calcio en comparación al aceite esencial de "Menthostachys mollis" (Muña), pasta 3Mix-MP, gluconato de clorhexidina al 2% y mezcla de gluconato de clorhexidina al 2% con hidróxido de calcio frente a cepas de Enterococcus faecalis. Estudio In Vitro.Lima 2016", hacemos de su conocimiento que la Dirección de la EAP de Odontología, autoriza y brinda las facilidades necesarias para que pueda realizar el levantamiento de información de su trabajo de investigación.

Es propicia la ocasión para expresarle los sentimientos de mi especial consideración.

Atentamente,




Mg. Carlos Mitchell Gálvez Ramírez
Director (e)
Escuela Académico Profesional de
Odontología

ANEXO N°3



Mantenimiento de cepas de control de calidad

Con el mantenimiento adecuado, muchos microorganismos producidos por Microbiologics pueden utilizarse en pruebas de control de calidad hasta un mes después de su reconstitución. En este boletín técnico, Microbiologics ofrece dos planes para el mantenimiento de microorganismos para el control de calidad. El primer plan tiene menos pasos para el microorganismo. En el segundo plan, el cultivo de inventario operativo se prepara de forma semanal en lugar de mensual. Al elegirse un plan deben tenerse en cuenta las pautas regulatorias y las instrucciones del fabricante de la prueba para el mantenimiento de microorganismos.

En los siguientes cuadros, se ofrecen consejos para el mantenimiento de microorganismos.

Primeros pasos

- Debe iniciarse un KWIK-STIK™ o un LYFO DISK® en un agar no selectivo, como el agar triptico de soja o el agar sangre de oveja. No usar caldo.
- Un cultivo operativo del inventario de control de calidad no puede congelarse para asumir el estado de cultivo de referencia.

Consejos para un mejor rendimiento

- No realizar pruebas en la placa de granulación original. Esta es la placa en la cual se inició el gránulo liofilizado. Los organismos que crecen en esta placa no están completamente resucitados.
- En las pruebas siempre deben utilizarse microorganismos frescos. Muchas de las pruebas exigen que los microorganismos no tengan más de 24 horas.
- Seleccione colonias aisladas para la prueba.
- Es posible que sea necesario iniciar los microorganismos utilizados para el control de calidad de pruebas de susceptibilidad a los antibióticos cada dos semanas, ya que algunos microorganismos pierden resistencia con el tiempo. Algunos ejemplos son: *P. aeruginosa* ATCC® 27853™** (catálogo n.º 0353), *E. faecalis* ATCC® 51299™** (catálogo n.º 0930) y *S. pneumoniae* ATCC® 49619™** (catálogo n.º 0947).
- No deben realizarse pruebas en colonias de una placa contaminada.

Almacenamiento de microorganismos

- Los microorganismos exigentes tienen periodos de supervivencia más reducidos que las bacterias aeróbicas. Es necesario crear subcultivos cada varios días. Por ejemplo, para *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria gonorrhoeae* deben crearse subcultivos cada tres días.
- Las bacterias aeróbicas deben almacenarse a una temperatura de 2 a 8 °C. Algunas especies de *Bacillus* constituyen una excepción, ya que permanecen viables durante periodos más prolongados cuando se los almacena a temperatura ambiente. Almacene los microorganismos que requieren CO₂ a temperatura ambiente en una jarra con vela o en un recipiente con paquete de CO₂. Las levaduras y hongos deben almacenarse a temperatura ambiente. Los organismos anaeróbicos deben almacenarse en condiciones anaeróbicas, a temperaturas de 2 a 8 °C. *Compiobacter* debe almacenarse a 35 °C en condiciones microaerófilas.

Conclusión

- Después de la cuarta semana, deseché las placas y vuelva a comenzar el proceso con un nuevo gránulo liofilizado.
- Se puede utilizar un microorganismo después de la fecha de vencimiento si (uno) el gránulo liofilizado se cultiva antes de la fecha de vencimiento y (dos) el microorganismo no se utiliza después de la cuarta semana del programa de mantenimiento.



*El emblema de ATCC Licensed Derivative, la marca ATCC Licensed Derivative y las marcas del catálogo de ATCC son marcas comerciales de ATCC. Microbiologics, Inc. cuenta con licencia para utilizar estas marcas comerciales y para vender productos derivados de los cultivos de ATCC®.

ANEXO N°4

MicroBioLogics®

217 Osseo Avenue North • St. Cloud, Minnesota 56303
(320) 253-1640 • (800) 599-BUGS (2847) • Fax (320) 253-6250
www.microbiologics.com • Info@mbi2000.com

Good news to all,

MicroBioLogics, Inc. has improved our shipping policy to increase inventory of lower volume, but very important microorganisms. MicroBioLogics will begin shipping products with no less than 6 months of remaining shelf-life.

This change will decrease backorders, decrease delivery time, control costs and eventually lower costs of the rarely ordered strains. With increased global demand of the most popular microorganism strains, we must concentrate our production attention on more frequently ordered products.

If you have any questions relating to this change, please contact MicroBioLogics or your authorized MicroBioLogics distributor. As always, all MicroBioLogics® products are fully guaranteed to the last day of the shelf life, so buy with confidence.

No other company has the range of microorganism strains, the speed of delivery and global Quality System Credentials of MicroBioLogics.

We thank you for your continued support and the opportunity to serve you.

Best Regards,

The MicroBioLogics Team



ANEXO N°5



Essential Oils Peru SAC
Calle Los Viñedos 312 - Camacho
La Molina - Lima
Telf: (051) 736 9840
ventas@eopperu.com
www.AceitesEsenciales-eop.com

Mg. C.D. Carlos Michell Galvez Ramírez

Director de la EAP De Odontología - Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad Privada Norbert Wiener

Presente.-

De nuestra consideración, reciba los saludos cordiales a nombre de
Essential Oils Perú.

Por medio de la presente tenemos a bien certificar que el producto ACEITE
ESENCIAL DE MUÑA (*Minthostachys mollis*) es 100% puro, producido utilizando el
método de Destilación por Arrastre de vapor.

Este certificado es emitido a solicitud de Elizabeth Evelyn Huallpa Tucto,
identificado con DNI 44577608 y código de alumno 2009100573 para su utilización
en la investigación "EFECTO INHIBIDOR DEL ACEITE ESENCIAL DE
"Minthostachys mollis" (MUÑA) MEZCLADO CON HIDRÓXIDO DE CALCIO EN
COMPARACIÓN AL ACEITE ESENCIAL DE "Minthostachys mollis" (MUÑA), PASTA
3MIX-MP, GLUCONATO DE CLORHEXIDINA AL 2% Y MEZCLA DE GLUCONATO DE
CLORHEXIDINA AL 2% CON HIDRÓXIDO DE CALCIO FRENTE A CEPAS
DE *Enterococcus faecalis*. ESTUDIO IN VITRO. LIMA 2016".

Atentamente,



Ing. Armando Noriega Mangini
Gerente General
Essential Oils Perú

ANEXO N°6



Essential Oils Peru SAC
Calle Los Viñedos 312 - Camacho
La Molina - Lima
Telf: (051) 736 9840
ventas@eopperu.com
www.AceitesEsenciales-eop.com

Protocolo de conservación de aceites esenciales EOP

Los Aceites Esenciales (AE) EOP son 100% puros y naturales. No contienen en su constitución aditivos químicos ni conservantes. Son producidos por medio de destilación por arrastre de vapor y mantenidos en condiciones óptimas de almacenamiento pudiendo tener un tiempo de vida útil de hasta 5 años según sea el caso.

Recomendaciones de almacenamiento y conservación:

- ✓ Mantenerlos en frascos de vidrio de color oscuro, ámbar de ser posible.
- ✓ Mantenerlos con tapón y tapa para evitar la entrada constante de aire.
- ✓ Mantenerlos alejados de la luz natural y en especial de la luz ultravioleta ya que algunos compuestos son fotosensibles y pueden llegar a oxidarse.
- ✓ Se deben conservar en lugares frescos, evitando cambios bruscos de temperatura, enfriamientos y calentamientos continuos.

El tiempo de vida útil promedio es de 5 años. Sin embargo las características aromáticas se mantienen intactas por un tiempo aproximado de 1 año en la mayoría de los casos.

Observaciones:

- ✓ Los AE cítricos son más propensos a la oxidación por lo que tienen un tiempo de vida menor. Para su mejor conservación se sugiere conservarlos a temperaturas entre los 4-10°C.
- ✓ Los AE de anís, hinojo y otros de la familia *apiaceae*, tienden a solidificarse a bajas temperaturas, no implicando esto su deterioro. Para ellos, es recomendable mantenerlos a temperatura ambiente.
- ✓ Los AE de vetiver y algunos maderables tienden a cambiar de aroma con el tiempo, fenómeno conocido como maduración.

ANEXO N°7

FOTOGRAFÍAS:



Foto N°1.- Preparación del agar Mueller Hinton y del caldo Trypticasa Soya según instrucciones del fabricante.

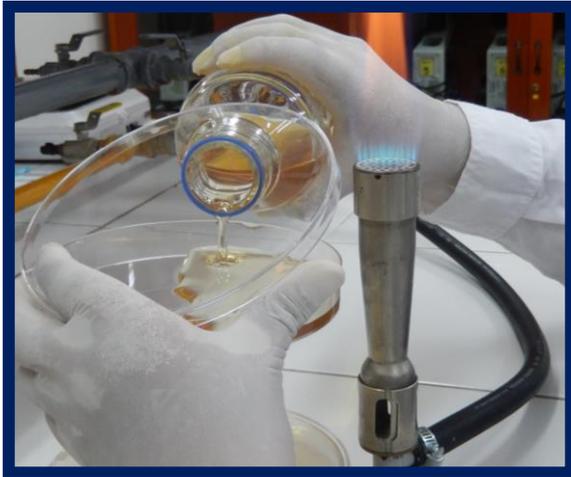


Foto N°2.- Distribución del medio de cultivo en las 40 placas Petri (15 cm.) a 4 mm. de espesor y solidificación.

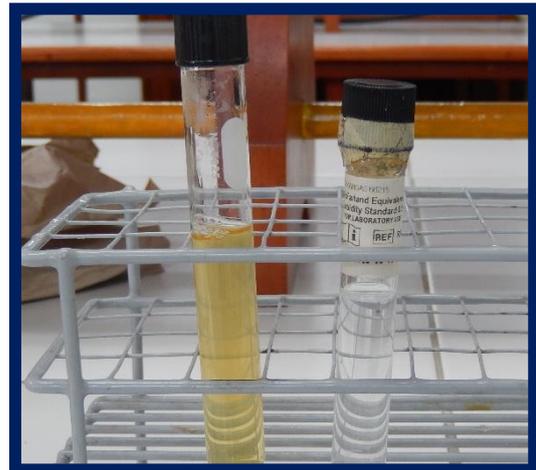


Foto N°3.- Reactivación y sembrado del *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) en dos placas petri que contenían agar Mueller Hinton y rotulado de los nombres de las sustancias a evaluar.

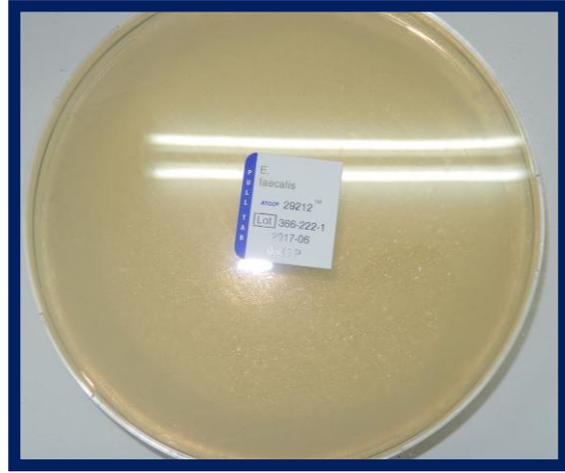
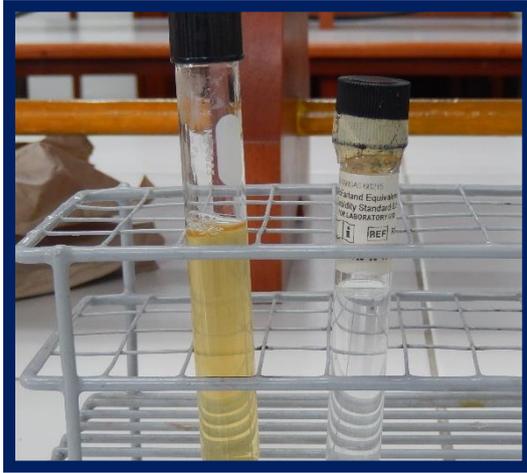


Foto N°4.- Ajuste del inóculo en caldo Tripticasa Soya, comparando con la suspensión de bario (0,5 en la escala de Mac Farland) como estándar de turbidez.

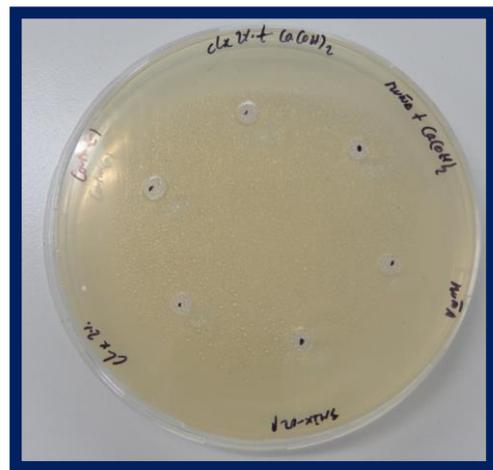


Foto N°5.- Inoculación de las 40 placas petri (15 cm.) con la suspensión bacteriana estandarizada y confección de los pozos de 6 mm. de diámetro por cada placa.



Foto N°6.- La pasta 3Mix-MP se preparó retirando previamente la cubierta entérica de los antibióticos (metronidazol y ciprofloxacino), se tritularon todos los fármacos en recipientes estériles individuales.



Foto N°7.- Se colocó los 3 antibióticos pulverizados sobre la platina de papel en una proporción de 1:1:1, igualmente el macrogol y propelinglicol de 1:1. Se mezcló, se separó y se obtuvo un preparado homogéneo, para colocar en los pozos con jeringas estériles descartables.



Foto N°8.- Se prepararon las pastas de hidróxido de calcio a una proporción de 1:1, 1 gr. de polvo más un mililitro del vehículo (aceite esencial de muña o gluconato de clorhexidina al 2%), y se administraron de igual manera.

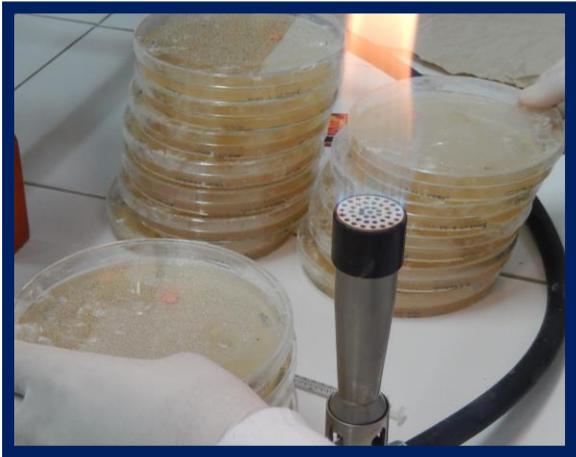


Foto N°9.- Se suministró de 20 μ l. aproximadamente de aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña), gluconato de clorhexidina al 2% y suero fisiológico (control negativo) con una micropipeta.

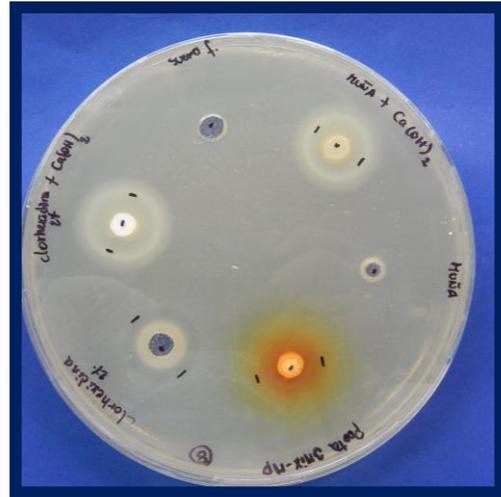


Foto N°10.- Medición de los halos de inhibición bacteriana de las sustancias estudiadas expresadas en mm. con el uso de un calibrador vernier a las 24 y 72 horas.

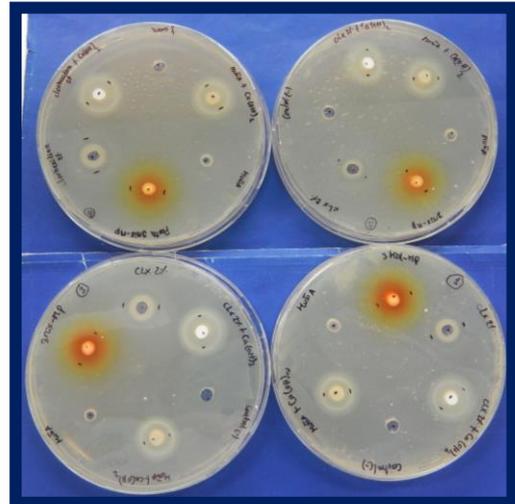


Foto N°11.- Registro de los halos de inhibición bacteriana en la ficha de recolección de datos.

ANEXO N°8

Tiempo de exposición:

Placa Petri N°	Ficha de recolección de datos: Medida de los halos de inhibición.					
	<i>Mintostachys mollis</i> (muña) + hidróxido de calcio (mm.)	<i>Mintostachys mollis</i> (muña) (mm.)	Pasta 3Mix-MP (mm.)	Gluconato de clorhexidina al 2%(mm.)	Gluconato de clorhexidina al 2%+hidróxido de calcio (mm.)	Agua destilada (mm.)
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						
28						
29						
30						
31						
32						
33						
34						
35						
36						
37						
38						
39						
40						

ANEXO N°9



Universidad
WIENER
Calidad académica al alcance de todos



59.6

NORMAS DE ELIMINACIÓN Y DISPOSICIÓN DE RESIDUOS COMUNES Y ESPECIALES.

Normas a cumplir por los usuarios de Laboratorios de ciencias y ambientes afines.

I.- CLASIFICACIÓN Y ELIMINACIÓN DE RESIDUOS SÓLIDOS.

RESIDUOS LÍQUIDOS ESPECIALES

Líquidos orgánicos y otros: Diluir con abundante agua y eliminar directamente al desagüe.

Solventes (tolueno, éter, benceno, metanol, nitrobenzono, acetona): Colocar los solventes en los frascos rotulados correspondientes ubicados en los laboratorios para su desecho respectivo por una empresa autorizada, no mezclar los reactivos.

Líquidos infecciosos (sangre, secreciones, sobrenadantes de los cultivos: bacterias, hongos, virus, mohos): Almacenar los materiales que contengan los microorganismos anteriormente citados en un recipiente que contenga lejía o betagen R82F (4ml en 1 lt de agua) por 10 minutos y eliminar el líquido contaminado al desagüe, embalar el recipiente con cintas de seguridad y desechar.



RESIDUOS SÓLIDOS ESPECIALES

Material de vidrio roto - Triturar el vidrio hasta 10 cm. de diámetro y colocar en el recipiente habilitado para el desecho de vidrios del almacén de reactivos, asegurar con cinta de embalaje.

Material de vidrio contaminado.- Prolongar el proceso de autoclavado por una hora a 121°C y 1,5 atmósferas de presión para volver a utilizar.

Agares, caldos: Autoclavar y colocar los desechos en la bolsa roja y colocar al tacho rojo.

Sales, óxidos, hidróxidos.- las sales se pueden reciclar, separar los residuos de los óxidos e Hidróxidos, colocar en una bolsa y colocarlo en la bolsa amarilla y tacho amarillo.



RESIDUOS SÓLIDOS COMUNES

Plásticos (venoclisis, volutrol, sondas Foley y similares).- Rotular y almacenar en una bolsa de plástico para su desecho en bolsa y tacho rojo.

OBJETOS PUNZANTES Y CORTANTES

Jeringas, agujas, lancetas.- Después de su uso colocar la jeringa en una caja de seguridad tetrapack, sacar el capuchón, para su desecho independiente, asegurar la caja llena con agujas para su desecho.



MATERIAL Y TEJIDOS BIOLÓGICOS

Piezas y tejidos biológicos: Colocar las muestras en frascos de vidrio y tapa hermética ancha con formol al 40 % y después de su uso eliminar a la fosa común.

Animales menores.- Colocar el animal muerto a una bolsa verde con cal para su disposición final en la fosa común por el personal responsable.

Frascos con heces.- Agregarlos formol sal o formol al 10 % para poder hacer el examen, luego del Análisis autoclavar y colocarlo en la bolsa roja y tacho rojo.

Algodones usados.- Después de su uso colocar en un recipiente que contenga lejía o betagen R82F (4 ml en L de agua) por 10 minutos, colocarlo en la bolsa roja, tacho rojo.

RESIDUOS COMUNES.- Como son las bolsas plásticas, papeles, etc colocar en una bolsa y tacho azul



II.- DISPOSICIÓN FINAL

- El personal de limpieza recoge los residuos sólidos de los pisos a las 2.30 pm y 8.30 pm, pide la llave en Secretaría de Sede y/o Oficina de Laboratorio y Material Didáctico, traslada los residuos sólidos al ambiente de bioseguridad N° S 06 ubicado en el sótano.

- La disposición de los tachos es la siguiente:

Lado Derecho: Residuos sólidos especiales de laboratorios.

Lado frontal: Reactivos orgánicos y biológicos (Cafeterías y otros).

Lado izquierdo: Residuos comunes. Pasadizos, aulas y servicios higiénicos.

Los residuos especiales son transportados y tratados por las EPS. Los residuos comunes son transportados al carro recolector.

- El personal de mantenimiento de los pisos 1 y 2 sacará los residuos sólidos comunes al carro recolector.



LABORATORIO MATERIAL DIDÁCTICO

MATRIZ DE CONSISTENCIA

Título: “Efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con cuatro soluciones frente a *Enterococcus faecalis*”.

Problema	Objetivos	Hipótesis	Metodología	Resultados	Conclusiones
<p>¿Cuál es el efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con cuatro soluciones frente a <i>Enterococcus faecalis</i>?</p>	<p><u>Objetivo general:</u></p> <p>Evaluar el efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con cuatro soluciones frente a <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC (29212).</p> <p><u>Objetivos específicos:</u></p> <p>Determinar el efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con el aceite esencial de muña frente a <i>Enterococcus faecalis</i></p>	<p>El efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio es mayor comparado con cuatro soluciones frente a <i>Enterococcus faecalis</i>.</p>	<p>Tipo y nivel de estudio:</p> <p>Experimental, analítico, prospectivo y longitudinal.</p> <p>Población y muestra:</p> <p>Bacterias propias de la periodontitis apical persistente.</p> <p>40 placas Petri con cultivo de cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212).</p>	<p>El efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio (16,17 mm. y 15,36 mm.) fue mayor comparado con el aceite esencial de muña (9,18 mm. y 8,68 mm.) frente a <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas respectivamente.</p> <p>El efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado</p>	<p>El efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio fue mayor comparado con el aceite esencial de muña frente a <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas.</p> <p>El efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio fue menor comparado con la pasta 3Mix-MP frente a <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas.</p>

	<p>ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas.</p> <p>Determinar el efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con la pasta 3Mix-MP frente a <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas.</p> <p>Determinar el efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con el gluconato de clorhexidina al 2% frente a <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas.</p> <p>Determinar el efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio comparado con la mezcla del gluconato de clorhexidina al 2% con</p>			<p>con hidróxido de calcio (16,17 mm. y 15,36 mm.) fue menor comparado con la pasta 3Mix-MP (19,89mm. y 17,09 mm.) frente a <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas respectivamente.</p> <p>El efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio (16,17 mm. y 15,36 mm.) fue menor comparado con el gluconato de clorhexidina al 2% (21,40 mm.) frente a <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas respectivamente.</p>	<p>El efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio fue menor comparado con el gluconato de clorhexidina al 2% frente a <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas.</p> <p>El efecto inhibidor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio fue menor comparado con la mezcla del gluconato de clorhexidina al 2% con hidróxido de calcio frente a <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas.</p>
--	--	--	--	---	--

	<p>hidróxido de calcio frente a <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas.</p>			<p>El efecto inhibitor del aceite esencial de muña mezclado con hidróxido de calcio (16,17 mm. y 15,36 mm.) fue menor comparado con la mezcla del gluconato de clorhexidina al 2% con el hidróxido de calcio (17,89 mm. y 15,6 mm.) frente a <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC (29212) al cabo de 24 y 72 horas respectivamente.</p>	
--	---	--	--	--	--