

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
ESCUELA DE POSTGRADO
SECCION DE POSTGRADO EN CIENCIAS MÉDICAS**



“Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroalcohólico de propóleo e hipoclorito de sodio frente a *Enterococcus faecalis*”

T E S I S

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRO EN ESTOMATOLOGÍA**

**AUTOR:
BR. GLENNY PAOLA ALVARADO CASTILLO**

**ASESORA:
DRA. CARMEN ISOLINA AYALA JARA**

**TRUJILLO-PERU
2015**

Registro N°:

JURADO DICTAMINADOR

Dr. Luis Felipe Alarco La Rosa
PRESIDENTA

Ms. Silvia Portella Bejarano
SECRETARIO

Dra. Carmen Isolina Ayala Jara
MIEMBRO

DEDICATORIA

A Dios por estar siempre conmigo y guiarme en cada paso que doy.

A mi padres por su sacrificio, cariño, y apoyo incondicional en el logro de mis metas.

A mi familia y amigos por su confianza, cariño y aliento para el logro de mis objetivos.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Carmen Isolina Ayala Jara por su asesoría en la realización de este trabajo de Investigación y, en especial por su amistad brindada.

Al Mg. Miguel Otiniano por su ayuda en la realización del presente trabajo.

A mi familia y amigos que de alguna manera ayudaron en la realización de este estudio.

INDICE

	Pág.
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUCCIÓN	01
1.1 PROBLEMA	09
1.2 HIPÓTESIS	09
1.3 OBJETIVOS	09
2. MATERIAL Y MÉTODOS	11
2.1 TIPO Y ÁREA DE ESTUDIO	11
2.2 DEFINICIÓN DE LA POBLACIÓN OBJETIVO	11
2.3 DISEÑO ESTADÍSTICO DEL MUESTREO	12
2.4 MÉTODOS Y TÉCNICAS	13
2.5 REGISTRO DE LA INFORMACIÓN	19
2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	19
2.7 VARIABLES DEL ESTUDIO	19
3. RESULTADOS	21
4. DISCUSIÓN	26
5. CONCLUSIONES	30
6. RECOMENDACIONES	31
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
ANEXOS	39

RESUMEN

Objetivo: El objetivo del presente trabajo de investigación fue comparar el efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroalcohólico de propóleo e hipoclorito de sodio frente a la cepa *Enterococcus faecalis*.

Método: El presente estudio experimental determinó la CMI y CMB del extracto hidroalcohólico de propóleo y del hipoclorito de sodio frente al *Enterococcus faecalis* mediante la técnica de turbidez óptica. Posteriormente se trabajó con 55 dientes que fueron divididos en tres grupos los cuáles fueron inoculados con *Enterococcus faecalis* y colocados en la estufa a 37° C por 24 horas. Luego el G1 = 22 dientes fueron irrigados con 2 ml. de extracto hidroalcohólico de propóleo a su CMB, el G2=22 dientes irrigados con 2 ml. de hipoclorito de sodio a su CMB y G3 (control) = 11 dientes irrigados con 2 ml. de solución salina fisiológica. Luego se obtuvo una muestra del interior de cada conducto con un cono de papel estéril el cuál se colocó en tubos de ensayo que contenían BHI y fueron incubados en estufa a 37° por 4 días, luego se obtuvo una muestra de esos tubos y se colocó en placas Petri con agar Mueller Hilton y se las puso a incubar en una estufa a 37° C por 24 horas.

Resultados: La CMI y CMB del extracto hidroalcohólico de propóleo fue 10% y la CMI y CMB del hipoclorito de sodio fue 20%. No hubo crecimiento bacteriano en las muestras obtenidas del G1 y G2. El análisis estadístico según la prueba de Mann Whitney determinó que no hubo diferencia significativa ($p=1.000$) entre el G1 y G2.

Conclusión: No existe diferencia entre el efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroalcohólico de propóleo e hipoclorito de sodio frente al *Enterococcus faecalis*.

Palabras Claves: Efecto antibacteriano, Extracto hidroalcohólico de propóleo, Hipoclorito de sodio, Concentración mínima inhibitoria, concentración mínima bactericida.

ABSTRACT

Objective: The objective of this research work was to compare the in-vitro antibacterial effect of hydro-alcoholic extract of propolis and sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* strain.

Methods: This experimental study was done in order to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of propolis hydro-alcoholic extract and the sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis*, using the optical turbidity technique. Later on, the work was done with 55 teeth which were divided into three groups (G1 = 22 teeth, G2 = 22 teeth and G3 = (Control Group) 11 teeth). The teeth were inoculated with *Enterococcus faecalis* and placed in the oven at 37 °C for 24 hours. Then, the G1 teeth were irrigated with 2 ml. of hydro-alcoholic extract of propolis – MBC. The G2 teeth were irrigated with 2 ml. of sodium hypochlorite – MBC, and the G3 (Control Group) teeth were irrigated with 2 ml. of physiological saline. After that, a sample was taken from the inside of each duct by using a sterile paper cone. The samples were placed in test tubes containing Brain Heart Infusion (BHI) and incubated in an oven at 37 ° for 4 days. Then a sample taken from those test tubes was placed in Petri dishes with agar Mueller Hilton and put to incubate in an oven at 37 ° C for 24 hours.

Results: The MIC and MBC of hydro-alcoholic extract of propolis was 10% and the MIC and MBC of sodium hypochlorite was 20%. There was no bacterial growth in the samples G1 and G2. Statistical analysis by the Mann Whitney test found no significant difference ($p = 1.000$) between the G1 and G2.

Conclusion: There is no difference between the antibacterial effects of hydro-alcoholic extract of propolis and sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis*.

Keywords: antibacterial effect, propolis hydro-alcoholic extract, sodium hypochlorite, Minimum Inhibitory Concentration, Minimum Bactericidal Concentration.

1. INTRODUCCIÓN

La composición de la flora bacteriana en los conductos radiculares necróticos es afectada por varios factores locales: la cantidad de oxígeno en el canal radicular, acceso y disponibilidad de los nutrientes, sinergismo bacteriano y sistema de defensa del huésped. En la periodontitis apical la ecología bacteriana puede ser puramente anaerobia, pero puede estar en muchos casos acompañada de bacterias facultativas. En dientes previamente endodonciados y con periodontitis apical, la ecología puede ser un poco diferente, y en muchos casos el medio ambiente no es sólo dominado por las bacterias anaerobias. La especie más comúnmente encontrada en dientes previamente endodonciados con periodontitis apical es *Enterococcus faecalis*.¹⁻³

El *Enterococcus faecalis* está implicado en la persistencia de infecciones, incluyendo en el pronóstico del tratamiento de conductos radiculares.^{4,5} De hecho, esta bacteria se ha aislado en periodontitis apicales crónicas y parece ser la responsable de muchos fracasos endodónticos.⁶⁻⁸

El *Enterococcus faecalis* es una especie del género *Enterococcus* que según la clasificación de Lancefield forma parte de los Estreptococos del grupo D; es anaerobio facultativo, grampositivo, presenta tolerancia de crecimiento en 6.5% de Cloruro de Sodio, se puede cultivar en agar sangre y en agar soya-tripticosa y se transmite de persona a persona o a través del consumo de agua o alimentos contaminados.⁹⁻¹²

El *Enterococcus faecalis* es una de las especies enterocócicas más frecuentes de la patología humana. Se asocian en parejas y cadenas cortas, estando su virulencia

especialmente ligada a su cápsula polisacárida. Son resistentes a la clindamicina, lincomicina, gentamicina, kanamicina, estreptomicina e hidróxido de calcio, siendo sensibles a otros antibióticos y a la clorhexidina.¹³⁻¹⁵

El *Enterococcus faecalis* tiene la habilidad de crecer en un pH de 9.6, este pH normalmente inhibe el crecimiento de otras bacterias.¹⁶

Sundqvist y col. encontraron numerosas especies de bacterias anaerobias en conductos radiculares donde el tratamiento de endodoncia había fallado. Algunas de estas bacterias eran *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus anginosus*, *Bacteroides fragilis* y *Fusobacterium nucleatum*. De todos estos casos, *Enterococcus faecalis* fue la bacteria más prevalente (38% de los casos) lo cual indica que esta bacteria es un agente causal importante de las fallas del tratamiento endodóntico.¹⁷

Una vez que las bacterias se han establecido dentro del conducto radicular no pueden ser eliminadas por los mecanismos de defensa del huésped, así que las infecciones de origen pulpar son tratadas principalmente mediante procedimientos químico-mecánicos.⁴

El objetivo del ensanchamiento del conducto es la eliminación del tejido pulpar y/o bacterias para proporcionar condiciones adecuadas para la obturación del conducto, resultando en un medio más favorable para la regeneración de los tejidos periapicales.¹⁸

La instrumentación por sí misma no es suficiente para conseguir dicho objetivo, por tanto, se utilizan agentes químicos para completar la limpieza del conducto.¹⁹⁻²¹

Para que estos irrigantes o agentes químicos sean eficaces deben cumplir una serie de condiciones como son la capacidad de disolver tejido orgánico tanto vital como necrótico, capacidad bactericida, proporcionar lubricación y hacer fluir hacia fuera del conducto radicular los detritus formados durante la instrumentación.¹⁹⁻²¹

Actualmente el irrigante de elección es el hipoclorito de sodio, propuesto a diferentes concentraciones debido a su capacidad bactericida y de disolución de tejido tanto vital como necrótico.^{22,23} Cunningham y col. en 1980 propusieron al hipoclorito de sodio como el irrigante más eficaz.²⁴

Sin embargo una de las características del irrigante ideal es que no sea tóxico y es en ese punto donde el hipoclorito de sodio tiene su mayor inconveniente, ya que se han descrito problemas como dolor severo inmediato, edema de los tejidos blandos y equimosis en caso de su extrusión a los tejidos periapicales.^{25, 26}

Actualmente se considera al hipoclorito de sodio como la solución que tiene un gran poder bactericida contra el *Enterococcus faecalis*.²⁷

En un estudio realizado por Pardina y col. observaron que un 83.3% de los dientes inoculados con el microorganismo *Enterococcus faecalis* y tratados con hipoclorito de sodio al 4% quedaron libres de bacterias.²⁷

Gómez y col. obtuvieron un 100% de efectividad para todas las concentraciones de hipoclorito de sodio (desde 0.5% hasta 5.25%) a diferentes tiempos de contacto, en la eliminación de *Enterococcus faecalis*, observando también que el hipoclorito de sodio al 4% eliminaba al *Enterococcus faecalis* en 5 minutos.²²

Spratt, obtuvo un 100% de efectividad del hipoclorito de sodio al 2.25% frente a *Enterococcus faecalis* con un modelo de estudio de biofilms aislados de los conductos radiculares.²⁸

La apicultura como rama de la ciencia se practica desde tiempos inmemoriales. En el Papiro de Ebers, ya se hacía referencia a las acciones del propóleo, cuyo nombre significa como un escudo o muralla de la ciudad.²⁹

El propóleo se utiliza desde hace, por lo menos, 3.000 años. Los sacerdotes del antiguo Egipto lo conocían como medicina y como ungüento o crema para embalsamar. De hecho, lo empleaban para "conservar" las vísceras de los faraones. Más tarde lo utilizaron los griegos como remedio para las infecciones de la piel, llagas y supuraciones. Aristóteles habla de él en su historia de animales. También fue aplicado por los Incas en cuadros de infecciones febriles, y por los franceses en los siglos XVI y XVIII en el tratamiento de heridas.³⁰

Su máxima utilización se dio durante la Guerra de los Boers, en África del Sur (antes de la Primera Guerra Mundial), alrededor del año 1900, en el tratamiento de heridas infectadas y como sustancia cicatrizante y su utilización se ha mantenido hasta llegar a nuestros días.^{29, 30}

El propóleo ha sido utilizado por diversas culturas con diferentes utilidades, pero con el posterior desarrollo de la química farmacéutica, el propóleo dejó prácticamente de utilizarse.^{31, 32}

El nombre de propóleo proviene del griego *propolis* (pro: delante o en defensa de, y polis: ciudad o delante de la ciudad o de la colmena). De ahí paso al latín **propolis**, que significa tapar o alisar. En español es denominado propóleo y también propóleos, ambos términos son aceptados y ampliamente utilizados, aunque la tendencia es a preferir propóleo, este es de mayor uso en América Latina.³⁰⁻³²

El propóleo es una resina cerosa de composición compleja y consistencia viscosa que las abejas elaboran y utilizan en la construcción, reparación, aislamiento y protección de la colmena.³¹

Las abejas (*Apis mellifera*) recogen con sus mandíbulas partículas resinosas de las yemas, brotes y peciolas de las hojas de diferentes vegetales (olmo, álamo, sauce, abedul, pino, abeto, roble y algunas herbáceas), que una vez en la colmena, mezclan con cera y secreciones salivares para obtener el propóleo, cuya producción anual (10-300 gr/colmena) difiere en función de la variedad de abejas, el clima, la flora y el dispositivo de recogida.³³

El propóleo presenta una consistencia variable, dependiendo de su origen y de la temperatura. Hasta los 15°C es duro y se torna más maleable a medida que aumenta la temperatura. Su punto de fusión varía entre 64°C. a 89.5°C, llegando en algunos casos hasta 100°C. Su color también es variable, de amarillo claro a marrón oscuro, pasando por una gran cantidad de tonos castaños.³⁴

La composición del propóleo es muy compleja y variada en función de la diversidad fitogeográfica de las zonas de recolección, se han detectado más de 180 compuestos,

sus principales componentes son resinas y bálsamos que contienen flavonoides y ácidos fenólicos o sus ésteres (50%), contenidos muy variables de ceras (7.5-35%) que afectaran a los correspondientes restantes componentes; aceites volátiles (10%), polen (5%) e impurezas (4.4-19.5%). Además tienen pequeñas cantidades de terpenos, taninos, restos de la secreción de las glándulas salivales de las abejas y posibles contaminantes. Los componentes activos son los flavonoides que incluyen flavonas, flavonoles, flavononas y flavononoles. Los compuestos fenólicos son también compuestos bioactivos del propóleo, los que se encuentran con más frecuencia son: ácido caféico, isoferúlico, cinámico, benzoico y algunos de sus ésteres.³⁰⁻³⁸

El propóleo es un producto de importante interés para la medicina por sus efectos antiinflamatorios, inmunoestimulantes, hepatoprotectores, carcinoestáticos, antimicrobianos, antivirales, antifúngicos, antiprotozoarios, anestésicos y de regeneración tisular.³⁹⁻⁴²

El secreto del uso del propóleo, radica en sus propiedades antimicrobianas, bacteriostático y bactericida, proporcionadas por los ácidos benzoicos, oxibenzoico, metoxibenzoico, caféico, ferúlico, los sesquiterpenos y las flavononas (principalmente la galangina). La actividad antibacteriana del propóleo es mucho más notable sobre las bacterias grampositivas que sobre las gramnegativas, pero con ambos tipos de bacterias tiene una acción superior que los antibióticos cloranfenicol, eritromicina, estreptomycin, penicilina, ceforán, terramicina, kanamicina, ampicilina y los antisépticos cetavión al 1%, tintura de timerosal al 0.1%, cloruro de benzalconio a 1:1000.⁴⁰⁻⁴²

Se han reportado algunos mecanismos de la actividad del propóleo sobre el crecimiento bacteriano: inhibición de la división celular, colapso del citoplasma, membrana celular y pared bacteriana, bacteriólisis e inhibición de la síntesis de proteínas.⁴³ Los componentes cinámicos y flavónicos del propóleo, que alteran las membranas e inhiben la motilidad bacteriana, probablemente contribuyen a esta acción y al sinergismo observado con algunos antibióticos.^{40, 41}

Kujumgiev et al. concluyen, que si bien cada uno de los componentes del propóleo puede presentar una buena actividad, ninguno de ellos individualmente presenta una actividad mayor que la mezcla de todos ellos formando el propóleo.⁴⁴ Además, independiente del origen geográfico de la muestra, todos los propóleos presentan una actividad microbiológica bastante similar, por lo que el propóleo tiene un gran valor como la mezcla de compuestos que es, y no como una fuente para el descubrimiento de un nuevo y poderoso compuesto con actividad antibacteriana, antifúngica o antiviral.⁴⁵

El propóleo es relativamente atóxico, dosis diarias de 1400 mg/Kg no causa ningún efecto negativo en ratones, aunque masticar grandes cantidades de propóleo en bruto puede causar náuseas y trastornos digestivos, a los apicultores a menudo les produce dolor de cabeza al inspeccionar las colmenas y no son infrecuentes las reacciones alérgicas, en particular al cafeato de isoprenilo.^{35, 36}

En particular, la actividad biocida del propóleo estudiada frente a bacterias de interés en medicina, ha mostrado resultados alentadores *in vitro* e *in vivo*, ya que inhibió el crecimiento de bacterias aerobias y anaerobias, tanto grampositivas como gramnegativas.⁴⁰

En odontología, desde la antigüedad, el propóleo se ha utilizado en Europa y norte de África para el tratamiento de las infecciones de boca y garganta, así como de la caries. Actualmente, el propóleo se usa en odontología como barniz, en caso de alveolitis, como sedante, como irrigante de conductos (diluido en agua destilada), para tratar fístulas (extracto al 5%), después del destartraje, como control de placa, en estomatitis subplaca, gingivitis, aftas recubrimiento pulpar.^{46,47}

En un estudio en el cual se evaluó la actividad antimicrobiana de cuatro diferentes tipos de propóleo de Turquía en diferentes microorganismos, la concentración mínima inhibitoria (CMI) determinada para el propóleo contra *Enterococcus faecalis* fue de 2 µg/mL.⁴⁸

Debido a que el *Enterococcus faecalis* es considerado el principal microorganismo de los fracasos endodónticos, es que se han realizado varios estudios con la finalidad de encontrar una sustancia que sea capaz de eliminarlo. El hipoclorito de sodio es considerado el irrigante de elección actualmente por poseer gran poder bactericida contra este germen, pero tiene efectos tóxicos indeseables. Lo cierto es que aún no se ha encontrado la sustancia ideal que controle esta bacteria, y más aún que no presente efectos tóxicos.

En base a los antecedentes presentados sobre el gran efecto antibacteriano y escasa o nula toxicidad que posee el propóleo, es que nace la inquietud de realizar el presente estudio, que pretende comparar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroalcohólico de propóleo y del hipoclorito de sodio en piezas dentarias contaminadas con *Enterococcus faecalis*, siendo el primer gran paso en un sin número de

investigaciones que se pueden realizar en el ámbito odontológico con el propóleo debido a sus excelentes propiedades y sustancias componentes que posee. Además contribuir, luego de posteriores estudios *in vivo*, a obtener una alternativa de solución en la terapéutica endodóntica y de esta manera mejorar la salud de los pacientes que son los directos beneficiarios de las virtudes de la investigación científica.

1.1 PROBLEMA:

¿Cuál es el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroalcohólico de propóleo e hipoclorito de sodio frente a *Enterococcus faecalis*?

1.2 HIPÓTESIS:

El extracto hidroalcohólico de propóleo tiene mayor efecto antibacteriano *in vitro* que el hipoclorito de sodio frente a *Enterococcus faecalis*.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroalcohólico de propóleo e hipoclorito de sodio frente a *Enterococcus faecalis*.

1.3.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

1. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) del extracto hidroalcohólico de propóleo e hipoclorito de sodio frente a *Enterococcus faecalis*.
2. Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroalcohólico de propóleo e hipoclorito de sodio frente a *Enterococcus faecalis*.

3. Comparar el efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroalcohólico de propóleo e hipoclorito de sodio frente a *Enterococcus faecalis*.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 TIPO Y ÁREA DE ESTUDIO

El presente trabajo siguió un diseño de investigación básica, de acuerdo al fin que persigue, y experimental de acuerdo a la interferencia del investigador en el fenómeno que se analizó, y se realizó en los siguientes ambientes:

Extracción de propóleo: Laboratorio de Tecnología Farmacéutica. Departamento de Farmacotécnica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo.

Determinación de la CMI y CMB: Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Privada Antenor Orrego de Trujillo.

Preparación y sembrado de la bacteria: Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Privada Antenor Orrego de Trujillo.

Preparación de los dientes: Consultorio Odontológico particular Sito: Calle Nicolás Rebaza N° 606 Urb. Las Quintanas-Trujillo.

2.2 DEFINICIÓN DE LA POBLACIÓN OBJETIVO

Piezas dentarias unirradiculares permanentes humanas extraídas.

Criterios de inclusión:

- Pieza dentaria con ápice completo.
- Pieza dentaria que presenten un conducto radicular.

Criterios de exclusión:

- Pieza dentaria con tratamiento de endodoncia previo.
- Pieza dentaria con calcificación del conducto radicular.

Criterios de eliminación:

-Pieza dentaria que durante el experimento sufran algún percance en la preparación biomecánica.

2.3 DISEÑO ESTADÍSTICO DEL MUESTREO

2.3.1 Unidad de Análisis:

Pieza dentaria inoculada con *Enterococcus faecalis* e irrigada con las sustancias en estudio

2.3.2 Unidad de Muestreo:

Pieza dentaria inoculada con *Enterococcus faecalis* e irrigadas con las sustancias en estudio.

2.3.3 Tamaño muestral:

La muestra estuvo conformada por 22 unidades experimentales por grupo, que cumplieron los criterios de inclusión y exclusión establecidos.

Se consideró una confianza del 95%.

Para la presente investigación se utilizó la siguiente fórmula:

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 (p_1 q_1 + p_2 q_2)}{(p_1 - p_2)^2}$$

Donde:

$Z_{\alpha/2} = 1.96$ Para un nivel de confianza del 95%

$Z_{\beta} = 0.84$ Para una potencia de 80%

$p_1 = 0.167$

$p_2 = 0.5$

n = 21,89

n = 22

2.4. MÉTODOS Y TÉCNICAS

1. Preparación de los Dientes, Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida del Extracto de Propóleo e Hipoclorito de sodio.

1.1 Desinfección y conservación de dientes humanos extraídos.

Los 55 dientes extraídos fueron hervidos en un recipiente con tapa durante 30 minutos en 1 litro de una solución en proporción 1:1 de agua corriente e hipoclorito de sodio al 5,25%. Luego se lavaron con cepillo y detergente para eliminar los posibles restos de tejido adheridos, se enjuagaron con agua corriente y se les dejó secar sobre papel absorbente. Se conservaron las piezas dentarias sumergidas en una solución en proporción 1:1 de alcohol etílico de 90° y de glicerina hasta su posterior utilización.⁴⁹

1.2 Preparación de los dientes para la inoculación.

Los 55 dientes fueron descoronados con un disco de diamante a baja velocidad y se les tomó una radiografía periapical. Luego se permeabilizó el conducto con una lima K N° 10 Maillefer y se determinó la longitud de trabajo a 0.5 mm del punto donde se observó la lima emerger del ápice. Todos los dientes fueron instrumentados con la técnica Crown-Down.

Se usó las fresas Gates- Glidden Maillefer N° 2 y 3 para el tercio coronal y se siguió la instrumentación con las limas K –Flexofile Maillefer N° 40, 35, 30 y 25 hasta que se llegó a la longitud de trabajo. Se recapituló la secuencia hasta que la lima N° 35 alcanzó la longitud total de trabajo. Durante la

instrumentación se mantuvo permeable el foramen apical verificándose con una lima K N°10 Maillefer.

Durante la instrumentación todos los dientes se irrigaron con agua destilada. Para estandarizar el estudio se realizó el calibrado apical de todos los dientes con una lima K- Flexofile Maillefer N° 35. Luego todos los dientes se irrigaron con ácido etilendiaminotetracético (EDTA) durante 1 minuto, seguido de hipoclorito de sodio al 5% durante 1 minuto más.

Posteriormente se procedió a secar los conductos con conos de papel N° 35 Maillefer. Luego se sellaron los ápices de todos los dientes con ionómero de vidrio para restauración (Vitremer 3M) y se colocaron en frascos de penicilina esterilizados, para ser esterilizados en un autoclave a 121° durante 20 minutos posteriormente.

1.3 Obtención del extracto de propóleo.

El propóleo en estado bruto se enfrió hasta 0 °C, luego se pesó 20 gramos, el cual se transfirió a un matraz balón de 250 ml y se le añadió 200 ml de etanol al 80% sometiéndose a reflujo en equipo Soxhlet durante una hora, al cabo de este tiempo se detuvo y se filtró a través de papel filtro Whatman No.40, se separó el filtrado y el sólido residual se sometió nuevamente a reflujo con 200 ml del solvente correspondiente, el nuevo filtrado que se obtuvo se reunió con el anterior, siendo este el extracto total final.

Los extractos totales finales se transfirieron al matraz de un rotavapor tipo Büchi y se mantuvo en evaporación hasta la desaparición del solvente. El

sólido que se obtuvo se sometió a secado en estufa a 70 °C durante 2 horas, para obtener el denominado extracto blando total.⁵⁰

1.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y

Concentración Mínima Bactericida (CMB) del Extracto de Propóleo.

Se preparó un tubo control en el cual no se sembró la suspensión bacteriana. Este tubo control contenía BHI, y la preparación de este medio de cultivo fue 40gr. de BHI en 1000 ml. de agua destilada, se calentó hasta su disolución y luego se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 atmósferas de presión por 15 minutos.

Luego se preparó en una serie de 10 tubos 5 ml de caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) cada uno, luego se agregó diferentes concentraciones de propóleo al 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% y 80% respectivamente de la solución madre. Después se les inoculó a todos los tubos 20 µl. de la suspensión bacteriana *Enterococcus faecalis*, equivalente al tubo N° 1 del nefelómetro de Mac Farland, y se incubó a 37 °C durante 24 horas. La CMI se determinó en el tubo que no se observó crecimiento bacteriano.⁵¹

Luego del tubo que contenía la CMI, se procedió a sembrar en placas petri con agar Muller Hilton, para determinar la CMB, y se incubó a 37°C por 24 horas.

1.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y

Concentración Mínima Bactericida (CMB) del Hipoclorito de Sodio.

Se preparó un tubo control en el cual no se sembró la suspensión bacteriana.

Este tubo control contenía BHI, y la preparación de este medio de cultivo fue 40gr. de BHI en 1000 ml. de agua destilada, se calentó hasta su disolución y luego se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 atmósferas de presión por 15 minutos.

Luego se preparó en una serie de 10 tubos 5 ml de caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) cada uno, luego se agregó diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio al 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% y 80% respectivamente de la solución madre. Después se les inoculó a todos los tubos 20 µl. de la suspensión bacteriana *Enterococcus faecalis*, equivalente al tubo N° 1 del nefelómetro de Mac Farland, y se incubó a 37 °C durante 24 horas. La CMI se determinó en el tubo que no se observó crecimiento bacteriano (51).

Luego del tubo que contenía la CMI, se procedió a sembrar en placas petri con agar Muller Hilton, para determinar la CMB, y se incubó a 37°C por 24 horas.

2. Inoculación Bacteriana en los dientes estériles

Los conductos radiculares de los 55 dientes fueron inoculados con 10µL de la suspensión de *Enterococcus faecalis* usando como referencia el Tubo N°1 del nefelómetro de Mac Farland. Se usó una jeringa de tuberculina de 1ml estéril; luego se introdujo una lima K N° 10 Maillefer en el conducto realizando movimientos de bombeo para conseguir una completa colonización bacteriana del conducto.

Posteriormente, los dientes fueron puestos en placas petri en la estufa a 37°C por 24 horas para su respectiva incubación.

3. Tratamiento de los dientes con las diferentes soluciones propuestas

Los 55 dientes inoculados con la suspensión bacteriana fueron divididos en 03 grupos: Grupo I (22 dientes), grupo II (22 dientes) y grupo III (11 dientes).

3.1. Tratamiento de los dientes del Grupo I con extracto hidroalcohólico de Propóleo a la CMB determinada:

Los conductos radiculares de los 22 dientes fueron irrigados con 2 ml de propóleo al 10% por un tiempo de 5 minutos, usando una jeringa estéril de polipropileno de 1 ml con una aguja estéril de 25 G de calibre y activado el irrigante con una lima K N° 10 por 1 minuto.

Después se introdujo en el conducto radicular un cono de papel N° 35 Maillefer estéril, para obtener muestras del interior de cada conducto.

Inmediatamente, los conos de papel fueron colocados en tubos de ensayo que contuvieron 5 ml de caldo BHI para ser incubados en una estufa a 37° C durante 4 días para observar si existe o no crecimiento bacteriano.

Después de pasado el tiempo de incubación se procedió a sembrar con el asa bacteriológica de los tubos con medio BHI en placas petri con agar Muller Hilton usando el método del estriado, para ser puestos en la estufa a 37°C por 24 horas, y así corroborar los resultados descritos en medio líquido.

3.2 Tratamiento de los dientes del Grupo II con Hipoclorito de sodio a la CMB determinada:

Los conductos radiculares de los 22 dientes fueron irrigados con 2 ml de hipoclorito de sodio al 20% por un tiempo de 5 minutos, usando una

jeringa estéril de polipropileno de 1 ml y con una aguja 25 G de calibre estéril y activado el irrigante con una lima K N° 10 por 1 minuto.

Después se introdujo en el conducto radicular un cono de papel N° 35 Maillefer estéril, para obtener muestras del interior de cada conducto.

Inmediatamente, los conos de papel fueron colocados en tubos de ensayo que contuvieron 5 ml de caldo BHI para ser incubados en una estufa a 37° C durante 4 días para observar si existe o no crecimiento bacteriano.

Después de pasado el tiempo de incubación se procedió a sembrar con el asa bacteriológica de los tubos con medio BHI en placas petri con agar Muller Hilton usando el método del estriado, para ser puestos en la estufa a 37°C por 24 horas, y así corroborar los resultados descritos en medio líquido.

3.3 Tratamiento de los dientes del Grupo III con Solución Salina Fisiológica (Control).

Los conductos radiculares de los 11 dientes fueron irrigados con 2 ml de solución salina fisiológica estéril por un tiempo de 5 minutos, usando una jeringa estéril de polipropileno de 2 ml y con una aguja Endo-Luer estéril, a 1mm del punto donde se encaja la aguja en el conducto.

Después se introdujo en el conducto radicular un cono de papel N° 35 Maillefer estéril, para obtener muestras del interior de cada conducto.

Inmediatamente, los conos de papel fueron colocados en tubos de ensayo que contuvieron 5 ml de caldo BHI para ser incubados en una estufa a 37° C durante 4 días para observar si existe o no crecimiento bacteriano.

Después de pasado el tiempo de incubación se procedió a sembrar con el asa bacteriológica de los tubos con medio BHI en placas petri con agar Muller Hilton usando el método del estriado, para ser puestos en la estufa a 37°C por 24 horas, y así corroborar los resultados descritos en medio líquido.

2.5 REGISTRO DE LA INFORMACIÓN

2.5.1 Instrumento de Recolección de Datos

La información recolectada se registró en una ficha (Anexos N° 1 al 5) confeccionada especialmente para el presente trabajo de acuerdo a los objetivos planteados en el estudio.

2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se aplicó la prueba de kruskall Wallis para comparar las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de propóleo e hipoclorito de sodio basada en rangos promedios.

Se aplicó también la prueba de Mann Whitney para comparar el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de propóleo e hipoclorito de sodio.

Se trabajó a un nivel de significancia del 5%.

2.7 VARIABLES DEL ESTUDIO

a. Solución Irrigante:

Definición Operacional: Se categorizará de la siguiente manera:

- Propóleo (CMB a determinar)
- Hipoclorito de Sodio (CMB a determinar)

- Solución Salina Fisiológica

b. Efecto antibacteriano:

Definición Operacional: Existencia de turbidez óptica en tubo de ensayo:

- Crecimiento (+)

- Inhibición (-)

3. RESULTADOS

El efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroalcohólico de propóleo e hipoclorito de sodio frente a la cepa *Enterococcus faecalis* se determinó a través del crecimiento e inhibición de la suspensión bacteriana de *Enterococcus faecalis*.

En la concentración de 10% de extracto hidroalcohólico de propóleo se inhibió el crecimiento bacteriano, no habiendo crecimiento en las siguientes concentraciones mayores, lo que indica que la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida del extracto hidroalcohólico de propóleo frente a *Enterococcus faecalis* es 10%. (Tabla N°1)

En la concentración de 20% de hipoclorito de sodio se inhibió el crecimiento bacteriano, no habiendo crecimiento en las siguientes concentraciones mayores, lo que indica que la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida del hipoclorito de sodio frente a *Enterococcus faecalis* es 20%. (Tabla N°2)

Se observó crecimiento bacteriano en concentraciones del 1% y 5% del extracto hidroalcohólico de propóleo, determinando la prueba de Kruskal Wallis, basada en rangos promedios, diferencia estadística significativa entre las concentraciones del extracto de propóleo ($P=0.000<0.05$). Específicamente se encontró mediante la prueba de Mann Whitney, diferencias de crecimiento entre las concentraciones del 1% y 5% frente a las otras concentraciones. (Tabla N°1)

Asimismo, el análisis estadístico de las diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio frente a *Enterococcus faecalis*, según la prueba de Kruskal Wallis, determinó que existe diferencia significativa entre las concentraciones de hipoclorito de sodio ($P=0.000<0.05$) encontrándose específicamente, mediante la prueba de Mann Whitney,

diferencias de crecimiento entre las concentraciones del 1%, 5% y 10% frente a las otras concentraciones (P=0.000). (Tabla N°2)

La prueba de Mann Whitney determinó que no hay diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones del 10% del extracto hidroalcohólico de propóleo y el 20% de hipoclorito de sodio (P=1.000), pero si hay diferencia significativa entre estas concentraciones y la solución salina respecto al efecto antibacteriano de estas sustancias frente al *Enterococcus faecalis* (P=0.000). (Tabla N°3)

TABLA 1**Determinación de la concentración mínima inhibitoria del extracto de propóleo frente a la bacteria *Enterococcus faecalis***

Muestra	Concentración propóleo (%)									
	1	5	10	20	30	40	50	60	70	80
1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Rango promedio	45.50	45.50	20.50	20.50	20.50	20.50	20.50	20.50	20.50	20.50
Chi-cuadrado	49.000									
P	0.000									
Mann-Whitney: p	B	b	A	a	a	a	a	a	a	a

TABLA 2**Determinación de la concentración mínima inhibitoria del hipoclorito de sodio frente a la bacteria *Enterococcus faecalis***

Muestra	Concentración hipoclorito (%)									
	1	5	10	20	30	40	50	60	70	80
1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Rango promedio	43	43	43	18	18	18	18	18	18	18
Chi-cuadrado	49.000									
P	0.000									
Mann-Whitney: p	B	B	b	a	a	a	a	a	a	a

TABLA 3

Crecimiento de *Enterococcus faecalis* en conductos radiculares de dientes estériles irrigados con extracto de propóleo e hipoclorito de sodio.

Muestra	Concentración de propóleo	Hipoclorito	Solución salina
	10%	20%	9%
1	-	-	+
2	-	-	+
3	-	-	+
4	-	-	+
5	-	-	+
6	-	-	+
7	-	-	+
8	-	-	+
9	-	-	+
10	-	-	+
11	-	-	+
12	-	-	
13	-	-	
14	-	-	
15	-	-	
16	-	-	
17	-	-	
18	-	-	
19	-	-	
20	-	-	
21	-	-	
22	-	-	
Rango promedio	22.5	22.5	
Mann-Whitney		242	
Z		0.000	
P		1.000	
Mann-Whitney	0.000	0.000	
Z	-5.657	-5.657	
P	0.000	0.000	

4. DISCUSIÓN

En dientes previamente endodonciados y con periodontitis apical la ecología bacteriana puede ser puramente anaerobia, pero en muchos casos puede estar acompañada de bacterias facultativas como el *Enterococcus faecalis* que es la especie más comúnmente encontrada e implicada en la persistencia de infecciones, provocando el fracaso del tratamiento endodóntico.¹⁻⁵

Una vez que las bacterias se han establecido dentro del conducto radicular no pueden ser eliminadas por los mecanismos de defensa del huésped, así que las infecciones de origen pulpar son tratadas principalmente mediante procedimientos químico-mecánicos.⁴

Actualmente la sustancia química o irrigante de elección es el hipoclorito de sodio debido a su gran capacidad bactericida, teniendo un gran poder sobre el *Enterococcus faecalis*.^{22,23,27}

Sin embargo una de las características del irrigante ideal es que no sea tóxico y es en ese punto donde el hipoclorito de sodio tiene su mayor inconveniente, ya que se han descrito problemas como dolor severo inmediato, edema de los tejidos blandos y equimosis en caso de su extrusión a los tejidos periapicales.^{25, 26}

La apicultura es una rama de la farmacognosia que se aplica desde tiempos inmemoriales (29), pero actualmente el estudio y uso de sustancias naturales para el tratamiento de patologías está tomado más interés en los científicos a nivel mundial.

El secreto del uso del propóleo, radica en sus propiedades antimicrobianas, bacteriostático y bactericida, proporcionadas por los ácidos benzoicos, oxibenzoico, metoxibenzoico, caféico, ferúlico, los sesquiterpenos y las flavononas (principalmente la galangina). La actividad antibacteriana del propóleo es mucho más notable sobre las

bacterias grampositivas que sobre las gramnegativas, pero con ambos tipos de bacterias tiene una acción superior que los antibióticos cloranfenicol, eritromicina, estreptomina, penicilina, ceforán, terramicina, kanamicina, ampicilina y los antisépticos cetavión al 1%, tintura de timerosal al 0.1%, cloruro de benzalconio a 1:1000.^{40, 41, 42}

En el presente estudio se determinó el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de propóleo y del hipoclorito de sodio frente a la bacteria *Enterococcus faecalis* mediante el crecimiento o inhibición de la cepa utilizando el método de turbidez óptica.

En primer lugar se determinó la CMI del extracto hidroalcohólico de propóleo y del hipoclorito de sodio en tubos de ensayo mediante la presencia de turbidez óptica, y ello luego fue corroborado en placas Petri para determinar la CMB.

En segundo lugar se formaron 3 grupos experimentales, en el grupo 1, conformado por 22 dientes, se les agregó el extracto hidroalcohólico de propóleo al 10% (CMB determinada) y una suspensión de *Enterococcus faecalis* acorde al tubo n°1 de la escala de Mac Farland, no habiendo crecimiento bacteriano en los 22 dientes, al grupo 2 conformado también por 22 dientes, se les agregó hipoclorito de sodio al 20% (CMB determinada) y una suspensión de *Enterococcus faecalis* acorde al tubo n°1 de la escala de Mac Farland y tampoco se observó crecimiento bacteriano en los 22 dientes. El grupo 3 (control) estuvo conformado por 11 dientes a los cuáles se les agregó suero fisiológico y suspensión de *Enterococcus faecalis* acorde al tubo n° 1 de la escala de Mac Farland, observándose crecimiento bacteriano en todos los dientes, esto puede deberse a que el suero es considerado nutriente para la bacteria.

Respecto a los resultados obtenidos con el extracto hidroalcohólico de propóleo, los nuestros concuerdan con los de Jahromi y col., quienes demostraron que los diferentes

tipos de propóleo que estudiaron tuvieron efecto antibacteriano frente al *Enterococcus faecalis*.⁵²

Nuestros resultados concuerdan también con los obtenidos por Kandaswamy y col. quienes concluyeron que el propóleo tiene efecto antibacteriano contra el *E. faecalis*, pero a diferencia nuestra, ellos estudiaron el efecto en modelos de dentina infectada observadas con microscopio electrónico, considerado actualmente un método más exacto, y no mediante turbidez óptica como el presente trabajo.⁵³

En nuestro estudio encontramos que la CMI del extracto de propóleo fue 10%, lo que difiere del estudio de Moroni y col. quienes encontraron que fue el 0.8%, el método que ellos utilizaron fue el de halos de inhibición y nosotros el de turbidez, pero a pesar de los diferentes métodos empleados y las diferentes CMI encontradas, nuestros resultados concuerdan con los de ellos respecto a que el propóleo presenta efecto antibacteriano frente a la cepa estudiada.⁵⁴

Sin embargo, Lima y col. encontraron que el propóleo aún a una concentración del 50% no tenía efecto antibacteriano frente al *Enterococcus faecalis*. La diferencia de estos resultados con los nuestros pueden deberse a que las propiedades del propóleo difieren según su origen geográfico.⁵⁵

Respecto a los resultados obtenidos con el hipoclorito de sodio, los nuestros concuerdan con los de Gómez y col. y Spratt, quienes obtuvieron un 100% de efectividad en todas las concentraciones utilizadas de hipoclorito de sodio frente al *Enterococcus faecalis*.^{22,28}

El hipoclorito de sodio es la sustancia por excelencia utilizada en los tratamientos de conducto debido a su gran efecto antibacteriano, incluyendo el *Enterococcus faecalis*, pero es tóxico e irritante en los tejidos periapicales, debido a ello es que en este estudio

se comparó su efecto antibacteriano con el del propóleo, sustancia con un alto poder bactericida y que es biocompatible. Los resultados estadísticos según la prueba de Mann Whitney, demuestran que no existe una diferencia entre el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de propóleo y el hipocloritpo de sodio frente al *Entrococcus faecalis* ($p=1.000$).

5. CONCLUSIONES

1. La concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida del extracto hidroalcohólico de propóleo frente a *Enterococcus faecalis* fue 10%.
2. La concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida del hipoclorito de sodio frente a *Enterococcus faecalis* fue 20%.
3. El extracto hidroalcohólico de propóleo y el hipoclorito de sodio tienen efecto antibacteriano *in vitro* frente al *Enterococcus faecalis*.
4. No existe diferencia significativa entre el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroalcohólico de propóleo e hipoclorito de sodio frente a *Enterococcus faecalis* ($p=1.000$).

6. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios sobre los tipos de propóleo de las diferentes regiones del Perú para así determinar exactamente sus componentes químicos, ya que éstos difieren según el tipo de clima y de suelo, lo cual afecta sus propiedades.
2. Realizar estudios sobre la preparación de un cemento sellador endodóntico experimental y compararlos con los cementos utilizados actualmente, debido a las propiedades resinosas del propóleo.
3. Realizar estudios comparativos del propóleo y diferentes sustancias naturales contra bacterias del conducto radicular pero en estado biofilm.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Haapasalo M, Endal U, Zandi H, Coil J. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. *Endodontic Topics*. 2005; 10: 77-102.
2. Siren EK, Haapasalo MP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo EN. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int. Endod. J.* 1997; 30: 91-95.
3. Rocas IN, Jung IY, Lee CY, Siqueira JF Jr. Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a South Korean population. *J. Endod.* 2004; 30: 504-508.
4. Siqueira JF, Machado AG, Silveira RM, Lopes HP, De Uzeda M. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal *in vitro*. *Int. Endod. J.* 1997; 30: 279-282.
5. Gomes BPPA, Lilley JD, Drucker DB. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *Int. Endod. J.* 1996; 29: 235-241.
6. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root filled teeth with apical periodontitis. *Int. Endod. J.* 1998; 31: 1-7.
7. Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome endodontic treatment of teeth with periapical periodontitis. *Int Endod J.* 1997; 30: 297-306.
8. Lin LM, Skribner JE, Gaengler P. Factors associated with endodontic treatment failures. *J. Endod.* 1998; 18: 625-627

9. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Faller MA. Microbiología Médica. 4ta Ed. Madrid: Elsevier science; 2002.
10. Koneman EW, Allen SD, Dosel VR, Janda WM, Sommers HM, Winn WC. Diagnóstico Microbiológico. 3ra Ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1992.
11. Portenier I, Tumous MT, Haapasalo M, Haapasalo W. *Enterococcus faecalis* – the root canal survivor and “star” in post – treatment disease. Endod. top. 2003; 6:135-159.
12. [Medinfo.ufl.edu](http://medinfo.ufl.edu) [homepage en Internet]. Florida : University of Florida [Updated: May 13, 1999]. [Revisado el 12 de Diciembre del 2005].
Disponible en:
<http://medinfo.ufl.edu/year2/mmid/bms5300/bugs/strfaeca.html>
13. Nolte W. Microbiología Endodóntica. 4ta Ed. México DF: Editorial Interamericana; 1986.
14. Peset V, Ubeda P, Sarrión A, Perez Belles C, Canton E, Cordoba J. Evolution resistance in the genus *Enterococcus* in strains isolated from blood. Rev Esp Quimioter. 1998; Dec 11(4): 322-326.
15. Liebana J. Microbiología Oral. 2da Ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2002.
16. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. Bergeys manual of determinative bacteriology. 9na Ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1994.
17. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. Oral Surg Oral Pathol Oral Radiol Endod 1998; 85: 86-93.

18. Briseño BM, Wirth R, Hamm G, Standhartinger W. Efficacy of different irrigation methods and concentrations of root canal irrigation solutions on bacteria in the root canal. *Endod. Dent Traumatol.* 1992; 8: 6-11.
19. Ingle JJ; Bakland LK. *Endodoncia*. 4ta Ed. Mexico: McGraw Hill Interamericana; 1996.
20. Weine F. *Tratamiento Endodóntico*. 5ta Ed. Madrid: Harcourt Brace; 1997.
21. Cohen S. *Vias de la Pulpa*. 7ma Ed. Madrid: Harcourt Brace; 1999.
22. Gomes BPFA, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int. Endod. J.* 2001; 34: 124-128.
23. Harrison JW, Wagner GW, Henry CA. Comparison of the antimicrobial effectiveness of regular and fresh scent clirox. *J. Endod.* 1990; 16(7): 328-330.
24. Cunningham WT, Balekjian AY. Effect of temperature on collagen dissolving ability of sodium hypochlorite endodontic irrigant. *Oral Surg.* 1980; 175-177.
25. Hales JJ, Rusell CJ, Everett AP, Moore SH. Treatment of sodium hypochlorite accident during endodontic therapy. *General Dentistry*. May-June 2001; 278-281.
26. Hulsmana M, Nahn W. Complications during root canal irrigation: literature review. *Int Endod J.* 2000; 33: 186-193.
27. Pardina S, Soto C, Duran F, Roig M, Durany N. Efectividad de la clorhexidina y del hipoclorito de sodio en la eliminación de *Enterococcus faecalis in vitro*. *Endodoncia*. Abril-Junio 2004; 2(2): 109-115.
28. Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K. A *in vitro* of the antimicrobial

- efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *Int Endod J.* 2001; 34: 300-307.
- 29.** García B. La apicultura cubana actual y sus perspectivas de desarrollo. Cuba: Economía planificada. Junta Central de Planificación. Enero-marzo. 1990; 10.
- 30.** Barberán F, García V, Oliver P, Ferreres F. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. *Phytochemistry.* 1993; 34:191-6.
- 31.** Farré R y col. El Propólis y la Salud. *Ars. Farmacéutica.* 2004; 45(1): 21-43.
Disponible en:
<http://phramacia.ugr.es/ars/pdf/277.pdf>
- 32.** Propóleo el antibiótico natural.
Disponible en:
<http://www.propoleo.cl/>
- 33.** Pascual C, González R, Torricella R. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *J. Ethnopharmacol.* 1994; 41:9-13.
- 34.** Álvarez J, Granadillo J, Tabio C. La cromatografía en capa delgada como método para la clasificación del propóleo cubano. *Ciencia Tecnología Agrícola. Apicultura* 1985; 5:51-60.
- 35.** Chaillou LL. Estudio del Propóleos de Santiago del Estero. Argentina. *Cienc Tecnol Aliment Campiñas.* 2004; 24(1):11-15.
- 36.** Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie.* 1995; 26: 83-89.

37. Brushi ML, Franco SL, Gremiao MP. Application of an HPLC Method for Analysis of Propolis Extract. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2003; 26(14): 2399-2409.
38. Popova M, Silici S, Kaftanoglu O, Bankova V. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine*. 2005; 12(3): 221-228.
39. Gebara E, Zardetto C, Mayer M. In Vitro" study of the antimicrobial activity of natural substances against *S. mutans* and *S. sobrinus*. *Rev Odontol Univ Sao Paulo*. 1996; 10: 251-256.
40. Quintana J, Rodríguez O, Díaz M, López M. Empleo de la tintura de propóleos al 5% en la cura de heridas sépticas faciales. *Rev Cubana Estomatol*. 1997; 34(1):25-27.
41. Drago L, Mombelli B, Vecchi E, Fascina M, Tocalli M, Gismondo M. In vitro antimicrobial activity of propolis dry extract. *J Chemotherapy*. 2000; 12: 390-395.
42. Stepanovic S, Antic N, Dakic I, Svabic-Vlahovic S. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiol Research*. 2003; 158: 353-357.
43. Takaisi-Kikuni NB, Schilcher H. Electron microscopy and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Médica*. 1994; 60: 222-227.
44. Kujumgiev A, Tsevetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R & Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol*. 1999; 64: 235-240.

45. Ureta E, Montenegro G, Muñoz O, Lemus I. Compuestos bioactivos en propóleos del mediterráneo chileno. Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 2001.
46. Martinez G, Alfonso G, Ortega DL. Efectos curativos de una solución hidroalcohólica de propóleo cubano al 1,5% em la terapêutica periodontal. Revisat Cubana Estomatología. 1992; 29(1): 14-19.
47. Bellón S, Aldama Y, Echarry O. Actualización terapéutica en la aplicación de la Medicina Natural y Tradicional en Estomatología. Literatura para Estudiantes de Estomatología. Página Docencia. 2005.
Disponible en:
http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/pdvedado/actualiz_estomat.pdf
48. Uzel A, Sorkun K, Oncag O, Cogulu D, Gencay O, Salih B. Chemical compositions and antimicrobial activities of tour different Anatolian propolis simples. Microbiol Research. 2005; 160(2): 189-195.
49. Basrani E. Endodoncia Integrada. 1ra Ed. Caracas: Actualidades Médico Odontológicas Latinoamericana; 1999.
50. Álvarez J, Granadillo J, Tabio C. La cromatografía en capa delgada como método para la clasificación del propóleo cubano. Ciencia Tecnología Agrícola. Apicultura. 1985; 5:51-60.
51. Laboratorios Britania. Catálogo 2000. Buenos Aires. Pag: 85-92.
52. Jahromi MZ, Taubayani H, Rezaei M. Propolis: A new alternative for root canal disinfection. Iran Endod J 2012; 7(3): 127-33.
53. Kandaswamy D, Venkateshbabu N, Gogulnath N, Kindo AJ. Dentinal tubule

disinfection with 2% chlorhexidine gel, propolis, morindacitrifolia juice, 2% povidone iodine, and calcium hydroxide. *Int Endod J* 2010; 43: 419-23.

- 54.** Moroni H, Martinez EC, Ramos DP. Antibacterianos naturales orales: Antibacterianos naturales orales. *Rev. UNMSM* 2009; 12(1):25-8.
- 55.** Lima Machado ME de, Di Spagna AS, Rezende EC de, Dos Santos EB. Evaluación in vitro de la actividad antibacteriana del Paramonoclorofenol alcanforado, clorhexidina al 2% y extracto de própolis al 50% sobre tres bacterias encontradas en el interior del canal radicular. *Rev. SEC* 2007; 15: 16-9.

ANEXOS

ANEXO N° 1

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del Extracto Hidroalcohólico de Propóleo

Concentraciones Diferentes del Propóleo (%)	Crecimiento e Inhibición de la Suspensión Bacteriana de <i>Enterococcus faecalis</i> 3x10 ⁸ UFC/ml. (Tubo N°1 de Mc Farland) *
1	Si
5	Si
10	No
20	No
30	No
40	No
50	No
60	No
70	No
80	No

5 placas/concentración

* En todos los tubos se inoculó 20ul de la suspensión bacteriana en 5 ml de Caldo BHI.

ANEXO N° 2

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del Hipoclorito de Sodio

Concentraciones Diferentes del Hipoclorito de Sodio (%)	Crecimiento e Inhibición de la Suspensión Bacteriana de <i>Enterococcus faecalis</i> 3x10 ⁸ UFC/ml. (Tubo N°1 de Mc Farland) *
1	Si
5	Si
10	Si
20	No
30	No
40	No
50	No
60	No
70	No
80	No

5 Placas / concentración

* En todos los tubos se inoculó 20ul de la suspensión bacteriana en 5 ml de Caldo BHI.

ANEXO N° 3

Verificación del crecimiento de *Enterococcus faecalis* en conductos radiculares de dientes estériles irrigados con Extracto Hidroalcohólico de Propóleo al 10% (CMB=CMI)

Números de Piezas Dentarias	Crecimiento (+) o Inhibición (-) de la suspensión de <i>Enterococcus faecalis</i>
01	-
02	-
03	-
04	-
05	-
06	-
07	-
08	-
09	-
10	-
11	-
12	-
13	-
14	-
15	-
16	-
17	-
18	-
19	-
20	-
21	-
22	-

ANEXO N° 4

Verificación del crecimiento de *Enterococcus faecalis* en conductos radiculares de dientes estériles irrigados con Hipoclorito de Sodio al 20% (CMB=CMI)

Números de Piezas Dentarias	Crecimiento (+) o Inhibición (-) de la suspensión de <i>Enterococcus faecalis</i>
01	-
02	-
03	-
04	-
05	-
06	-
07	-
08	-
09	-
10	-
11	-
12	-
13	-
14	-
15	-
16	-
17	-
18	-
19	-
20	-
21	-
22	-

ANEXO N° 5

Verificación del crecimiento de *Enterococcus faecalis* en conductos radiculares de dientes estériles irrigados con Solución salina fisiológica estéril al 9% (SSFE)

Números de Piezas Dentarias	Crecimiento (+) o Inhibición (-) de la suspensión de <i>Enterococcus faecalis</i>
01	+
02	+
03	+
04	+
05	+
06	+
07	+
08	+
09	+
10	+
11	+

ANEXO N° 6

LISTA DE ABREVIATURAS

CMI : Concentración mínima inhibitoria

CMB : Concentración mínima bactericida

BHI : Caldo de infusión cerebro corazón

CONSTANCIA DE ASESORIA DE INFORME DE TESIS

Yo, CARMEN ISOLINA AYALA JARA, Profesora Asociada a Dedicación Exclusiva del Departamento de Farmacotécnica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, doy constancia de haber asesorado el Informe de tesis, para obtener el grado de Magíster en Estomatología, titulado “Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroalcohólico de propóleo e hipoclorito de sodio frente a *Enterococcus faecalis*”, cuyo autor es GLENNY PAOLA ALVARADO CASTILLO, alumna de la Maestría en Estomatología de la Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional de Trujillo.

Dra. Carmen Isolina Ayala Jara