



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

EFICACIA ANTIBACTERIANA DE NANO PARTICULAS DE CHITOSAN,  
PROPÓLEO E HIDRÓXIDO DE CALCIO COMO MEDICAMENTO  
INTRACONDUCTO FRENTE AL ENTEROCOCCUS FAECALIS

**Línea de investigación:**

**Salud pública**

Tesis para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista

**Autora:**

Saldivar Orihuela, Lorena Adelina

**Asesora:**

García Rupaya, Carmen Rosa

ORCID: 0000-0003-0657-6011

**Jurado:**

Medina y Mendoza, Julia Elbia

Quispe Tasayco, Lucia Marisela

Mejía Ticona, Lourdes Alicia

**Lima - Perú**

**2024**



# EFICACIA ANTIBACTERIANA DE NANO PARTICULAS DE CHITOSAN, PROPÓLEO E HIDRÓXIDO DE CALCIO COMO MEDICAMENTO INTRACONDUCTO FRENTE AL ENTEROCOCCUS FAECALIS

## INFORME DE ORIGINALIDAD

13%

INDICE DE SIMILITUD

13%

FUENTES DE INTERNET

1%

PUBLICACIONES

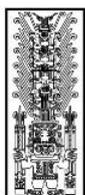
4%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Fuente de Internet	4%
2	<a href="http://tesis.ucsm.edu.pe">tesis.ucsm.edu.pe</a> Fuente de Internet	2%
3	<a href="http://repositorio.unfv.edu.pe">repositorio.unfv.edu.pe</a> Fuente de Internet	1%
4	<a href="http://dspace.ucuenca.edu.ec">dspace.ucuenca.edu.ec</a> Fuente de Internet	1%
5	Submitted to Universidad Nacional Federico Villarreal Trabajo del estudiante	1%
6	<a href="http://repositorio.upao.edu.pe">repositorio.upao.edu.pe</a> Fuente de Internet	1%
7	<a href="http://repositorio.upch.edu.pe">repositorio.upch.edu.pe</a> Fuente de Internet	1%

[repositorio.uwiener.edu.pe](http://repositorio.uwiener.edu.pe)



Universidad Nacional  
**Federico Villarreal**

**VRIN** | VICERRECTORADO  
DE INVESTIGACIÓN

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**EFICACIA ANTIBACTERIANA DE NANO PARTICULAS DE CHITOSAN,  
PROPÓLEO E HIDRÓXIDO DE CALCIO COMO MEDICAMENTO  
INTRA CONDUCTO FRENTE AL ENTEROCOCCUS FAECALIS.**

**Línea de investigación:**

Salud Pública

**Tesis para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista**

**Autora**

Saldivar Orihuela, Lorena Adelina

**Asesora**

García Rupaya, Carmen Rosa

(ORCID: 0000-003-0657-6011)

**Jurado**

Medina y Mendoza, Julia Elbia

Quispe Tasayco, Lucía Marisela

Mejía Ticona, Lourdes Alicia

**Lima- Perú**

**2024**

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, por haberme dado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional, por acompañarme en todo momento y por colocar en el camino aquellas personas anónimas que iluminaron mi camino, acompañándome y siendo mi soporte para alcanzar esta meta.

A mi familia, por haber forjado en mí la persona que soy y por motivarme constantemente a alcanzar mis metas.

A mi asesora Mg. C.D. Carmen García Rupaya por el tiempo prestado para la revisión del presente trabajo de investigación, por haberme guiado y brindado su apoyo en todo momento. A mi Co- asesora Dra. Jessica Astete Medrano, por el tiempo prestado para guiarme bajo su constante supervisión en la ejecución del presente trabajo de investigación.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	vii
ABSTRACT .....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Descripción y formulación del problema.....	2
1.2 Antecedentes .....	3
1.3 Objetivos .....	8
1.3.1 Objetivo General.....	8
1.3.2 Objetivos Específicos.....	9
1.4 Justificación .....	9
1.5 Hipótesis .....	9
II. MARCO TEÓRICO .....	11
2.1 Bases teóricas sobre el tema de investigación .....	11
2.1.1 Enterococcus faecalis.....	11
2.1.2 Medicación intraconducto.....	13
III. MÉTODO .....	20
3.1 Tipo de investigación.....	20
3.2 Ambiente temporal y espacial.....	20
3.2.1 Ámbito temporal .....	20
3.2.2 Ámbito espacial .....	20
3.3 Variables .....	20
3.3.1 Variable independiente .....	20

3.3.2	Variable dependiente .....	20
3.3.3	Operacionalización de las variables.....	20
3.4	Población y muestra.....	22
3.4.1	Población.....	22
3.4.2	Muestra .....	22
3.4.3	Criterios de selección.....	22
3.5	Instrumentos.....	22
3.6	Procedimientos.....	23
3.6.1	Método .....	23
3.6.2	Descripción del procedimiento .....	23
3.7	Análisis de datos .....	26
3.8	Consideraciones éticas .....	27
IV.	RESULTADOS .....	28
V.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	34
VI.	CONCLUSIONES.....	38
VII.	RECOMENDACIONES .....	39
VIII.	REFERENCIAS .....	40
IX.	ANEXOS .....	48

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Estadística descriptiva del halo inhibitorio del quitosan nanopartículas en combinación con el hidróxido de calcio frente al <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 a las 24 horas, 48 y 72 horas .....	28
Tabla 2: Análisis exploratorio de datos de los halos inhibitorios formados por la asociación del hidróxido de calcio con el extracto de propóleo frente al <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 a las 24, 48 y 72 horas.....	29
Tabla 3: Análisis exploratorio de datos de los halos formados por la inhibición de la pasta de Hidróxido de calcio frente al <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 a las 24, 48 y 72 horas.....	30
Tabla 4: Comparación del halo inhibitorio de las sustancias experimentales frente al <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 en un cultivo in vitro.....	31

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribución de los valores del halo inhibitorio usando chitosan nanopartículas en combinación con el hidróxido de calcio frente al <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 en un cultivo in vitro.....	28
Figura 2: Distribución de los valores del halo inhibitorio usando extracto de propóleo al 30% asociado al hidróxido de calcio frente al <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 en un cultivo in vitro.....	30
Figura 3: Distribución de los valores de los halos formados por la inhibición de la pasta de hidróxido de calcio frente al <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 en un cultivo in vitro.....	31
Figura 4: Comparación de los valores del halo inhibitorio de las sustancias experimentales frente al <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 en un cultivo in vitro.....	32

## RESUMEN

**Objetivo:** Comparar la eficacia antibacteriana de la asociación de nanopartículas de quitosan/Hidróxido de Calcio y la asociación del Propóleo/Hidróxido de calcio frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 en un cultivo in vitro. **Método:** Se realizaron pruebas piloto para determinar el tamaño de la muestra. Se liofilizo la cepa en Agar Sangre y se sembró en placas Petri con agar Muller Hinton para evaluar la actividad antibacteriana a través del método Kirby Bauer – modificado. Las sustancias experimentales se dividieron en 5 grupos y colocadas en las placas. Los halos inhibitorios se midieron después de 24, 48 y 72 hrs de incubación a 37°C. **Resultados:** El diámetro de los halos inhibitorios de nanopartículas de quitosan asociado al hidróxido de calcio fueron: 22 mm a las 24hrs, 27 mm a las 48hrs y 27 mm a las 72hrs; respecto a la escala de Duraffourd el efecto antibacteriano fue sumamente sensible (+++); Pasta de Propóleo con hidróxido de calcio: 14 mm a las 24hrs, 16 mm a las 48 y 72hrs; mostrando un efecto antibacteriano sensible (+) en las 24hrs y muy sensible (++) a las 48 y 72hrs según la escala de Duraffourd, el hidróxido de calcio y el control positivo mostraron resultados sumamente sensible (+++) en todos los rangos de tiempo. **Conclusiones:** La asociación de las nanopartículas de quitosan con el hidróxido de calcio presentaron muy buena eficacia antibacteriana frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, sugiriendo ser el inicio de otros estudios, particularmente en casos de infecciones persistentes.

*Palabras clave:* efectividad antibacteriana, nanopartículas de quitosan, propóleo 30%, hidróxido de Calcio, *Enterococcus faecalis*

## ABSTRACT

**Objective:** Compare the antibacterial efficacy of the association of chitosan nanoparticles/Calcium Hydroxide and the association of Propolis/Calcium Hydroxide against *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 in an in-vitro study. **Method:** Pilot tests were carried out to choose the sample size. The strain was lyophilized on Blood Agar and cultured on Petri dishes with Muller Hinton agar to evaluate the antibacterial activity through the modified Kirby Bauer method. The experimental substances were divided into 5 groups and placed on the plates. Inhibitory halos were measured after 24, 48 and 72 hours of incubation at 37°C. **Results:** The diameter of inhibition zone of the chitosan nanoparticles associated with calcium hydroxide were: 22 mm at 24 hours, 27 mm at 48 hours and 27 mm at 72 hours; regarding the Duraffourd scale, the antibacterial effect was extremely sensitive (+++); Propolis paste with calcium hydroxide: 14 mm at 24 hours, 16 mm at 48 and 72 hours, showing a sensitive antibacterial effect (+) at 24 hours and a very sensitive effect (++) at 48 and 72 hours according to the Duraffourd scale, calcium hydroxide and the positive control showed extremely sensitive results (+++) in all time ranges. **Conclusions:** The association of chitosan nanoparticles with calcium hydroxide showed very good antibacterial efficacy against *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, suggesting that it be the beginning of other studies, particularly in cases of persistent infection.

*Keywords:* antibacterial effectiveness, chitosan nanoparticles, propolis 30%, calcium hydroxide, *Enterococcus faecalis*.

## I. INTRODUCCIÓN

La clave del éxito a largo plazo del tratamiento endodóntico está directamente relacionada a la reducción y eliminación de microorganismos dentro del canal interior de las piezas dentales donde se encuentra ubicado la pulpa dental; un conjunto de vasos sanguíneos y nervios que atribuye vitalidad al diente. Estudios reportan que hay entre un 40% y un 60% de bacterias resistentes en los conductos aun incluso después de la irrigación con hipoclorito de sodio. (Teja et al., 2023)

Para ello, se desarrollaron múltiples métodos clínicos de desinfección del conducto radicular y control de biopelículas durante los procedimientos de endodoncia, de manera similar se introdujeron medicamentos intraconducto para su uso entre citas, sin embargo, la efectividad en la erradicación de las bacterias y su existencia en los túbulos dentinarios sumadas las ramificaciones del canal lateral en los dientes los hace limitada aún. (Shamma et al., 2022)

*Enterococcus faecalis* es la especie bacteriana más común detectado en el fracaso del tratamiento endodóntico, considerada la cepa más resistente de las infecciones dentales del sistema de conductos radiculares que debe ser eliminada en los procedimientos endodónticos (Harshitha et al., 2022)

Se han realizado diversos cambios en los procedimientos para el tratamiento endodóntico con la finalidad de superar los problemas mencionados anteriormente. Sin embargo, el éxito del tratamiento de endodoncia sigue dependiendo principalmente de la instrumentación y la desinfección del conducto radicular (Parolia et al., 2020).

El uso de medicamentos intracanal muchas veces no es completamente eficaz para los tipos de microorganismos bacterianos que habitan en el interior de los conductos radiculares, añadir a lo mencionado que múltiples investigaciones se centraron en informar sobre la combinación de medicamentos antibacterianos con el propósito de minimizar la formación de

cepas bacterianas resistentes y promover un efecto sinérgico con mayor eficacia antibacteriana. (Shamma et al., 2022)

Es por ello que ante la búsqueda de un medicamento intraconducto ideal nace este estudio, que busca comparar la eficacia antimicrobiana de las nanopartículas de quitosan asociado al  $\text{Ca(OH)}_2$  frente al *Enterococcus faecalis*.

### **1.1 Descripción y formulación del problema**

Entre las patologías más severas del complejo pulpar encontramos la necrosis pulpar con reacción periapical producida por la proliferación de bacterias, originando así procesos inflamatorios e infecciosos a nivel de los tejidos periapicales; cuyo agente etiológico más prevalente es el *Enterococcus faecalis*.

El éxito del tratamiento endodóntico se supedita completamente a la limpieza y desinfección en el sistema de conductos radiculares; la instrumentación mecánica, como el uso de irrigantes reducen drásticamente la carga bacteriana, sin embargo no siempre se logra una completa desinfección de los microorganismos en el conducto radicular, todo esto a causa de la complejidad del sistema anatómico del conducto radicular (particularmente en los primeros molares mandibulares) y la organización de biopelículas bacterianas en áreas inaccesibles (Bystrom et al., 1985). Por lo ende, las bacterias restantes podrían multiplicarse respecto al tiempo y adquirir niveles similares al tratamiento inicial (Sjorgen, 1997) como consecuencia un fracaso en la terapia endodóntica.

El papel del *Enterococcus faecalis* fue y sigue siendo un gran problema en la terapia endodóntica en el conducto radicular ya que juega un rol fundamental en la etiología de las lesiones periapicales por ser la especie más persistente. (Shamma et al., 2022)

En la práctica odontológica el hidróxido de calcio es comúnmente empleado como medicamento intracanal ya que presenta propiedades de interés en la terapéutica. Sin embargo, la acción buffer proporcionada por la dentina neutraliza la acción del  $\text{Ca(OH)}_2$  como

consecuencia diversas especies bacterianas pertenecientes al género *Enterococcus*, pueden permanecer vivas debido a la resistencia a los álcalis a pH=9 y/o pH= 10 que estas poseen (Nakajo, 2004).

En la actualidad la medicina complementaria y alternativa viene investigando nuevas alternativas de tratamientos antimicrobianos, debido al constante aumento de la resistencia bacteriana sobre los antibióticos convencionales y las posibles reacciones adversas que estos pueden producir en ciertos pacientes (Jaiswal et al., 2017; Parolia et al., 2020).

Por consiguiente, se están empleando extractos naturales como el quitosán; biopolímero natural catiónico no tóxico; y el propóleo, un producto resinoso derivado de las abejas, conocido por sus propiedades antibacterianas, antifúngicas y curativas, ambos productos naturales están demostrado tener una gran efectividad antimicrobiana en otras áreas de la medicina.

Por tanto, este estudio comparará la eficacia antibacteriana del quitosán, propóleo y el hidróxido de calcio con el fin de investigar e introducir el uso de medicamentos intracanales de origen natural; tomando en consideración la existencia de productos químicos usualmente usadas en la práctica odontológica.

¿Cuál será la eficacia antimicrobiana de quitosán nanopartículas asociado al  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  en comparación al propóleo asociado al  $\text{Ca}(\text{OH})$  frente al *Enterococcus faecalis* en un cultivo in vitro?

## **1.2 Antecedentes**

Acosta (2017) en Ecuador evaluó la eficacia antibacteriana del gel de quitosán/propóleo, hidróxido de calcio (Calcifar-P), extracto de propóleo al 30%, gel de clorhexidina al 2% y el quitosán gel frente la cepa del *Enterococcus faecalis*. La cepa utilizada fue *Enterococcus faecalis*, una muestra de 14 replicaciones según el tipo de agente: gel quitosán/propóleo, hidróxido de calcio (Calcifar-P), el extracto de propóleo al 30%, la

clorhexidina en gel al 2% y el gel de quitosán. La medida en milímetros de los halos de inhibitorios se realizó las de 24 horas de incubación a 37°C. Se halló que la medida del halo inhibitorio del gel de quitosán/propóleo fue de 22,36mm, gel de quitosán 17,71mm, clorhexidina en gel al 2% 15,86 mm, Calcifar-P de 13,93 mm; mientras tanto el extracto de propóleo al 30 % obtuvo medida más baja con un valor de 11,36mm. Se supo que de todos los valores mencionados ninguno logró superar al control positivo cuya medida fue de 34,86mm. Se concluyó que el gel quitosán/propóleo posee mejor eficacia antibacteriana respecto a los otros medicamentos testeados (Calcifar-P, gel de clorhexidina al 2%, extracto de propóleo al 30% y quitosán en gel).

Del Carpio et al. (2017) en Toronto – Canadá, evaluó la eficacia de las nanopartículas de Quitosán (CNP) y el extracto de propóleo etanólico (EPE) incorporado en una pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  con el propósito de eliminar las biopelículas bacterianas. Se infectó con *Enterococcus faecalis* conductos radiculares de 40 dientes de humanos durante 21 días y también intraoralmente durante 48 horas, seguido de incubación en infusión cerebro- corazón durante 48 horas para estandarizar el crecimiento de biopelículas. Las pastas de  $\text{Ca(OH)}_2$  asociadas o no con CNP o EPE se analizaron en biopelículas durante 7 y 14 días. Todas las pastas experimentales pudieron reducir significativamente las unidades formadoras de colonias (UFC) de *Enterococcus faecalis* después de 7 o 14 días. Sin embargo, la reducción de UFC mejoró significativamente cuando se incorporaron CNP en la pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$ . Durante 7 y 14 días el recuento de células viables disminuyó significativamente en los grupos  $\text{Ca(OH)}_2$  / CNP, mientras que los grupos  $\text{Ca(OH)}_2$ /EPE solamente mostraron su efectividad para eliminar las bacterias durante los 7 primeros días de tratamiento por tanto la incorporación de CNP en una pasta a base de  $\text{Ca(OH)}_2$  tiene el potencial de aumentar su actividad antibacteriana e inhibir la recolonización bacteriana en el tejido dentinario del conducto radicular después de la terapia endodóntica.

Yadav et al. (2017) en Nueva Delhi- India, realizó una evaluación el efecto citotóxico y la eficacia antibacteriana del Chitosan como irrigante del conducto radicular contra la biopelícula de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*. Se evaluó el efecto antibacteriano de 0,25% y 0.5 % de Chitosan, 2% de clorhexidina y 3% de hipoclorito de sodio sobre las cepas *Enterococcus faecalis* y *Candida Albicans*. Se utilizaron métodos de difusión de agar, las muestras de dientes se seccionaron para obtener una longitud de diente estandarizada; para luego ser inoculadas con suspensión de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* durante 4 semanas. El ensayo cualitativo de biopelículas de 3 semanas mostró una inhibición completa del crecimiento bacteriano del hipoclorito de sodio al 3%, 2%CHX. y chitosan. Se observó un decrecimiento significativo de las UFC/ml para los grupos de chitosan y la actividad antibacteriana de los grupos de Chitosan fue a la par con NaOCl al 3% y clorhexidina al 2%. Se observó que el chitosan no mostró citotoxicidad a 3 mg / ml y citotoxicidad al 10% a 6 mg / ml. Se concluyó que el uso de chitosan como irrigante podría ser una alternativa considerando las diversas propiedades indeseables de NaOCl y clorhexidina.

Jaiswal et al. (2017) en Moradabad - Uttar Pradesh, el estudio tuvo como objetivo explorar nuevos irrigantes que probablemente sean más efectivos y menos irritantes para los tejidos que el NaOCl. Para ello se usó 90 premolares mandibulares humanos extraídos y preparados biomecánicamente, y expuestos a *Enterococcus faecalis* para formar una biopelícula. Los grupos se irrigaron con las soluciones de prueba. Las muestras se inocularon en placas con TSA (Tryptone soya agar) para ser incubados por 24hrs. Las placas se sometieron luego a un contador de colonias digital donde no mostraron diferencias estadísticamente significativas, mientras que todas las demás diferencias intergrupales fueron estadísticamente significativas. Se concluyó que el Chitosan + Chlorhexidine, Chlorhexidine y Propolis son tan eficaces como el hipoclorito de sodio. Sin embargo, las alternativas naturales como irrigantes podría resultar ventajoso si se consideran varias propiedades desfavorables del NaOCl.

Morales (2019) en Perú comparó la eficacia antibacteriana del Chitosan y  $\text{Ca(OH)}_2$  sobre *Enterococcus faecalis*. Elaboró soluciones de chitosan en diferentes concentraciones con ácido acético al 2.0% (2.5%, 3.0% y 3.5% chitosan) y solución de  $\text{Ca(OH)}_2$  al 0.2% con agua destilada. Se concluyó que el chitosan al 3.0% tuvo mejor eficacia antibacteriana en comparación al hidróxido de calcio al 0.2% frente a *Enterococcus faecalis*.

Parolia et al. (2020) en Kuala Lumpur- Malaysia determinó el efecto antimicrobiano de la nanopartícula de chitosan en asociación al propóleo (CPN) como medicamento intracanal sobre la biopelícula de *Enterococcus faecalis* en el conducto radicular. Para esto se utilizaron 240 dientes humanos extraídos, los ejemplares fueron inoculados con *Enterococcus faecalis* por 21 días. Se dividieron las muestras aleatoriamente en 8 grupos ( $n = 30$ ) conforme al medicamento intracanal empleado: grupo I: solución salina, grupo II: Chitosan, grupo III: propóleo 100  $\mu\text{g/ml}$  (P100), grupo IV: propóleo 250  $\mu\text{g/ml}$  (P250), grupo V: nanopartícula de chitosan-propóleo 100  $\mu\text{g/ml}$  (CPN100), grupo VI: nanopartícula de chitosan-propóleo 250  $\mu\text{g/ml}$  (CPN250), grupo VII: hidróxido de calcio (CH) y grupo VIII: Gel de clorhexidina (CHX) al 2%. Al final del día 1, 3 y 7 a la profundidad de 200 y 400  $\mu\text{m}$  se recolectó restos de dentina para hallar el número de UFC. Se demostró que chitosan, P100, P250, CPN100, CPN250, CH y 2% CHX redujeron significativamente las UFC en comparación con la solución salina. El día uno y tres, a 200 y 400  $\mu\text{m}$ , CPN250 mostró una reducción significativa de UFC frente a los demás grupos, mientras que CPN100 fue significativamente mejor que otros grupos, excepto CPN250 y 2% CHX. El séptimo día, CPN250 de 200  $\mu\text{m}$  mostró una reducción significativa de las UFC en contraste con los otros grupos, excepto CPN100 y CHX. Las imágenes SEM mostraron que la dentina del conducto radicular tratada con CPN250 tenía menos cobertura con la bacteria *Enterococcus faecalis*. De manera similar, las imágenes CLSM también mostraron un mayor porcentaje de bacterias *Enterococcus faecalis* muertas con

CPN250 que con CPN100. Se concluyó que CPN250 fue el más eficaz para reducir las colonias de *Enterococcus faecalis* en el día uno, el día tres y el día 7 en ambas profundidades.

Harshitha et al. (2022) En Bengaluru – India evaluaron y compararon la eficacia antibacteriana de la nisina,  $\text{Ca(OH)}_2$  y la pasta antibiótica triple (TAP) mezcladas con agua destilada y quitosan como medicamento intracanal en *Enterococcus faecalis*. Se prepararon y esterilizaron en autoclave 120 premolares unirradiculares, los ejemplares se colocaron en caldo de infusión cerebro-corazón (BHI) con una suspensión de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) de 24 horas. El conducto radicular estuvo infectado durante 21 días; Grupo 01: Nisina + agua destilada; Grupo 02: Nisina + 2% quitosan; Grupo 03:  $\text{Ca(OH)}_2$  + agua destilada; Grupo 04:  $\text{Ca(OH)}_2$  + 2% quitosan; Grupo 05: TAP + agua destilada; Grupo 06: TAP + 2% quitosan y se incubaron durante 1 y 7 días. Los raspados de dentina de 10 muestras en cada intervalo de tiempo se transfirieron a caldo BHI, se incubaron y luego se diluyeron en serie; posteriormente se procedió a evaluar el recuento de las UFC. Después del 1 día, el Grupo 06 mostró menos UFC que otros grupos y las UFC más altas fueron en el Grupo 03. Después de 7 días, el Grupo 06 mostró menos UFC que otros grupos. Se concluyó que el TAP con quitosan puede ser el medicamento de elección para su colocación durante 1 día y fue equivalente a la combinación de nisina con quitosan después de 7 días.

S R S et al. (2023) en Pune - India tuvieron como objetivo comparar la eficacia de la pasta antibiótica doble (DAP) y la pasta antibiótica triple modificada (MTAP) utilizando al quitosan y al hidróxido de calcio como vehículo. Para ello tomaron sesenta dientes unirradiculares para ser preparados biomecánicamente, luego fueron expuestos a la cepa *Enterococcus faecalis* durante 21 días. Los grupos se dividieron en 10 cada uno adición de nanopartículas de quitosan a MTAP, DAP, CH y adición de solución salina a MTAP, DAP, CH; cada medicamento con solución salina o quitosan como vehículo. Subgrupos: D1: DAP + solución salina (n = 10); D2: DAP + quitosan (n = 10); M1: MTAP + solución salina (n = 10);

M2: MTAP + chitosan (n = 10); C1: CH + solución salina (n = 10); C2: CH + chitosan (n = 10) La carga microbiana se midió al final de dos y siete días donde en el día 2: MTAP y DAP tuvieron recuentos de UFC más bajos que CH (tanto con chitosan como con solución salina); DAP y solución salina fueron significativamente mejores que DAP + chitosan y en el día 7: CH + chitosan tuvo recuentos de UFC significativamente más altos que otros grupos. Se concluyó que los grupos DAP y MTAP con chitosan mostraron una significativa reducción en la carga microbiana en contraste con el hidróxido de calcio con chitosan.

Teja et al. (2023) compararon la eficacia antibacteriana sinérgica de diferentes combinaciones de Hidróxido de calcio como medicamento intracanal contra *Enterococcus faecalis*. El estudio incluyó 400 dientes premolares mandibulares permanentes humanos extraídos. Estos fueron inoculados con la bacteria durante 21 días. Después de eso, las muestras fueron distribuidas en cinco grupos (n = 80) según los materiales utilizados para la desinfección de las muestras: Grupo I, Ca(OH)<sub>2</sub> solo; Grupo II, Ca(OH)<sub>2</sub> + 2% clorhexidina gel; Grupo III, Ca(OH)<sub>2</sub> + chitosan gel al 2%; Grupo IV, Ca(OH)<sub>2</sub> + 0,02% nanopartículas de plata en gel; Grupo V, Ca(OH)<sub>2</sub> + Vidrio bioactivo S53P4. Por consiguiente, el efecto sinérgico del hidróxido de calcio con el vidrio bioactivo mostró una mejor reducción bacteriana frente a todos los grupos, asimismo la asociación del hidróxido de calcio con gel de chitosan mostro una mejor reducción bacteriana con respecto al uso del hidróxido de calcio solo.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo General**

- Comparar la eficacia antibacteriana de la asociación de nanopartículas de chitosan con Hidróxido de Calcio y la asociación de propóleo con Hidróxido de Calcio frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 en un cultivo in vitro.

### **1.3.2 Objetivos Específicos**

1. Determinar la eficacia antibacteriana in vitro del chitosan nanopartículas en combinación con el Hidróxido de Calcio frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 a las 24 horas, 48 y 72 horas
2. Determinar la eficacia antibacteriana in vitro del extracto de propóleo con el Hidróxido de Calcio frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 a las 24, 48 y 72 horas.
3. Determinar la eficacia antibacteriana in vitro del Hidróxido de Calcio frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 a las 24, 48 y 72 horas.

### **1.4 Justificación**

En la gran mayoría de los casos que requiera un tratamiento de conductos, el objetivo primordial es prevenir y tratar o, precisamente, prevenir y eliminar una infección bacteriana en el sistema de conductos radiculares, donde el éxito final generalmente depende del control satisfactorio de la infección. Existe una opinión ampliamente aceptada de que tanto la limpieza del sistema de conducto radicular como la conformación son los pasos más importantes hacia la esterilidad del conducto. Sin embargo, la compleja anatomía de los dientes y los conductos radiculares crean un entorno que es un desafío para instrumentar y limpiar. Si bien nuestro conocimiento sobre las bacterias persistentes, los agentes desinfectantes y el medio químico del conducto radicular necrótico ha aumentado considerablemente, no hay duda de que se necesita una investigación clínica y básica más innovadora para optimizar el uso de los métodos y materiales existentes, para encontrar nuevas técnicas y materiales, o combinación de materiales, para lograr el objetivo de una desinfección completa y predecible del sistema de conducto radicular.

### **1.5 Hipótesis**

Debido a que el chitosan tiene comprobada acción antibacteriana tanto en cepas Gram-positivas como en Gram-negativas, es probable que la asociación de las nanopartículas de

chitosan con el  $\text{Ca(OH)}_2$  presente mayor acción antibacteriana que la asociación del propóleo con el  $\text{Ca(OH)}_2$  frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Bases teóricas sobre el tema de investigación

#### 2.1.1 *Enterococcus faecalis*

El *Enterococcus faecalis* especie más representativa dentro del género *enterococcus* siendo un diplococo grampositivo anaerobio facultativo, inmóvil, no esporulado que forma parte de la flora oral normal, así como también del sistema gastrointestinal humano y del tracto genital femenino (Sabarathinan et al., 2018). Esta bacteria llama mucho la atención de investigadores, porque es la única especie más prevalente y frecuentemente aislada en los conductos radiculares con infección pulpar y esto gracias a su amplia variedad de factores de virulencia (Jaiswal et al., 2017; Teja et al., 2023).

Entre sus estrategias para lograr la persistencia, característica notable de esta bacteria, según Stuart et al. (2006) “No solo se debe a su amplia variedad de factores de virulencia; entre ellas sustancia de agregación, feromonas, enzimas líticas, citolisina, y ácido lipoteicoico” (p.94). Ya que esta la consigue de diferentes maneras desafiando así su supervivencia ante la acción de los antimicrobianos y el sistema inmune (Harshitha et al., 2022).

Su pequeño tamaño los hace convenientes para poder invadir los túbulos dentinarios; gracias a la producción de enzimas convertidoras de angiotensina, gelatinasa y la serin proteasa y proteínas de unión al colágeno I producidas por los *Enterococcus faecalis*, les otorgan a estas bacterias facultativas su capacidad de adherirse fuertemente a las paredes de los túbulos dentinarios (Halkai et al., 2014).

Otro mecanismo por el cual estas bacterias se unen a la dentina es debido al suero proveniente del hueso alveolar y del ligamento periodontal los cual le confieren la unión al colágeno tipo I y con esto a la dentina; todo esto a fin de obtener la energía que necesita hasta que estas bacterias se dispongan de un suministro nutricional adecuado (Perez et al., 2013).

El conducto radicular carece de nutrientes sin embargo los *Enterococcus faecalis* pueden adquirir la energía que requieren y necesitan a partir del ácido hialurónico, encontrado en la dentina por acción de degradación por la hialuronidasa; así como también usar el suero, además un incorrecto sellado apical permite que el suero fluya hacia el conducto radicular, por tanto puede utilizarse como fuente nutricional para poder sobrevivir durante prolongados periodos de tiempo en condiciones nada favorables como la inanición y pH alto proveniente del hidróxido de calcio utilizado como medicamento intraconducto (John et al., 2015).

Son capaces de formar un biofilm en la superficie dentinaria bajo diferentes condiciones ambientales no hostiles haciéndolo más resistente a la fagocitosis, y antimicrobianos (Stuart et al., 2006).

El *Enterococcus faecalis* tiene la capacidad de suprimir la acción linfocítica, lo cual conlleva a una falla en el tratamiento endodóntico, por tanto, su fracaso terapéutico (Jaiswal et al., 2017; Pérez et al., 2013). Así como también de resistir ambientes hostiles, en general, cuando estas bacterias enfrentan desafíos potencialmente letales como altas concentraciones de sal, sales biliares, ácido, calor a temperatura de 60°C, inanición de glucosa (Hegde, 2009; John et al., 2015), son capaces de adaptarse al estrés sintetizando unas proteínas de estrés que les confiere la capacidad de soportar la amenaza, subsistir y recuperarse (Evans et al., 2002; Figdor et al., 2003).

Se sabe que a un pH mayor o igual a 11.5 no sobreviven, ésta es una característica significativa de *Enterococcus faecalis* (Evans et al., 2002); sin embargo, pueden sobrevivir a un pH inferior a 11.5 (Byström et al., 1985). Debido a la capacidad buffer o tampón de su citoplasma, la posesión de una bomba de protones que reduce el pH interno de la célula, y la capacidad tampón de la dentina de los túbulos dentinarios en la que la alcalinidad sólo puede alcanzar un pH de 10,3 después de revestir el conducto con hidróxido de calcio, hacen que

logre el equilibrio y con ello su supervivencia frente al hidróxido de calcio (Hegde, 2009; Pérez et al., 2013).

### **2.1.2 Medicación intraconducto**

El éxito clínico en la terapéutica endodóntica debe implicar la erradicación completa de los microorganismos en el sistema de conductos radiculares, hecho que se puede lograr a través de la limpieza y conformación eficiente. Sin embargo, el papel de los medicamentos intraconducto no puede ser ignorado ya que se han considerado un paso esencial para eliminar las bacterias en los conductos radiculares cuando el tratamiento no se puede completar en una cita (Kumar et al., 2019).

Debido a la complejidad de la morfología en el conducto radicular, las limas manuales y rotativas no pueden limpiar áreas como istmos, canales laterales y túbulos dentinarios. En tales casos, el uso de irrigantes, así como el empleo de medicamentos intraconducto, van de la mano siendo de vital importancia en la terapia endodóntica. (Madarati, 2017).

Tradicionalmente y durante mucho tiempo los medicamentos intraconducto aplicados en tratamiento del conducto radicular son empleados entre sesiones de cita como un complemento en el control del crecimiento bacteriano, ya que las bacterias supervivientes a menudo proliferan entre las citas. (Messer y Chen, 1984).

Actualmente, la disponibilidad de medicamentos intraconducto en el mercado es muy variado teniendo entre los más destacados al hidróxido de calcio, agentes antisépticos de derivados fenólicos y aldehídos (Madarati, 2017).

Los medicamentos con fenol y formaldehído se han utilizado durante mucho tiempo como medicamentos intracanales. Sin embargo, aparte de que el alcanforado y el paramonoclorofenol son menos efectivos in vivo en comparación con los resultados obtenidos in vitro; (Byström et al., 1985). Está bien documentado que los medicamentos que contienen formaldehído y fenol son potencialmente mutagénicos y cancerígenos (Chong y Ford 1992).

Por lo tanto, el interés en el uso de compuestos fenólicos en endodoncia está disminuyendo bruscamente. Un medicamento intracanal ideal sería aquel que tiene un efecto antibacteriano de amplio espectro, no sea tóxico, no irrite las estructuras vitales, no tenga efecto sistémico, sea fácil de administrar, penetre bien en los túbulos dentinarios y se elimine fácilmente de la raíz espacio del canal (Martin, 1979).

**Hidróxido de calcio.** Representada por la fórmula química  $\text{Ca(OH)}_2$ , siendo el medicamento intracanal más popular en la terapia endodóntica desde su introducción en 1920 por Herman (Baranwal et al., 2017). La pasta a base de  $\text{Ca(OH)}_2$  es el medicamento a elección debido a su pH alcalino de alrededor de 12.5 – 12.8 factor clave para lograr una acción antibacteriana (Andrade, 2020; Del Carpio et al., 2017).

Se han propuesto varios mecanismos de acción para el efecto antibacteriano del  $\text{Ca(OH)}_2$  como la relacionada con los iones hidroxilo que son liberados en un ambiente acuoso (Mustafa et al., 2018), así como también la capacidad de destruir los fosfolípidos estructurados en la membrana citoplasmática bacteriana, a través de los iones hidroxilo, radicales libres, que inducen la peroxidación lipídica (Mohammadi et al., 2012); esto se debe a que estos iones hidroxilo eliminan los átomos de hidrógeno de los ácidos grasos insaturados, produciéndose un radical lipídico libre. Este radical lipídico libre reacciona con el oxígeno, generando un radical peróxido lipídico, que elimina otro átomo de hidrógeno. Por tanto, los peróxidos producidos actuarán como radicales libres, comenzando una acción en cadena auto-catalítica para tener como resultado daño en la membrana y una mayor pérdida de ácidos grasos insaturados (Siqueira y Lopes 1999).

Entre otros de sus mecanismos esta la capacidad de romper los enlaces iónicos que son importantes en la configuración estructural de las proteínas (Mohammadi et al., 2012). El metabolismo celular juega un rol muy importante en la actividad enzimática; ya que las enzimas mantienen una actividad y estabilidad óptima basado en rangos estrechos de pH, lo

que genera cambios en la neutralidad. El ambiente alcalino proporcionado por el  $\text{Ca(OH)}_2$ , desencadena en la ruptura de enlaces iónicos, importantes para mantener la estructura terciaria de las proteínas; debido a lo cual, la enzima conserva su estructura covalente, sin embargo, la cadena polipeptídica se desenreda aleatoriamente logrando una conformación espacial variable e irregular lo que conduce a su desnaturalización y daño irreversible en la membrana citoplasmática (Simi Junior et al., 2016).

Además, los iones hidroxilo tienen la facultad de dividir hebras en el ADN causando daño ya que pierden el material genético viéndose inhibida la replicación del ADN celular y otras actividades (Siqueira y Lopes, 1999).

**Productos naturales.** Dentro de los productos naturales tenemos:

**Chitosan.** Polímero muy abundante en la naturaleza descubierta por Rouget en 1859 con propiedades similares a la celulosa (fibra vegetal) que se obtiene a través de la desacetilación alcalina del Chitin o Quitina (Raafat y Sahl, 2009), componente muy abundante en la naturaleza que se encuentra en el exoesqueleto de los artrópodos como el cangrejo, langostas, krill, camarones y los insectos; en los moluscos específicamente es su rádula (conchas de mariscos) como también en la pota y el calamar; también está presente en alimentos como granos, levadura, plátanos y hongos, en su pared celular (Li et al., 2015)

Este biopolímero natural, ecológico, biocompatible y no tóxico está compuesto por copolímero de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina, su amplia gama basado en su peso molecular oscila entre 50kDa y 200kDa y grado de desatización; principales factores que afectan el tamaño y la formación de partículas (Singh et al., 2015; Reshad et al., 2021).

Es poseedor de cargas iónicas positivas, dicha capacidad catiónica le confiere una alta capacidad de quelación en condiciones ácidas; con una mayor actividad a valores de pH más bajos (Li et al., 2015; Jaiswal et al., 2017); así como también la capacidad de unirse

químicamente con grasas, lípidos, colesterol, iones metálicos, proteínas y macromoléculas cargadas negativamente (Abdeltwab et al., 2019).

Debido a sus diversos beneficios así como su abundancia y su bajo costo de obtención este polisacárido se ha vuelto económico y ecológicamente interesante, llamando la atención en diversas áreas médicas y de la industria farmacológica (agente antibacteriano, antitumoral; portador de fármacos y acelerador en la cicatrización de lesiones), la bio-tecnología (portador de enzimas y células), ecosistema (tratamiento de aguas), agronomía (estimulante de crecimiento), cosmetología y alimentos (acelerador para la absorción del calcio - hierro y como fuente de fibra); todo ellos gracias a sus excelentes propiedades como su biocompatibilidad, biodegradabilidad, adhesión y falta de toxicidad. (Silva et al., 2013; Akncbay et al., 2007).

En odontología ha sido ampliamente utilizado como bioadhesivo; potenciador de la viscosidad; para liberación prolongada de drogas en la cavidad bucal; permeabilizador; antimicrobiano antiadhesivo; anticariogénico; en periodoncia para tratamiento de enfermedades periodontales como la candidiasis oral, movilidad dental y reducción de la formación de placa (kapadia et al., 2018).

En la constante búsqueda de antimicrobianos naturales para evitar productos químicos sintéticos se llegó al quitosán y nanopartículas de quitosán. La acción antibacteriana del quitosán está influenciada por diversos factores; dentro de ellos el tipo de quitosán, grado de desatización y otras propiedades químicas que este presenta; exhibiendo así una mayor actividad antibacteriana más eficiente ante las bacterias Gram-positivas que contra las bacterias Gram-negativas. La acción antimicrobiana del quitosán también depende del peso molecular y del solvente (Qi et al., 2004; Ke et al., 2021).

El mecanismo de acción de este antibacteriano se debe a que el grupo amino al estar cargado positivamente interactúa con el fosfolípido de la membrana plasmática cargado de

iones negativos, alterando la permeabilidad de la célula produciendo así la liberación y pérdida de componentes celulares (electrolitos intracelulares y material proteico) como consecuencia, muerte celular. (Hernandez-Lauzardo et al., 2011).

El chitosan tiene propiedades quelantes para iones metálicos, atribuyéndole la capacidad de ser responsable para su acción antibacteriana. También se han reportado algunos estudios sobre la facultad de penetrar la pared celular a fin de unirse a la síntesis de ARNm para inhibir al ADN (Divya y Jisha, 2017).

***Nanopartículas de Chitosan.*** En estas últimas décadas las terapias de desinfección basadas en nanopartículas están generando un entusiasmo significativo en la comunidad de investigación ya que muestra su promesa como un posible sistema ideal de administración de fármacos para sustancias poco solubles, poco absorbidas y químicamente termolábiles y también se puede fusionar con otros compuestos para producir efectos sinérgicos. (Bangun et al., 2018).

Estas partículas sólidas cuyo rango de tamaño varía entre 10–1,000 nm está ganando la importancia debida ya que al ser de dimensiones nano hacen que pueda penetrar mejor en el biofilm como respuesta hay una mayor actividad antimicrobiana que su contraparte la macro escala (Wong et al., 2021).

Las nanopartículas de chitosan son materiales naturales con excelentes propiedades fisicoquímicas, antimicrobianas y biológicas, que los convierten en un material ecológico superior y poseen una bioactividad que no daña a los humanos. Debido a estas propiedades únicas, las nanopartículas de chitosan se han preparado mediante varios enfoques, incluida la reticulación física por gelificación iónica entre chitosan y macromoléculas específicas cargadas negativamente, como el tripolifosfato de pentasódico. Además, las películas y recubrimientos de chitosan nanopartículas se pueden usar como vehículo para incorporar agentes

antimicrobianos naturales o químicos, antioxidantes, enzimas o sustancias funcionales como extractos de plantas, probióticos, minerales o vitaminas (Abdeltwab et al., 2018).

**Propóleo.** El propóleo, introducido en la odontología en 1996 por Krell es una mezcla resinosa natural cuyo color varía de amarillo a marrón oscuro dependiendo del área geográfica al que pertenece; esta es recolectada principalmente de la planta *Apis mellifera* L para posteriormente ser liberada por las abejas (Baranwal et al., 2017).

El propóleo crudo se compone principalmente 50-55% de resinas y bálsamos vegetales, 30% de ceras, 10% de aceites aromáticos, 5% de polen y 5% de diferentes compuestos orgánicos (Baranwal et al., 2017). El extracto de propóleo generalmente se hace usando: etanol, agua, metanol, glicerol, propilenglicol o aceites. (Chandna et al., 2014)

En las últimas décadas el propóleo ha sido atractivo para los investigadores debido a la presencia de más de 300 componentes químicos (Chandna et al., 2014). Los principales compuestos que se encuentran presentes son ceras, polifenoles (ácidos fenólicos, flavonoides) y terpenoides altamente activos otorgándole propiedades biológicas y farmacológicas, como ser un antioxidante atribuida a su capacidad de eliminar radicales, antiinflamatoria debido a la presencia de fenetil éster del ácido cafeico y antimicrobiano - antifúngico por la presencia de los flavonoides (Przybyłek, y Karpiński., 2019)

En odontología, el propóleo se ha utilizado para la reparación de heridas quirúrgicas, como irrigante del conducto radicular, como agente para el recubrimiento pulpar en la hipersensibilidad de la dentina, en la prevención de la caries, como medio de almacenamiento para dientes avulsionados y tiene un conocido efecto antibacteriano, antifúngico, antiviral, inmunomodulador y antioxidante (Jaiswal et al., 2017).

Con respecto a su citotoxicidad se ha demostrado que el propóleo es 10 veces menos tóxico que el hidróxido de calcio por lo cual no muestra efectos secundarios después de la administración (Del Carpio-Perochena et al., 2017) estudios informaron que el propóleo es más

efectivo contra microorganismos resistentes y también es biocompatible con los tejidos perirradiculares que los medicamentos intracanales existentes. Sin embargo, muy pocos estudios han examinado la eficacia del propóleo como medicamento intracanal, y la literatura necesita más investigaciones (Shaik et al, 2014).

### III. MÉTODO

#### 3.1 Tipo de investigación

El estudio in vitro tiene un diseño de tipo comparativo, experimental, longitudinal y prospectivo

#### 3.2 Ambiente temporal y espacial

##### 3.2.1 *Ámbito temporal*

La presente investigación abarco un tiempo que comprende desde marzo hasta diciembre del 2023.

##### 3.2.2 *Ámbito espacial*

La ejecución este trabajo de estudio se realizó en los laboratorios de la Facultad de Tecnología Médica de la Universidad Nacional Federico Villarreal, solicitando permisos para la utilización del ambiente e instrumentos requeridos para llevar a cabo el estudio. (Anexo A, B y C)

#### 3.3 Variables

##### 3.3.1 *Variable independiente*

Sustancias Experimentales.

- Chitosan nanopartículas asociado al Hidróxido de calcio
- Propóleo al 30% asociado al  $\text{Ca}(\text{OH})_2$

##### 3.3.2 *Variable dependiente*

Efectividad antibacteriana sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

##### 3.3.3 *Operacionalización de las variables*

<b>Variables</b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Indicador</b>	<b>Escala de medición</b>	<b>Valor</b>
Efectividad antibacteriana sobre <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212.	Capacidad de una sustancia que consiste en inhibir el crecimiento y/o destruir la cepa de <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212.	Halo de inhibición del crecimiento bacteriano medido en mm de diámetro de las soluciones en las mismas condiciones.	Razón	Expresado en mm
Sustancias experimentales	Sustancia de diferente origen con propiedades beneficiosas que pueden inhibir o detener el crecimiento de microorganismos	Componentes químicos	Nominal	1.- Chitosan nanopartículas asociado al Hidróxido de calcio 2- Propóleo 3% asociado al Hidróxido de calcio 3.- Hidróxido de Calcio
Tiempo	Tiempo transcurrido de observación de las placas Petri	Tiempo en cronómetro	Ordinal	24 horas 48 horas 72 horas

### **3.4 Población y muestra**

#### **3.4.1 Población**

La población para este estudio de investigación comprendió de la cepa patrón de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

#### **3.4.2 Muestra**

Para determinar el tamaño muestral se procedió a realizar pruebas piloto y posteriormente se empleó la fórmula de comparación de medias a partir de un nivel de confianza de 95%, un poder estadístico de 90% y el valor de la varianza del grupo de estudio de 1.77, por lo cual el mínimo tamaño de muestra fue de 8, sin embargo, para el presente estudio se trabajó con 11 placas por grupo. (Anexo D)

#### **3.4.3 Criterios de selección**

Criterios de inclusión

- Cultivos de bacterias de *Enterococcus faecalis* provenientes de la cepa ATCC 29212 anaerobia facultativa correctamente inoculados.

Criterios de exclusión

- Placas Petri que durante el proceso de ejecución presente algún tipo deterioro, estrago o rajadura en su estructura.
- Placas Petri cuyo resultado pueda ser dudoso en el proceso de incubación.

### **3.5 Instrumentos**

La recopilación de datos se trabajó mediante el método de observación directa asociada a la evaluación de la medida del diámetro del halo inhibitorio formada por los medicamentos de nanopartículas de quitosan, propóleo al 30%, hidróxido de calcio, como grupo control positivo la Ampicilina y como control negativo el agua destilada frente al *Enterococcus faecalis* cepa ATCC 29212, a las 24, 48, 72 horas. Para esto se utilizó una ficha con la finalidad de

consignar los datos obtenidos. El dispositivo que empleó para hacer las mediciones de los halos de inhibitorios fue una la regla vernier; todos los hallazgos se expresaron en milímetros (mm).

### **3.6 Procedimientos**

#### **3.6.1 Método**

Observación continua

#### **3.6.2 Descripción del procedimiento**

**3.6.2.1 Obtención del Chitosan Nanopartículas (CS NP).** El chitosan nanopartículas se obtuvo del laboratorio Nanoshel – UK. (Anexo E y F)

**3.6.2.2 Obtención del propóleo en polvo.** La obtención del extracto de propóleo al 30% fue procesado en el Centro de Control Analítico de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; siguiendo el protocolo propuesto por Franchi y colaboradores en el 2012 y Torres en el 2019, realizando algunas modificaciones. (Anexo G y H)

- El propóleo se adquirió en tiendas AgroandinaSAC procedente de Oxapampa; para ello se necesitó 1kg.
- Se almacenó en bolsas oscuras de polietileno sin contacto con la luz. (evitar la oxidación de los principios activos)
- En el laboratorio se separó la cera y otras impurezas en trozos pequeños.
- Del propóleo libre de impurezas se extrajo 100g de propóleo y se mezcló con 200 ml de etanol al 100% (forrar el matraz con papel metálico para evitar que pase la luz) mantener a temperatura ambiente 37 °C durante 8 días con agitaciones continuas para asegurar la correcta mezcla ó 24hrs con agitador magnético (con 1 magneto a una velocidad número 2)
- Lo sobrenadante se filtró con papel Whatman N° 42 y N°4. (Checalla y Sánchez, 2021).

- Del polvo de propóleo obtenido se tomó 30gr y se reactivó con 100ml de alcohol al 100% obteniendo un concentrado etanólico de propóleo al 30%.
- Se colocó en un frasco de color ámbar luego se conservó en un lugar alejado y sin contacto con la luz a temperatura ambiente.

**3.6.2.3 Obtención de la muestra.** El presente estudio de investigación utilizó la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, adquirido en el Laboratorio GenLab del Perú S.A.C sede en Lince - Lima – Perú. (Anexo I)

**3.6.2.4 Recuperación de la viabilidad.** La cepa bacteriana *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 se liofilizó de acuerdo con las especificaciones del fabricante (KWIK STIK) donde el líquido hidratante que contiene la ampolla fue liberado para ser mezclado con el microorganismo ya mencionado.

**3.6.2.5 Siembra de la cepa.** Posteriormente se llevó a cabo la siembra del microorganismo usando el asa de inóculo estéril en las placas Petri que contiene Agar Sangre en forma de Zig-Zag y se dejó incubada a 37°C, durante 24horas hasta que se observó crecimiento bacteriano. (Anexo J y K) Seguidamente efectuó a cabo la técnica de coloración Gram para constatar su grado de pureza. (Anexo L)

**3.6.2.6 Obtención del inóculo.** La obtención del inóculo se realizó removiendo una colonia de la cepa de *Enterococcus faecalis* que este bien definida de la placa petri, todo esto con la ayuda de una Asa estéril para ser depositada en un tubo de ensayo previamente esterilizado, contenido con solución salina estéril; se agitó constantemente hasta ajustar a la turbidez de concentración conocida de microorganismos equivalente al estándar 0.5 según la escala Mc Farland (Álvarez, 2014; Del Carpio - Perochena et al, 2017).

**3.6.2.7 Cultivo de la cepa.** Una vez preparada el inóculo y constatada su turbidez se procedió a la siembra en las placas Petri contenidas con medio agar Müller Hinton (Anexo M); para la preparación del agar nos guiamos de las indicaciones del fabricante, todas las placas se

estandarizaron a un volumen de 20ml de contenido de agar; el cultivo se realizó sumergiendo el hisopo estéril dentro de la suspensión para luego ser retirado a través de rotaciones haciendo presión contra la cara interna del tubo de ensayo que la contiene a fin de eliminar el exceso del líquido.

La siembra o inoculación se realizó en estrías por agotamiento, orientando el aplicador (Hisopo) sobre el área de la superficie y periférica del agar contenido en las placas Petri, realizando movimientos en diferentes sentidos, girando las placas a 60° grados con la finalidad de sustraer el excedente del inóculo y conseguir una siembra homogénea (Anexo N) (Jaiswal et al., 2017).

**3.6.2.8 Determinación de la actividad antibacteriana de los medicamentos testeados frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 por el método de difusión en placas.** Para esta prueba se empleó el método de Kirby – Bauer o difusión de discos; (Alvarez, 2014) sin embargo se realizó una modificación del método para que las sustancias experimentales sean colocadas directamente en el agar a fin de garantizar su difusión; para ello realizamos pocillos de 5mm de diámetro a fin lograr el contacto directo de las sustancias experimentales con el agar.

Grupo 1 = Control agua destilada control negativo

Grupo 2 = Disco de ampicilina control positivo

Grupo 3 = Ca (OH)<sub>2</sub> + agua destilada de 100mg/mL

Grupo 4 = Ca (OH)<sub>2</sub> + Nanochitosan 2% 100mg/mL

2g de chitosan disuelto con 100ml de ácido acético al 1%

Grupo 5 = Ca (OH)<sub>2</sub> + Extracto de propóleo al 30% 100mg/mL

Con propósitos de estandarizar la mezcla se ajustó a esa proporción en base a un estudio similar realizado por Harshitha y colaboradores en el 2022.

Se colocó las sustancias experimentales en los pocillos con una micropipeta excepto el control positivo que viene en presentación de disco.

Este procedimiento se repitió 11 veces; las placas se dejaron reposar por un lapso de 15 minutos a temperatura ambiente con la finalidad de lograr que el medicamento se propale. Pasado ese lapso se llevó a la incubadora.

**3.6.2.9 Incubación.** Para finalizar, las placas Petri con sus respectivas sustancias experimentales fueron llevadas a la incubadora a 37° grados para luego ser retiradas a las 24, 48 y 72 horas y realizar la medición de los halos.

**3.6.2.10 Medición del diámetro de la sensibilidad de inhibición.** La aparición de los halo inhibitorios del crecimiento bacteriano alrededor de los pocillos permitió determinar la sensibilidad antibacteriana; la medición se hizo por el reverso de las placas Petri a las 24, 48 y 72 horas de incubación respectivamente; utilizando una regla milimetrada se procedió a medir el diámetro del halo formado y se realizó la comparación de estos valores con la escala de sensibilidad de Duraffourd; sienta nula (menor o igual a 8mm), sensible (de 9mm a 14mm ), muy sensible (de 15mm a 19mm) y sumamente sensible (igual o superior a 20) (Morillo, C. J. y Balseca, 2018) (Anexo O y P)

De esta manera los valores recolectados serán procesados para a su análisis estadístico e interpretación y poder obtener datos significativos.

### **3.7 Análisis de datos**

Para analizar la información se elaboraron tablas de resumen descriptivo con los datos de los halos inhibitorios obtenidos de los grupos de trabajo y se elaboraron las gráficas según correspondan.

La prueba de hipótesis de diferencia de medias se realizó a través de las pruebas de Kruskal Wallis.

### **3.8 Consideraciones éticas**

Se solicito la aprobación para la ejecución del proyecto de investigación por la Oficina de Grados y Títulos de la Universidad Nacional Federico Villarreal, de la misma manera se obtuvo el permiso para el uso de los laboratorios de Tecnología Médica de la Universidad Nacional Federico Villarreal.

El autor no presenta conflicto de interés con las marcas y/o empresas utilizadas en este estudio de investigación, se respetará los códigos de ética de la Universidad Nacional Federico Villarreal.

#### IV. RESULTADOS

El presente estudio experimental valoró como objetivo comparar la eficacia antibacteriana de la asociación de nanopartículas de quitosán con  $\text{Ca(OH)}_2$  y la asociación de propóleo con  $\text{Ca(OH)}_2$  frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 en un cultivo in vitro, para el análisis comparativo se realizaron las medidas expresadas en mm de los halos de inhibición de las placas divididas en grupos según las sustancias experimentales testeadas.

**Tabla 1**

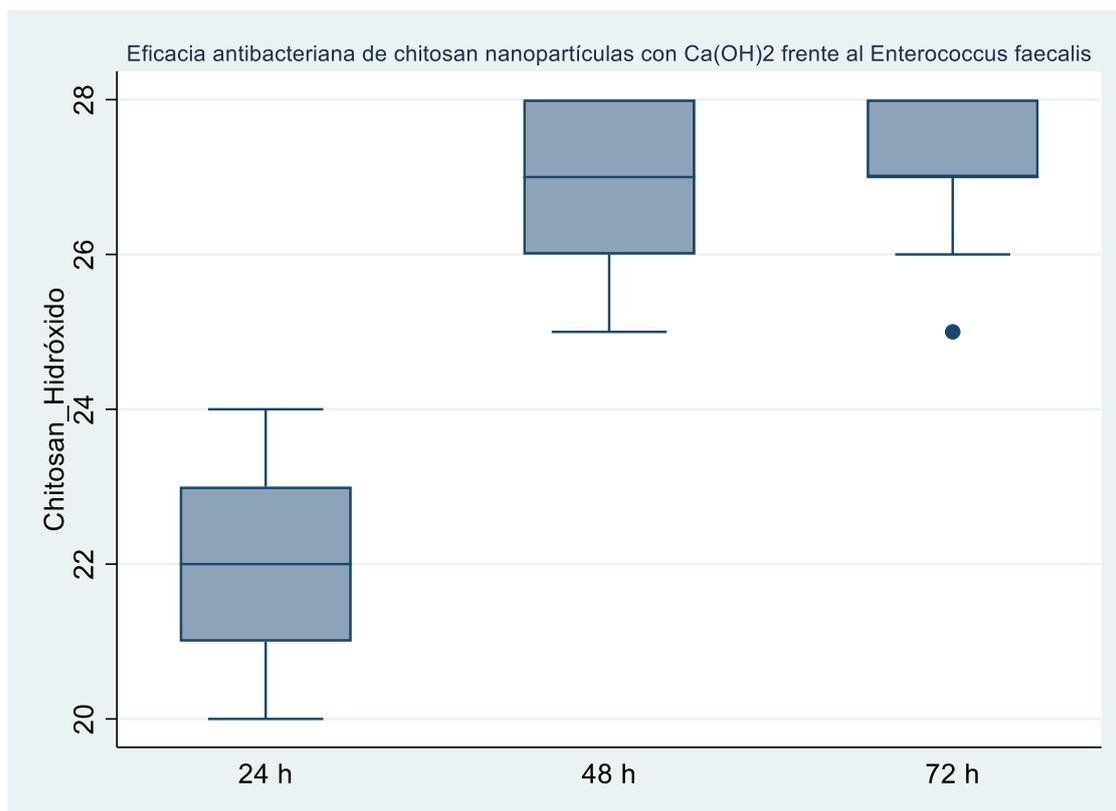
*Estadística descriptiva del halo inhibitorio del quitosán nanopartículas en combinación con el hidróxido de calcio frente al Enterococcus faecalis ATCC 29212 a las 24 horas, 48 y 72 horas*

<b>Periodo de incubación</b>	<b>n</b>	<b>Promedio</b>	<b>E.E.</b>	<b>Mediana</b>	<b>DIQ</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>P</b>
<b>24 h</b>	11	21.8	0.4	22	1	20	24	0.0001
<b>48 h</b>	11	26.7	0.3	27	1	25	28	
<b>72 h</b>	11	27.2	0.3	27	0.5	25	28	

*Nota.* La eficacia antibacteriana fue aumentando a medida que el periodo de incubación aumentaba, encontrando que fue mayor a las 48 y 72 horas en comparación a las 24 horas; siendo 27 mm, 27 mm y 22 mm respectiva; respecto a la escala de Duraffourd el efecto antibacteriano fue sumamente sensible (+++) mente. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). \*Prueba Krukal Wallis. E.E.=error estándar, DIQ=desviación intercuartil.

**Figura 1**

*Distribución de los valores del halo inhibitorio usando quitosán nanopartículas en combinación con el hidróxido de calcio frente al Enterococcus faecalis ATCC 29212 en un cultivo in vitro*



**Tabla 2**

*Análisis exploratorio de datos de los halos inhibitorios formados por la asociación del hidróxido de calcio con el extracto de propóleo frente al Enterococcus faecalis ATCC 29212 a las 24, 48 y 72 horas*

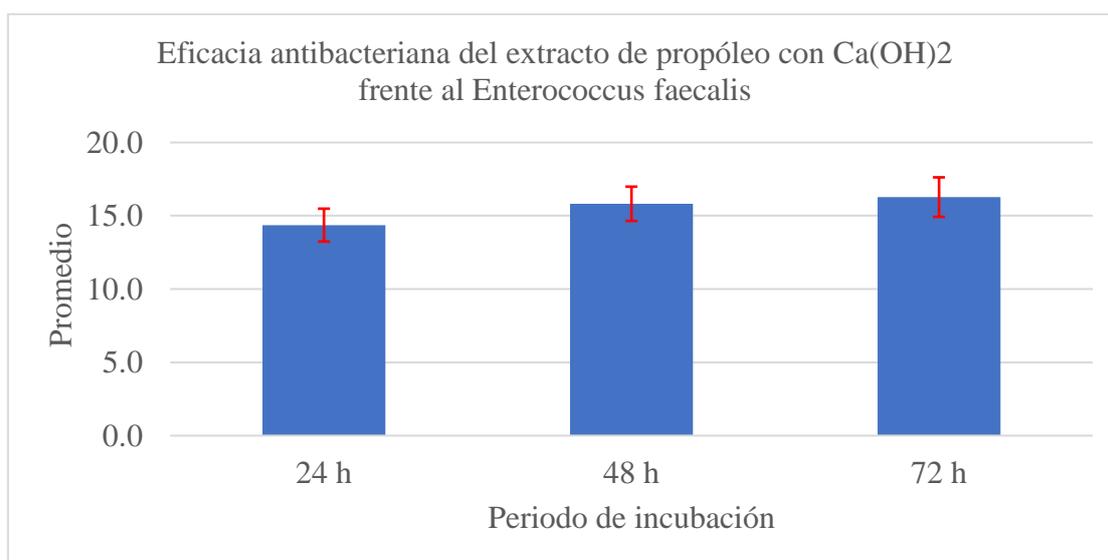
Periodo de incubación	n	Promedio	E.E.	Mediana	DIQ	Min	Max	P
24 h	11	14.4	0.4	14	1	13	16	0.0024
48 h	11	15.8	0.4	16	1	14	17	
72 h	11	16.3	0.4	16	1.5	14	18	

*Nota.* La eficacia antibacteriana promedio fue mayor a las 72 horas, seguido por 48 y 24 horas, siendo 16.3 mm, 15.8 mm y 14.4 mm respectivamente; mostrando un efecto antibacteriano sensible (+) en las 24 horas y un efecto muy sensible (++) a las 48 y 72 horas según la escala

de Duraffourd. Al evaluar estas diferencias se observó que fueron estadísticamente significativas entre los grupos de 24 y 48 horas, asimismo entre los grupos 24 y 72 horas ( $p < 0.05$ ). \*Prueba Anova- bonferroni. E.E.=error estándar, DIQ=desviación intercuartil.

### Figura 2

*Distribución de los valores del halo inhibitorio usando extracto de propóleo al 30% asociado al hidróxido de calcio frente al Enterococcus faecalis ATCC 29212 en un cultivo in vitro*



### Tabla 3

*Análisis exploratorio de datos de los halos formados por la inhibición de la pasta de Hidróxido de calcio frente al Enterococcus faecalis ATCC 29212 a las 24, 48 y 72 horas*

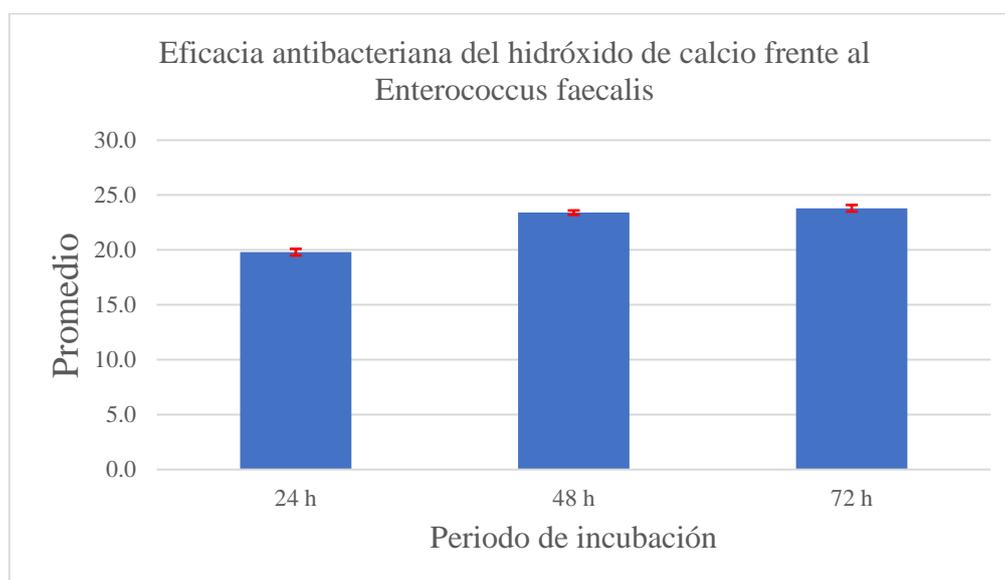
Periodo de incubación	n	Promedio	E.E.	Mediana	DIQ	Min	Max	P
24 h	11	19.8	0.3	20	1	19	21	0.0000
48 h	11	23.4	0.2	23	0.5	22	25	
72 h	11	23.8	0.3	24	0.5	22	25	

*Nota:* La eficacia antibacteriana promedio fue mayor a las 72 horas, seguido por 48 y 24 horas, siendo 23.8 mm, 23.4 mm y 19.8 mm respectivamente; según la escala de Duraffourd

mostraron resultados sumamente sensibles (+++). Al evaluar estas diferencias se observó que fueron estadísticamente significativas entre los grupos de 24 y 48 horas, asimismo entre los grupos 24 y 72 horas ( $p < 0.05$ ). \*Prueba Anova- bonferroni. E.E.=error estándar, DIQ=desviación intercuartil.

### Figura 3

*Distribución de los valores de los halos formados por la inhibición de la pasta de hidróxido de calcio frente al Enterococcus faecalis ATCC 29212 en un cultivo in vitro*



### Tabla 4

*Comparación del halo inhibitorio de las sustancias experimentales frente al Enterococcus faecalis ATCC 29212 en un cultivo in vitro*

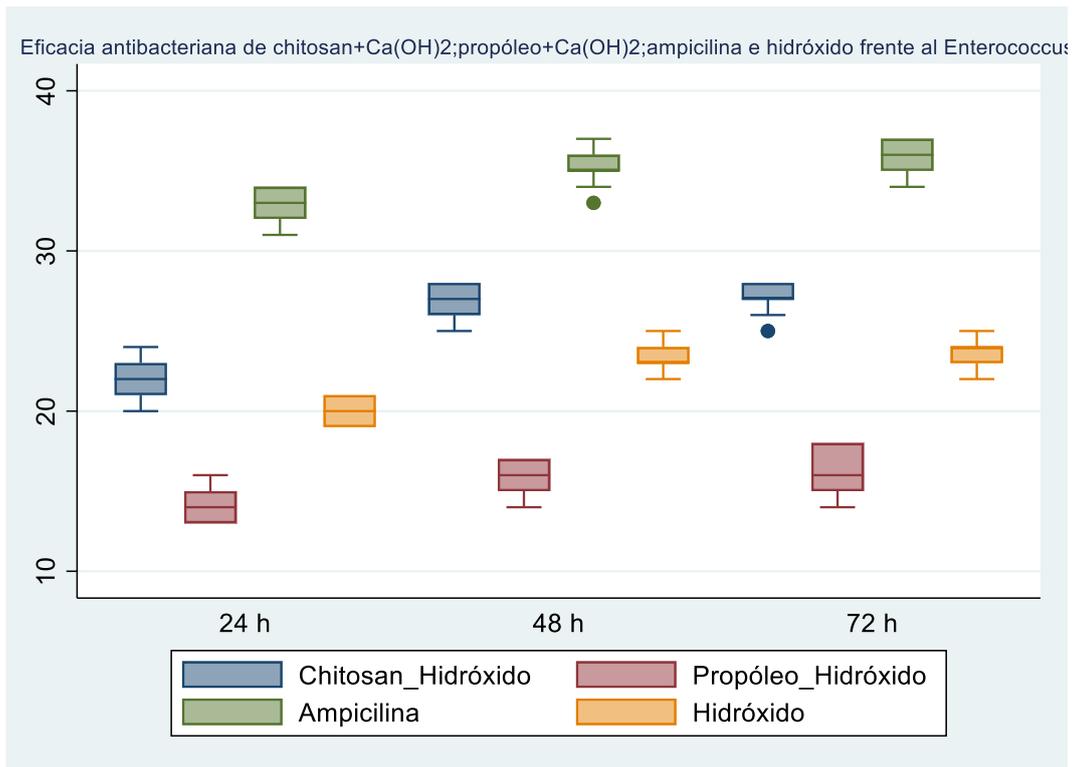
Periodo de incubación	n	Promedio	E.E.	Mediana	DIQ	Min	Max	P
<b>24 h</b>								
<b>Chitosan-Hidróxido</b>	11	21.8	0.4	22	1	20	24	0.0001
<b>Propóleo-Hidróxido</b>	11	14.4	0.4	14	1	13	16	

<b>Ampicilina</b>	11	33.1	0.3	33	1	31	34	
<b>Hidróxido</b>	11	19.8	0.3	20	1	19	21	
<b>48 h</b>								
<b>Chitosan-Hidróxido</b>	11	26.7	0.3	27	1	25	28	0.0001
<b>Propóleo-Hidróxido</b>	11	15.8	0.4	16	1	14	17	
<b>Ampicilina</b>	11	35.4	0.4	35	0.5	33	37	
<b>Hidróxido</b>	11	23.4	0.2	23	0.5	22	25	
<b>72 h</b>								
<b>Chitosan-Hidróxido</b>	11	27.2	0.3	27	0.5	25	28	0.0001
<b>Propóleo-Hidróxido</b>	11	16.3	0.4	16	1.5	14	18	
<b>Ampicilina</b>	11	35.9	0.4	36	1	34	37	
<b>Hidróxido</b>	11	23.8	0.3	24	0.5	22	25	

*Nota.* La eficacia antibacteriana a las 24, 48 y 72 horas fue mayor en el grupo que utilizó Ampicilina, seguida por la pasta de Chitosan con Ca(OH)<sub>2</sub> que fue , hidróxido y finalmente por el propóleo con Ca(OH)<sub>2</sub>. Además, las diferencias encontradas en cada periodo de incubación fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). \*Prueba Kruskal Wallis. E.E.=error estándar, DIQ=desviación intercuartil.

#### **Figura 4**

*Comparación de los valores del halo inhibitorio de las sustancias experimentales frente al Enterococcus faecalis ATCC 29212 en un cultivo in vitro*



## V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La regla de oro para lograr un tratamiento endodóntico exitoso es la erradicación completa del proceso infeccioso y la correcta obturación del conducto radicular a fin de prevenir infecciones recurrentes; sin embargo, para obtener este efecto beneficioso es necesario una instrumentación eficiente, uso de soluciones irrigantes, así como también el empleo de medicamentos intraconducto.

Hoy en día las técnicas actuales siguen teniendo ciertas limitaciones en la remoción completa de las bacterias dentro del canal radicular radicado ahí la complejidad de la desinfección del conducto radicular, por tanto, un solo irrigante, un medicamento o un antibiótico no podrían dar como resultado una esterilización efectiva del conducto radicular.

Según Shaik (2014) la combinación de soluciones irrigantes o medicamentos intraconducto disminuye el desarrollo y progreso de cepas bacterianas resistentes ya que produce un efecto sinérgico, como resultado la acción antimicrobiana dura más y mantiene la liberación de los medicamentos; además, “el efecto antimicrobiano dependiente del tiempo puede resultar sienta muy útil en la terapia clínica para desinfectar eficientemente el sistema de conductos radiculares” (Parolia et al., 2020).

*Enterococcus faecalis* una de los microorganismos más resistente y persistente debido a su capacidad de sobrevivir formando biopelículas calcificadas en los túbulos dentinarios y resistir la alcalinidad del hidróxido de calcio (Harshitha et al., 2022); por lo tanto, en el presente estudio, se evaluó la eficacia antibacteriana de los medicamentos intraconducto contra la cepa de *Enterococcus faecalis* en tres intervalos de tiempo

Según Jaiswal y colaboradores en el 2017, concluyeron que el quitosán y el propóleo como irrigantes tuvieron efectos antibacterianos similares frente al *Enterococcus Faecalis*. En consecuencia, tanto el quitosán como el propóleo son eficaces en la eliminación bacteriana ya

sea que se utilicen como material irrigante o como medicamento intracanal entre sesiones cita durante el tratamiento de endodoncia.

En este estudio, demostramos que la pasta de nanopartículas de Chitosan combinado con el  $\text{Ca(OH)}_2$ , el propóleo asociado al  $\text{Ca(OH)}_2$  y el  $\text{Ca(OH)}_2$  tienen una buena eficacia antibacteriana frente a la cepa bacteriana *Enterococcus faecalis* en este estudio in vitro tanto en las 24, 48 y 72 horas; especialmente la pasta de nanopartículas de chitosan asociado al hidróxido de calcio obteniendo un halo de inhibición de mayor diámetro seguido del hidróxido de calcio y finalmente por el propóleo asociado al hidróxido de calcio, de manera que, comparando al chitosan nanopartículas con el hidróxido y la asociación del propóleo con el hidróxido de calcio se encontró diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados conseguidos en este estudio guardan cierta similitud a los datos alcanzados en la investigación realizada por Del Carpio- Perochena y colaboradores en el 2017, donde incorporó Chitosan nanopartículas y Extracto de propóleo al Hidróxido de calcio a fin de determinar la eficacia antibacteriana de ambos sustratos naturales donde descubrió que la incorporación de nanopartículas fue potencialmente beneficiosa cuando se usan medicamentos intraconducto entre citas debido a su capacidad para erradicar bacterias tanto a corto como a largo plazo.

En el estudio in vitro efectuado por Acosta en el 2017, donde comparó la actividad antimicrobiana del gel chitosan/propóleo, el hidróxido de calcio (Calcifar-P), extracto de propóleo al 30%, gel de clorhexidina al 2% y el chitosan gel; frente al *Enterococcus Faecalis* realizando el método Kirby – Bauer modificado, obteniendo como respuesta a su investigación que el gel de chitosan más propóleo obtuvieron un halo de 22.36 mm de diámetro, seguido por el gel de chitosan con 17.71 mm, luego la clorhexidina con 15.86 mm, hidróxido de calcio con 13.93 mm y finalmente el extracto de propóleo con 11.36 mm; en el presente estudio el diámetro del halo del hidróxido de calcio fue menor que el halo formado por el chitosan, lo

cual concuerda con el estudio realizado por Acosta, ya que en su investigación el Chitosan presentó mejor eficacia antimicrobiana que la pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$ .

A lo anterior se puede añadir que resultados semejantes fueron reportados por Morales en el 2019 en el cual comparó la eficacia del chitosan y el  $\text{Ca(OH)}_2$  frente al *Enterococcus faecalis*; donde la eficacia se determinó a por medio de la medida de la dimensión del diámetro del halo de inhibición formado, los hallazgos adquiridos revelaron que, el chitosan al 3.0% fue más eficiente frente al hidróxido de calcio al 0.2%, dado que el halo de inhibición máximo del chitosan al 3.0% fue 22mm, en tanto que la dimensión del halo de inhibición máximo del hidróxido de calcio obtuvo una medida de 13mm.

De forma similar Harshitha y colaboradores en el 2022 compararon la eficacia antimicrobiana de la nisina, el  $\text{Ca(OH)}_2$  y la pasta antibiótica triple (TAP) mezcladas con agua destilada y chitosan frente a la cepa *Enterococcus faecalis*, donde a las 24hrs los resultados obtenidos de la asociación del  $\text{Ca(OH)}_2$  con el Chitosan tuvieron mejor eficacia en comparación de la mezcla de  $\text{Ca(OH)}_2$  con agua destilada.

Por otro lado, resultados coincidentes con la presente investigación también fueron reportados por Teja y colaboradores en el (2023) donde compararon la eficacia antibacteriana sinérgica de diferentes combinaciones de hidróxido de calcio como medicamento intraconducto entre los cuales también utilizó el Chitosan frente al *Enterococcus faecalis* encontrando un efecto sinérgico con el hidróxido de calcio, mostrando una mejor reducción bacteriana en la combinación de ambos medicamentos en contraste con el hidróxido de calcio solo.

Sin embargo, otro estudio evidencia resultados contradictorios; como el trabajo realizado por S R y colaboradores en el 2023 donde la carga microbiana del hidróxido de calcio en asociación tanto con el chitosan y solución salina medida al día 2 y al día 7, mostraron recuentos de UFC elevados con una medida de 38 y 19.4 al día 2 y 16.8 y 4.4 al día 7

respectivamente. La razón de esta disparidad en los resultados obtenidos podría ser por la metodología empleada ya que el mismo autor menciona en el estudio que el polvo de Hidróxido de calcio mostró poca miscibilidad frente a la asociación con las nanopartículas de quitosán usado como vehículo, produciendo una mezcla granulada no cohesiva; estas características de dicha formulación podrían ser responsables de su efecto antibacteriano disminuido.

El efecto antibacteriano de los medicamentos probados en este estudio mejoró cuando se combinaron con las nanopartículas de quitosán, lo que indica que las nanopartículas de quitosán proporcionan una acción sinérgica cuando se usa como vehículo, aceptándose de esta forma la hipótesis del estudio.

Los resultados sugieren que la inclusión de nanopartículas de quitosán son una alternativa antimicrobiana prometedora para desarrollarse como medicamento intraconducto, particularmente en casos con infección persistente por *Enterococcus faecalis*, sin embargo, se requiere seguir en esta línea de investigación.

## VI. CONCLUSIONES

6.1 La presente investigación determino que las sustancias testeadas presentan actividad antibacteriana in vitro sobre la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 en las 24, 48 y 72 horas.

6.2 La integración de las nanopartículas de quitosan con hidróxido de calcio presentaron mayor eficacia antibacteriana que la combinación del propóleo con el hidróxido de calcio frente a la cepa más persistente *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 a las 24 horas, 48 y 72 hrs.

6.3 La asociación de las nanopartículas de quitosan con el hidróxido de calcio presentaron mayor eficacia antimicrobiana que el hidróxido de Calcio ante la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 en las 24, 48 y 72hrs.

6.4 La asociación del extracto de propóleo con el hidróxido de calcio tuvo la menor medida de halo inhibitorio, sin embargo, según la escala de Duraffourd tiene un efecto muy sensible a las 48 horas.

6.5 La incorporación de las nanopartículas de quitosan exhibieron un efecto positivo en la eficacia antibacteriana sobre la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

## VII. RECOMENDACIONES

7.1 Se recomienda seguir con futuras investigaciones acerca de las propiedades del Chitosan respecto a otras especies bacterianas, ya que existen estudios previos que reportan un comportamiento bactericida y bacteriostático.

7.2 Se sugiere realizar investigaciones con el uso de nanopartículas de chitosan combinadas con otros agentes antibacterianos y antifúngicos con la finalidad de buscar sinergismo y así potenciar su acción.

7.3 Se propone para las futuras investigaciones que deseen desarrollar un estudio similar, producir las propias nanopartículas de chitosan variando el peso molecular y su grado de desacetilación a fin de buscar mejor efecto antibacteriano y baja citotoxicidad.

7.4 Se sugiere también investigar la cualidad antibacteriana del chitosan proveniente de la quitina extraída de los: insectos, crustáceos, así como también el chitosan proveniente de la pota y el calamar.

### VIII. REFERENCIAS

- Abdeltwab, W. M., Abdelaliem, Y. F., Metry, W. A. y Eldeghedy, Mahmoud. (2019) Antimicrobial effect of Chitosan and Nano-Chitosan against some Pathogens and Spoilage Microorganisms. *Journal of advanced laboratory research in biology*, 10 (1), 8-15.
- Acosta, L., Gretter. (2017) *Actividad antimicrobiana in vitro del chitosan/propóleo en gel sobre el Enterococcus Faecalis* [Tesis de Especialidad, Universidad de Cuenca, Ecuador].
- Akincibay, H., Şenel, S. y Yetkin Ay, Z. (2007). Application of chitosan gel in the treatment of chronic periodontitis. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 80B(2), 290 – 296. doi:10.1002/jbm.b.30596
- Alvarez, M. (2014) *Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Propolis de Apis Mellifera (propóleo) frente a Enterococcus Faecalis ATCC 29212* [Tesis de maestría, Universidad privada Antenor Orrego]
- Andrade, C. (2021). Uso de propóleo con hidróxido de calcio como medicación intraconducto en periodontitis apical asintomática. Reporte de caso. *Odontoestomatología*, 23(37), e403. <https://dx.doi.org/10.22592/ode2021n37a9>
- Ba-Hattab, R., Al-Jamie, M., Aldreib, H., Alessa, L. y Alonazi, M. (2016) Calcium Hydroxide in Endodontics: An Overview. *Open Journal of Stomatology*, 6, 274-289.
- Bangun, H., Tandiono, S. y Arianto, A. (2018) Preparation and evaluation of chitosan tripolyphosphate nanoparticles suspension as an antibacterial agent. *J App Pharm Sci*, 8(12), 147–156.
- Baranwal R, Duggi V, Avinash A, Dubey A, Pagaria S. y Munot H. (2017) Propolis: A Smart Supplement for an Intracanal Medicament. *Int J Clin Pediatr Dent*; 10(4):324-329.

- Byström, A., Claesson, R. y Sundqvist, G. (1985) The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Dental Traumatology* 1, 170-175.
- Chandna, P., Adlakha, V., Das, S. y Singh, S. (2014). Complementary and alternative medicine (CAM): A review of propolis in dentistry. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 2(6), 670-685.
- Checalla, J. L. y Sánchez, M. A. (2021). Caracterización Química y Actividad Antibacteriana in vitro de un Extracto Etanólico de Propóleo Peruano Frente a *Streptococcus mutans*. *International journal of odontostomatology*, 15(1), 145- 151.
- Chong, B. y Ford, T.P. (1992). The role of intracanal medication in root canal treatment. *Int Endod J*, 25: 97-106.
- Del Carpio-Perochena, A. D., Kishen, A., Felitti, R., Bhagirath, A.Y., Medapati, M.R., Lai, C.K. y Cunha, R.S. (2017). Antibacterial Properties of Chitosan Nanoparticles and Propolis Associated with Calcium Hydroxide against Single- and Multispecies Biofilms: An In Vitro and In Situ Study. *Journal of endodontics*, 43(8), 1332-1336 .
- Divya, K. y Jisha, S. (2017). Chitosan nanoparticles preparation and applications. *Environmental Chemistry Letters*. 16(1), 101–112,
- Evans, M., Davies, J. K., Sundqvist, G. y Figdor, D. (2002). Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *International Endodontic Journal*, 35(3), 221–228. [doi:10.1046/j.1365-2591.2002.00504.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2002.00504.x)
- Figdor, D., Davies, J. K., y Sundqvist, G. (2003). Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral microbiology and immunology*, 18(4), 234–239. <https://doi.org/10.1034/j.1399-302x.2003.00072.x>
- Franchi Jr, G.C., Moraes, C. S., Toreti, V. C, Dausch, A., Nowill, A. E. y Park Y. K. (2012) Comparison of effects of the ethanolic extracts of brazilian propolis on human leukemic

- cells as assessed with the MTT assay. *Evidence - Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 1-6
- Halkai, R., Hegde, M. N. y Halkai, K. (2014) Evaluation of the presence of *Enterococcus faecalis* in root cementum: A confocal laser scanning microscope analysis. *J Conserv Dent*, 17, 119-123.
- Harshitha, V. S., Ranjini, M. A., y Nadig, R. R. (2022). Antibacterial efficacy of nisin, calcium hydroxide, and triple antibiotic paste in combination with chitosan as an intracanal medicament against *Enterococcus faecalis* - An *in vitro* study. *Journal of conservative dentistry : JCD*, 25(5), 504–509. [https://doi.org/10.4103/jcd.jcd\\_125\\_22](https://doi.org/10.4103/jcd.jcd_125_22)
- Hegde V. (2009) *Enterococcus faecalis*: Clinical significance and treatment considerations. *Endodontology*, 21 (2), 48-52.
- Hernandez-Lauzardo, A. N., Velaizquez del Valle, M. G. y Guerra-Sanchez, M.G. (2011) Current status of action mode and effect of chitosan against phytopathogens fungi. *Afr J Microbiol Res* 5(25):4243–4247
- Jaiswal, N., Sinha, D. J., Singh, U. P., Singh, K., Jandial, U. A., y Goel, S. (2017). Evaluation of antibacterial efficacy of Chitosan, Chlorhexidine, Propolis and Sodium hypochlorite on *Enterococcus faecalis* biofilm : An *in vitro* study. *Journal of clinical and experimental dentistry*, 9(9), e1066–e1074. <https://doi.org/10.4317/jced.53777>
- John, G., Kumar, K. P., Gopal S. S., Kumari S., y Reddy B. k. (2015). *Enterococcus faecalis*, a nightmare to endodontist: A systematic review. *African Journal of Microbiology Research*, 9(13), 898–908. [doi:10.5897/ajmr2014.7122](https://doi.org/10.5897/ajmr2014.7122)
- Jonaidi Jafari, N., Kargozari, M., Ranjbar, R., Rostami, H. y Hamedi, H. (2018). The effect of chitosan coating incorporated with ethanolic extract of propolis on the quality of refrigerated chicken fillet. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(1), e13336.

- Kapadia, M., Sirekha, A., Lekha, S., Savitha, B., Vijay, R. y Archana, S. (2018). Comparative evaluation of Chlorhexidine and its Combination with Chitosan as Intracanal Medicaments on *Enterococcus faecalis* in Endodontic Retreatment. *Dentistry* 8(7), 502 [doi:10.4172/2161-1122.1000502](https://doi.org/10.4172/2161-1122.1000502)
- Ke, C. L., Deng, F. S., Chuang, C. Y. y Lin, C. H. (2021). Antimicrobial Actions and Applications of Chitosan. *Polymers*13(6),904. <https://doi.org/10.3390/polym13060904>
- Kishen, A., Shi, Z., Shrestha, A. y Neoh, K. G. (2008). An Investigation on the Antibacterial and Antibiofilm Efficacy of Cationic Nanoparticulates for Root Canal Disinfection. *Journal of Endodontics*, 34(12), 1515–1520. [doi:10.1016/j.joen.2008.08.035](https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.08.035)
- Kumar, A., Tamanna, S. y Iftekhar H. (2019) Intracanal medicaments – Their use in modern endodontics: A narrative review. *J Oral Res Rev*, 11(2), 94-99
- Li, Q., Dunn, E. T., Grandmaison, E. W. y Gossen M. F. A. (1992). Application and properties of chitosan *Journal of bioactive and compatible polymers*, 7(4), 370 - 397
- Li, X., Han, B., Wang X., Gao, X., Liang F., Qu X. y Yang Z. (2015). Chitosan decorated calcium hydroxide microcapsules with pH-triggered release for endodontic applications. *Journal of materials chemistry B*, 1-8. [doi:10.1039/x0xx00000x](https://doi.org/10.1039/x0xx00000x).
- Madarati, A. A., Zafar, M. S., Sammani, A., Mandorah, A. O. y Bani-Younes, H. A. (2017). Preference and usage of intracanal medications during endodontic treatment. *Saudi medical journal*, 38(7), 755-763.
- Martin, D. 1979. Irrigation and medication of the root canal. *International Endodontic Journal*, 12, 55-62.
- Messer, H. H. y Chen, R. S. (1984). The duration of effectiveness of root canal medicaments. *Journal of Endodontics*, 10(6), 240–245.

- Mohammadi, Z., Shalavi, S. y Yazdizadeh, M. (2012). Antimicrobial Activity of Calcium Hydroxide in Endodontics: A Review. *Chonnam Medical Journal*, 48(3),133-140. doi:10.4068/cmj.2012.48.3.133
- Morales, J., Deyna (2019) *Eficacia del chitosan en comparación al hidróxido de calcio sobre enterococcus faecalis* [Tesis para optar el Título de Cirujano Dentista, Universidad Católica de Santa María, Perú].
- Morillo, C. J. y Balseca I. M. (2018) Eficacia inhibitoria del aceite esencial de *Cymbopogon Citratus* sobre cepas de *Porphyromona gingivalis*: Estudio in vitro. *Odontología*. 20(2):5-3. <http://dx.doi.org/10.29166/odontologia.vol20.n2.2018-5-13>
- Mustafa, M., Alaajam, W., Azeim, A., Alfayi, N., Alqobty, R. y Alghannam, S. (2018) Diffusion of calcium hydroxide through dentinal tubules of retreated root canals: An in vitro study. *European Journal of Dentistry*, 12(3), 386 - 392. doi:10.4103/ejd.ejd\_77\_18.
- Nakajo, K., Nakazawa, F. y Iwaku, M. (2004). Alkali-resistant bacteria in root canal systems. *Oral Microbiol Immunol*, 19, 390 – 394.
- Parolia, A., Kumar, H., Ramamurthy, S., Davamani, F., y Pau, A. (2020). Effectiveness of chitosan-propolis nanoparticle against *Enterococcus faecalis* biofilms in the root canal. *BMC oral health*, 20(1), 339. <https://doi.org/10.1186/s12903-020-01330-0>
- Pérez, A. R., Díaz-Flores, G. V., Algar, P. J., Valencia, D. O., Estévez, L. R. y Cisneros, C. R. (2013). Actualización en microbiología endodóntica. *Cient. Dent*, 10 (1), 27-39.
- Przybyłek, I., y Karpiński, T. M. (2019). Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(11), 2047. <https://doi.org/10.3390/molecules24112047>
- Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C. y Zou, X. (2004). Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research*, 339 (16), 2693- 2700, doi:10.1016/j.carres.2004.09.007

- Raafat, D., y Sahl, H. G. (2009). Chitosan and its antimicrobial potential--a critical literature survey. *Microbial biotechnology*, 2(2), 186–201. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00080.x>
- Reshad, R. A. I., Jishan, T. A., y Chowdhury, N. N. (2021). Chitosan and its Broad Applications: A Brief Review. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 12(4), em00779. <https://doi.org/10.29333/jcei/11268>
- S R, S., Singh, S., Hindlekar, A., Desai, N., y Vyavahare, N. (2023). Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Various Antibiotic Pastes and Calcium Hydroxide Using Chitosan as a Carrier Against *Enterococcus faecalis*: An In Vitro Study. *Cureus*, 15(8), e43541. <https://doi.org/10.7759/cureus.43541>
- Sabarathinam, J., Muralidharan, N. P. y Pradeep (2018) Antimicrobial efficacy of four different intracanal medicaments on contaminated extracted teeth: In vitro study. *Drug invention today*, 10(2), 3026-3029.
- Shaik, J., Garlapati, R., Nagesh, B., Sujana, V., Jayaprakash, T. y Naidu, S. (2014) Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of triple antibiotic paste and calcium hydroxide using chitosan as carrier against *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*: An in vitro study. *Journal of Conservative Dentistry*, 17(4), 335-339
- Shamma, B. M., Kurdi, S. A., Rajab, A., y Arrag, E. A. (2023). Evaluation of antibacterial effects of different intracanal medicaments on *Enterococcus faecalis* in primary teeth: An in vitro study. *Clinical and experimental dental research*, 9(2), 341–348. <https://doi.org/10.1002/cre2.718>
- Shrestha, A., Shi, Z., Neoh, KG. y Kishen, A. (2010). Nanoparticulates for antibiofilm treatment and effect of aging on its antibacterial activity. *J Endod*, 36(6), 1030–1035
- Simi Júnior, J., Machado, R., Stiz, R., Figueiredo, C., Vansan, L., Ferrari, C., Back, E. y Silva, E. (2016). Antimicrobial activity of calcium hydroxide associated with a new vehicle

- (Triethanolamine). *Brazilian Dental Science*, 19(1), 43-47.  
doi:10.14295/bds.2016.v19i1.1179
- Singh, D., Shashi, A., Alok, M. y Kaushal, K. (2015) Advancement of chitosan-based nanoparticles for targeted drug delivery of antiulcer drugs. *World J Pharm Pharm Sci*, 4(1) 505-518.
- Siqueira, J. F. y Lopes, H. P. (1999). Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *International Endodontic Journal*, 32(5), 361- 369.  
doi:10.1046/j.1365-2591.1999.00275.x
- Sjogren U, Figdor D, Persson S, et al. (1997). Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*, 30, 297–306.
- Teja, K. V., Janani, K., Srivastava, K. C., Shrivastava, D., Natoli, V., Di Blasio, M., Cicciu, M., y Minervini, G. (2023). Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of different combinations of calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis*. *BMC oral health*, 23(1), 849. <https://doi.org/10.1186/s12903-023-03552-4>
- Torres-Mantilla, Jose. (2019) Comparación del efecto antibacteriano de un extracto etanólico de propóleo a dos concentraciones y del paramonoclorofenol alcanforado frente a *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*. *Revista Científica Odontológica*, 7(1), 53-65. <https://doi.org/10.21142/2513-2754>
- Wong, J., Manoil, D., Näsman, P., Belibasakis, G. N. y Neelakantan, P. (2021) Microbiological Aspects of Root Canal Infections and Disinfection Strategies: An Update Review on the Current Knowledge and Challenges. *Frontiers in Oral Health*, 2, <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/froh.2021.672887>
- Yadav, P., Chaudhary, S., Saxena, R. K., Talwar, S. y Yadav S. (2017) Evaluation of Antimicrobial and Antifungal efficacy of Chitosan as endodontic irrigant against

Enterococcus Faecalis and Candida Albicans Biofilm formed on tooth substrate. *J Clin Exp Dent*, e361-e367.

## IX.ANEXOS

Anexo A: Permiso de ejecución de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Federico Villarreal.

 <p>Universidad Nacional <b>Federico Villarreal</b></p>	<p><b>FACULTAD DE ODONTOLOGÍA</b></p>
<p>AÑO DE LA UNIVERSALIZACIÓN DE LA SALUD</p> <hr style="border: 0.5px solid black;"/> <p>OFICINA DE GRADOS Y GESTIÓN DEL EGRESADO</p>	
<p><b><u>CONSTANCIA</u></b></p>	
<p>LA OFICINA DE GRADOS Y GESTIÓN DEL EGRESADO DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL FEDERICO VILLARREAL</p>	
<p><b>DEJA CONSTANCIA:</b></p>	
<p><i>Que el presente, tema: "EFICACIA ANTIBACTERIANA DE NANO PARTICULAS DE CHITOSAN, PROPOLEO E HIDROXIDO DE CALCIO COMO MEDICAMENTO INTRACONDUCTO FRENTE AL ENTEROCOCCUS FAECALIS", del Plan de Tesis de la Bachiller SALDIVAR ORIHUELA LORENA ADELINA se encuentra APROBADO, según (R.R. N°2900-2018-CU-UNFV y su modificatoria R.R. N°4211-2018-CU-UNFV) para su ejecución y dar término, para la obtención del Título Profesional de Cirujano Dentista, de acuerdo a las pautas y correcciones respectivas.</i></p>	
<p><i>Se expide la presente constancia a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.</i></p>	
<p>Pueblo Libre, 10 de marzo de 2020</p>	
	
	
<p><b>Mg. CARMEN ROSA HUAMANI PARRA</b> JEFA (e) OFICINA DE GRADOS y GESTIÓN DEL EGRESADO</p>	
<p>N° 010-2020 CRHP/LVB</p>	
<hr style="border: 0.5px solid black;"/> <p style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span>Calle San Marcos N° 351 – Pueblo Libre</span> <span>Telef: 7480888 - 8335</span> </p>	

Anexo B: Carta de presentación dirigida a la Facultad de Tecnología Médica de la Universidad Nacional Federico Villarreal para uso de Laboratorio.



Universidad Nacional  
**Federico Villarreal**

**FACULTAD DE  
ODONTOLOGÍA**

“Año de la Unidad, la Paz y el Desarrollo”

**OFICINA DE GRADOS Y GESTIÓN DEL EGRESADO**

Pueblo Libre, 2 de febrero de 2023

**Doctora**  
**REGINA MEDINA ESPINOZA**  
**DECANA - FACULTAD DE TECNOLOGÍA MÉDICA**  
**UNIVERSIDAD NACIONAL FEDERICO VILLARREAL**

**Atención: Dra. JESSICA ASTETE MEDRANO**  
**LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA**

**Presente .-**

De mi especial consideración:

Tengo el agrado de dirigirme a usted, con la finalidad de presentarle a la Bachiller en Odontología Srta. Lorena Adelina Saldívar Orihuela, quien se encuentra realizando el Plan de Tesis titulado:

**«EFICACIA ANTIBACTERIANA DE NANO PARTICULAS DE CHITOSAN,  
PROPOLEO E HIDROXIDO DE CALCIO COMO MEDICAMENTO INTRACONDUCTO  
FRENTE AL ENTEROCOCCUS FAECALIS»**

En tal virtud, mucho agradeceré le brinde las facilidades del caso a la Srta. Saldívar para:

- ✓ Uso del Laboratorio de Microbiología y equipo, cabe señalar que la bachiller cuenta con los insumos necesarios, los cuales junto al material adquirido, serán entregados en calidad de donación, al finalizar el trabajo de investigación.

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para renovarle los sentimientos de mi especial consideración.

Atentamente



**DR. FRANCO RAÚL MAURICIO VALENTÍN**  
**DECANO**



**Dr. AMÉRICO A. MUNAYCO MAGALLANES**  
**JEFE**  
**OFICINA DE GRADOS Y GESTIÓN DEL EGRESADO**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

Se adjunta: Plan de Tesis

001-2023

NT: 006436 - 2023

AAMM/Luz V.

Calle San Marcos N°351 – Pueblo Libre  
8335  
e-mail: ogt.fo@unfv.edu.pe

Telef.:7480888 -

Anexo C: Carta de autorización para el uso del Laboratorio de la Facultad de Tecnología Médica de la Universidad Nacional Federico Villarreal.



**Universidad Nacional  
Federico Villarreal**

Facultad de Tecnología Médica

"Año de la Unidad, la Paz y el Desarrollo"

DEPARTAMENTO ACADÉMICO

Lima, 05 de diciembre de 2023

**OFICIO N° 382-2023-DA-FTM-UNFV**

Magister  
**DAVID FELIX LAZÓN MANSILLA**  
Responsable del Laboratorio Central  
**Presente. –**

**Asunto:** Autorización para realizar trabajo de Investigación

**Referencia:** Carta S/N

Por medio del presente documento se regulariza la **AUTORIZACIÓN** a la Bachiller en Odontología Lorena Adelina Saldívar Orihuela, quien ha realizado su trabajo de Investigación de Plan de Tesis titulado: **"EFICACIA ANTIBACTERIANA DE NANO PARTICULAS DE CHITOSAN PROPOLEO E HIDROXIDO DE CALCIO COMO MEDICAMENTO INTRACONDUCTO FRENTE AL ENTEROCOCCUS FAECALIS"**, realizado en el Laboratorio Central de la Facultad de Tecnología Médica teniendo como asesora a la Dra. Delia Jessica Astete Medrano a partir del 15 de marzo al 30 de noviembre del año en curso.

Sin otro particular aprovecho la oportunidad para expresarle las muestras de mi consideración y estima.

Atentamente

  
Mg. César Enrique Guerrero Barrantes  
**DIRECTOR (e)**  
DEPARTAMENTO ACADÉMICO

NT. 006436

CC. Dra. Delia Jessica Astete Medrano  
Lorena Adelina Saldívar Orihuela

Jr. Río Chepén N° 290, El Agustino  
Telefax: 3627477

Anexo D: Determinación del tamaño de la muestra.

<b>COMPARACIÓN DE DOS MEDIAS</b>	
(Se pretende comparara si las medias son diferentes)	
Indique número del tipo de test	
Tipo de test (unilateral o bilateral)	1 UNILATERAL
Nivel de confianza o seguridad (1- $\alpha$ )	95%
Poder estadístico	90%
Precisión (d) (Valor mínimo de la diferencia que se desea detectar, datos cuantitativos)	2.00
Varianza ( $S^2$ ) (De la varianza cuantitativa que tiene el grupo control o de referencia)	1.77
<b>TAMANO DE LA MUESTRA (n)</b>	<b>8</b>
<b>EL TAMANO MUESTRAL AJUSTADO A PERDIDAS</b>	
Proporción esperada de pérdidas (R)	15%
<b>MUESTRA AJUSTADA A LAS PÉRDIDAS</b>	<b>9</b>

Beatriz López Calviño  
Salvador Pita Fernández

## Anexo E: Recibo de compra de Chitosan Nanopartículas

**Nanoshel-UK Ltd.****www.nanoshel.com, cmg@nanoshel.com***Budget/Quote/Pricing Information***Prepared For :**

Federico Villarreal University  
 Department of Dentistry  
 2425 Bretsdale Rd  
 Duluth, GA 30096 Estados Unidos  
 Peru

Date: 15-11-2021

Quote#: SQ/21-22/37218

## Nanoshel Product Pricing

S.No.	Description of Goods	HSN	Qty.	Price/Unit	Unit	Amount(US\$)
1.	Chitosan Nano Particles CGH11NO4, Puirty: >99%, APS: 80-100nm High Purity Nano Chitosan Nanopowder CAS: 9012-76-4 Lead Time 2-3 Weeks NS6130-09-918	39139090	25.00	10.000	Gms	250.00

<b>SHE Charges</b>	:	\$	<b>5.00</b>
<b>VAT@20%</b>	:	\$	<b>0.00</b>
<b>Duty(Import)</b>	:	\$	<b>0.00</b>
<b>Freight</b>	:	\$	<b>100.00</b>
<b>Banking Charges</b>	:	\$	<b>50.00</b>
<b>Total</b>	:	\$	<b>405.00</b>

**Quotation Terms**

- Prices (DDU) Delivery By DHL/UPS
- Delivery Time: 2-3 Weeks after receipt of Payment
- 100% payment in Advance against Performa Invoice by Telegraphic Transfer/Credit Card**
- Banking Details/Credit Card Details on Order Confirmation
- Quotation Validity - 60 Days
- Country Of Origin - India
- Terms: Delivery Duty Un-Paid (DDU)
- Test Report with material is only valid document. Any other document are not valid.**
- \*Exchanges of materials/products are not permitted. Nanoshel does not offer refunds.**
- \*US Dollar Cheques Not Accepted, Only Bank TT/Credit Cards Accepted**



**NANOSHEL UK Ltd**  
 Chapel House, Chapel St, Cheshire, CW12 4AB, UK  
 Direct Dial: (UK) +44 203 137 5187

## Anexo F: Especificaciones del Chitosan Nanopartículas

**Intelligent Materials Pvt. Ltd.**

www.nanoshel.com, sales@nanoshel.com



## Specification Sheet

**Chitosan Nanoparticles**

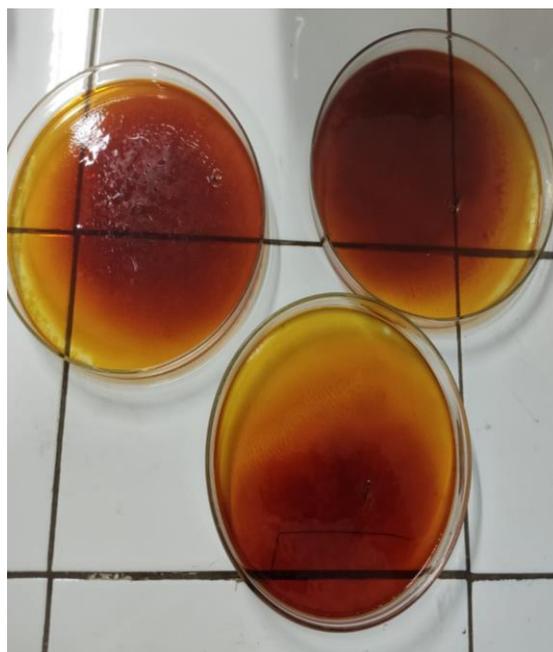
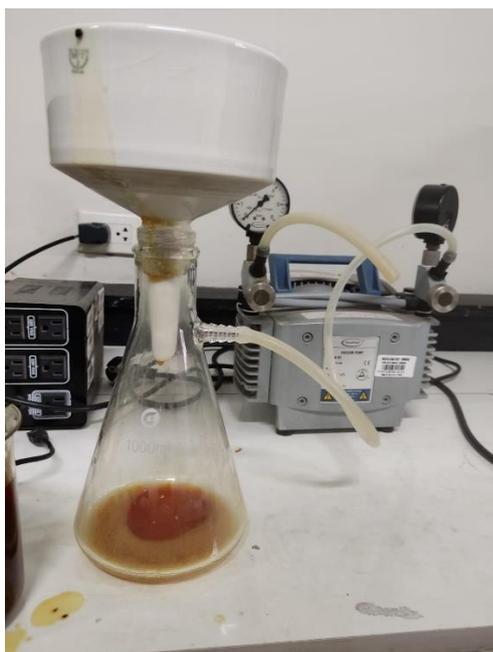
( $C_6H_{11}NO_4$ , Purity: >99%, APS: 80-100nm)

Stock No: NS6130-09-918, CAS: 9012-76-4

<b>Product</b>	:	<b>Chitosan Nanoparticles</b>
Stock No	:	NS6130-09-918
CAS	:	9012-76-4
APS	:	80-100nm
Purity	:	>99%
Molecular Formula	:	$C_6H_{11}NO_4$
Molecular Weight	:	161g/mol
Appearance	:	White Powder
Specific Gravity (Water=1)	:	1.4
Solubility	:	Soluble Dilute Aqueous Acid
<b>Main Inspect Verifier</b>	:	<b>Manager QC</b>
<b>Version</b>	:	<b>1.1</b>

**Note:** Product Specification are subject to amendment and may change over time

## Anexo G: Fotografías de la elaboración de Extracto Hidroalcohólico de propóleo al 30%



## Anexo H: Reporte del Análisis del extracto Hidroalcohólico de Propóleo al 30%.

	<b>Universidad Nacional Mayor de San Marcos</b> Universidad del Perú. Decana de América <b>Facultad de Farmacia y Bioquímica</b> CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO – CCA	
<b>REPORTE DE ANÁLISIS N° 00272-CCA-2023</b>		
<b>SOLICITADO POR*</b>	: LORENA SALDIVAR ORIHUELA	
<b>DIRECCIÓN*</b>	: Jr. Zorritos 1134	
<b>MUESTRA*</b>	: <b>PROPÓLEO</b>	
<b>DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO RECEPCIONADO</b>	: Bolsa de plástico con rotulado a mano	
<b>VARIEDAD RECEPCIONADA*</b>	: -	
<b>PRINCIPIO ACTIVO*</b>	: - N° CAS*: -	
<b>NÚMERO DE LOTE*</b>	: -	
<b>CANTIDAD</b>	: 1Kg aprox.	
<b>ORDEN DE ANÁLISIS</b>	: 0210-2023	
<b>FECHA DE RECEPCIÓN</b>	: 23 de agosto del 2023	
<b>FECHA DE FABRICACIÓN*</b>	: -	
<b>FECHA DE VENCIMIENTO*</b>	: -	
<b>EJECUCIÓN DEL ENSAYO</b>	: Del 29 de agosto de 2023 al 15 de setiembre de 2023	
<b>FECHA DE EMISIÓN</b>	: 25 de setiembre de 2023	

ENSAYO	CONCENTRACIÓN	RESULTADOS
EXTRACTO ALCOHOLICO	30% (p/v)	Conforme

  
**Q.F. Paul Iván Gutiérrez Escano**  
 Director del Centro de Control Analítico



\*Datos proporcionados por el cliente.  
Los resultados son válidos solo para la muestra ensayada.

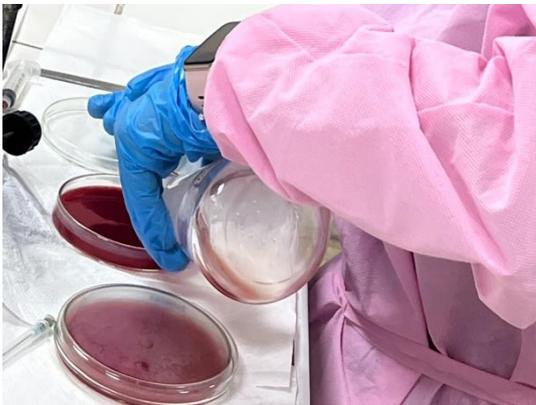
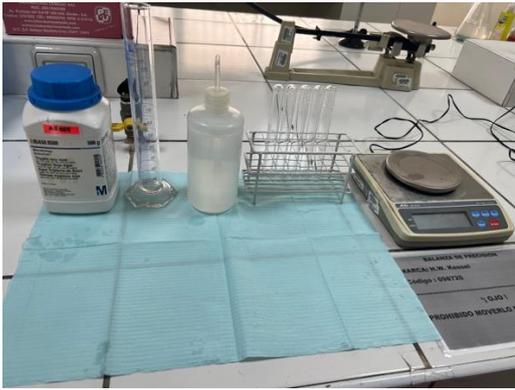
**"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"**

Jr. Puno N° 1002, Jardín Botánico – Lima 1 – Perú Teléfonos: 619-7000 anexo 4824 - 982949135 – Lima 1  
 E-mail: [cca.farmacia@unmsm.edu.pe](mailto:cca.farmacia@unmsm.edu.pe) <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

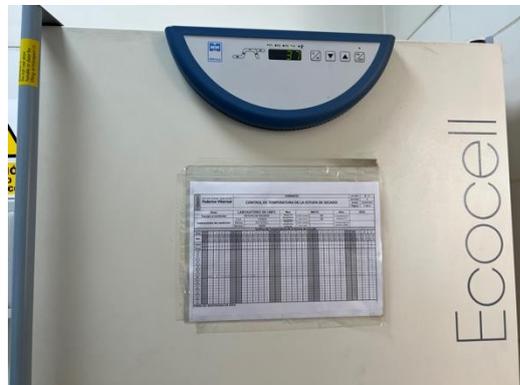
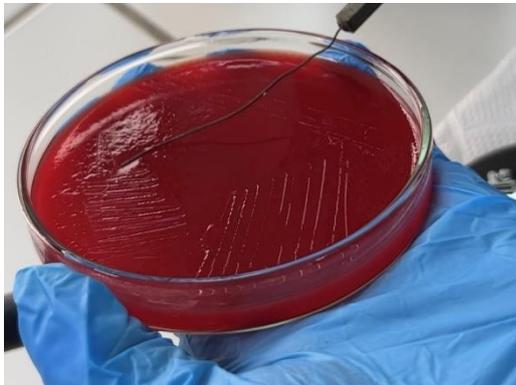
Anexo I: Recibo de compra de la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

 <b>GenLab</b> del Perú	<b>Gen Lab del Perú S.A.C</b> Jr. Capac Yupanqui N°. 2434 Lince - Lima - Perú Central Telefónica (51-1) 203-7500, (51-1) 203-7501 Email : ventas@genlabperu.com Web Site : www.genlabperu.com	<b>RUC N°:20501262260</b> <b>FACTURA</b> <b>ELECTRONICA</b> <b>F002-002230</b>																																						
	Page 1 of 1																																							
<b>Fecha emisión :</b> 21/06/2022 <b>Fecha Vcto :</b> 21/06/2022 <b>Cliete:</b> UNIVERSIDAD NAC. FEDERICO VILLARREAL <b>Dirección:</b> CAL.CARLOS GONZALES NRO. 285 RES. SAN MIGUEL SAN MIGUEL - LIMA - LIMA - Peru <b>Tipo Mov. :</b> ANTICIPOS <b>Lugar de destino :</b> JR. ZORRITOS 1134 - CERCADO DE LIMA	<b>Orden Compra:</b> GL - 22 / 052718 <b>Guia de Remisión :</b> <b>N° Pedido :</b> 030790  <b>RUC :</b> 20170934289																																							
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Código</th> <th style="text-align: left;">Descripción</th> <th style="text-align: center;">Cant</th> <th style="text-align: center;">U/M</th> <th style="text-align: center;">Valor Unit.</th> <th style="text-align: center;">Dscto</th> <th style="text-align: center;">Sub-Total</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>H05267-A</td> <td>KWIK-STIK Enterococcus faecalis derived from ATCC® 29212™</td> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">UND</td> <td style="text-align: right;">381.5300</td> <td style="text-align: center;">0.00</td> <td style="text-align: right;">381.53</td> </tr> </tbody> </table>	Código	Descripción	Cant	U/M	Valor Unit.	Dscto	Sub-Total	H05267-A	KWIK-STIK Enterococcus faecalis derived from ATCC® 29212™	1	UND	381.5300	0.00	381.53																										
Código	Descripción	Cant	U/M	Valor Unit.	Dscto	Sub-Total																																		
H05267-A	KWIK-STIK Enterococcus faecalis derived from ATCC® 29212™	1	UND	381.5300	0.00	381.53																																		
	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th colspan="4" style="text-align: center;">CONTADO</th> </tr> <tr> <th style="text-align: left;">Cuotas</th> <th style="text-align: left;">Forma Pago</th> <th style="text-align: left;">Importe</th> <th style="text-align: left;">Fecha Venc.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td>Contado S/</td> <td style="text-align: right;">450.21</td> <td>21/06/2022</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Retención(3.00%) S/</td> <td style="text-align: right;">0.00</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>Detracción(12.00) S/</td> <td style="text-align: right;">0.00</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>Penalidad</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td><b>Monto Pendiente de Pago</b> S/</td> <td style="text-align: right;"><b>450.21</b></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	CONTADO				Cuotas	Forma Pago	Importe	Fecha Venc.	1	Contado S/	450.21	21/06/2022		Retención(3.00%) S/	0.00			Detracción(12.00) S/	0.00			Penalidad				<b>Monto Pendiente de Pago</b> S/	<b>450.21</b>		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tbody> <tr> <td style="text-align: right;"><b>Sub-Total</b></td> <td style="text-align: right;">381.53</td> </tr> <tr> <td><b>Anticipo</b></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: right;"><b>Op. Gravada</b> S/</td> <td style="text-align: right;">381.53</td> </tr> <tr> <td style="text-align: right;"><b>IGV 18%</b></td> <td style="text-align: right;">68.68</td> </tr> <tr> <td style="text-align: right;"><b>Importe Total</b> S/</td> <td style="text-align: right;"><b>450.21</b></td> </tr> </tbody> </table>	<b>Sub-Total</b>	381.53	<b>Anticipo</b>		<b>Op. Gravada</b> S/	381.53	<b>IGV 18%</b>	68.68	<b>Importe Total</b> S/	<b>450.21</b>
CONTADO																																								
Cuotas	Forma Pago	Importe	Fecha Venc.																																					
1	Contado S/	450.21	21/06/2022																																					
	Retención(3.00%) S/	0.00																																						
	Detracción(12.00) S/	0.00																																						
	Penalidad																																							
	<b>Monto Pendiente de Pago</b> S/	<b>450.21</b>																																						
<b>Sub-Total</b>	381.53																																							
<b>Anticipo</b>																																								
<b>Op. Gravada</b> S/	381.53																																							
<b>IGV 18%</b>	68.68																																							
<b>Importe Total</b> S/	<b>450.21</b>																																							
<b>CUATROCIENTOS CINCUENTA CON 21/100 SOLES</b>	Representacion Impresa de la Factura Electronica Consulte : <a href="http://cpe.genlabperu.com">http://cpe.genlabperu.com</a>																																							
<b>Observaciones de SUNAT :</b> La FACTURA numero 20501262260-01-F002-002230, ha sido aceptada																																								
Despues de Vencido el plazo de cancelacion, se recargará el interes legal correspondiente. <b>Sirvanse Realizar el Deposito Respectivo a las Siguietes Ctas Bancarias:</b> <b>BCP Soles 193-1440607-0-84      BBVA Soles 0011-0139-0100024183-34</b>																																								

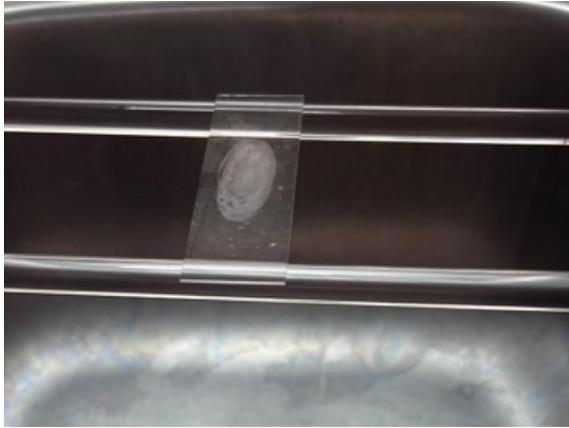
## Anexo J: Preparación del medio de cultivo Agar sangre



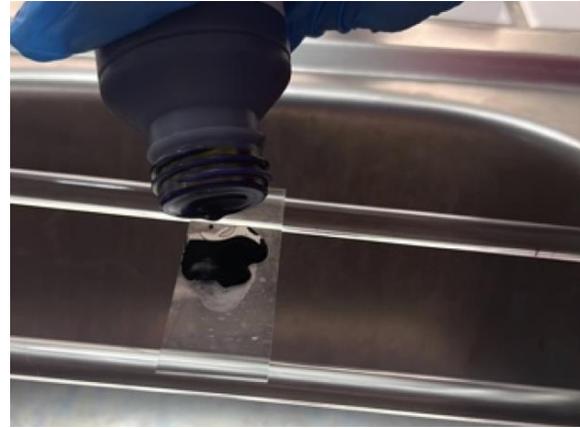
Anexo K: Activación de la Cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212



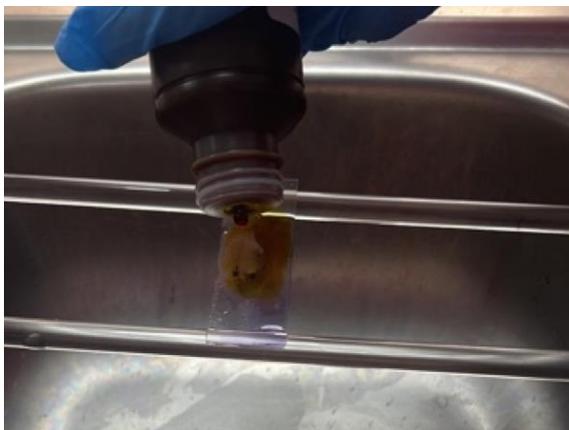
Anexo L: Identificación de la Cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 en Agar Sangre, tinción Gram y luego observación al microscopio



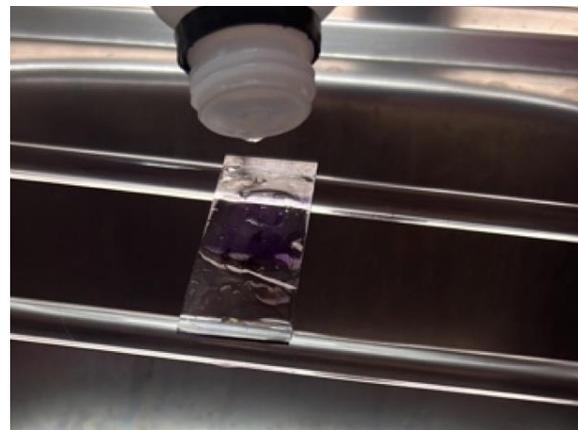
Frotis del cultivo bacteriano fijado en el portaobjeto con calor.



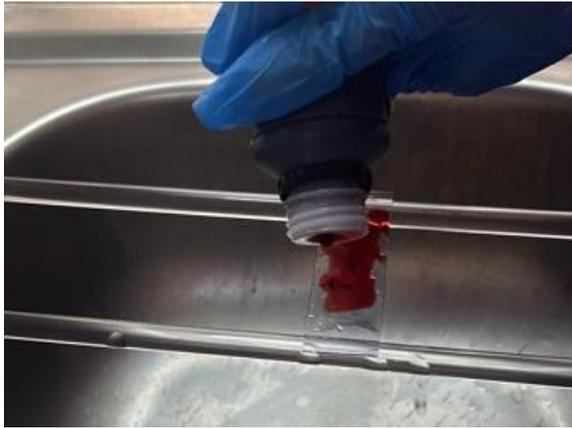
Se agrega colorante Cristal de Violeta al portaobjetos y dejamos actuar durante 60 segundos; luego lavamos con agua a chorro.



Adicionamos Lugol al portaobjetos, dejando actuar durante 60 segundos; lavamos con agua a chorro.



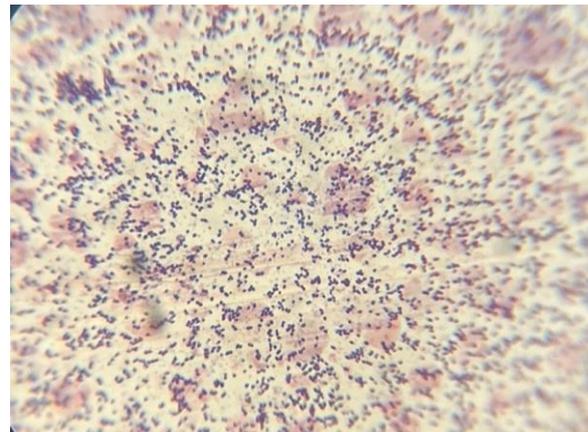
Agregamos decolorante, dejamos actuar durante 30 segundos; volvemos a lavar con agua.



Agregamos Safranina, dejamos actuar durante 90 segundos; volvemos a lavar con agua a chorro.



Dejamos secar el portaobjeto y luego agregamos aceite de inmersión 1 gota para poder observar en el microscopio.



Observación en el microscopio, corroboramos que estamos trabajando bajo una bacteria Gram positiva.

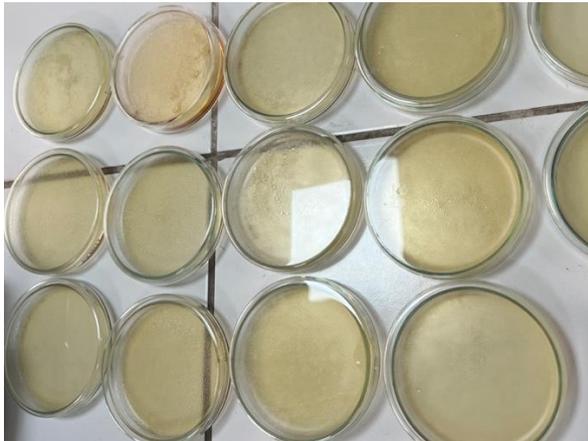
### Anexo M: Preparación del medio de cultivo Agar Müller Hinton.



La preparación del Agar Müller Hinton se hizo siguiendo las indicaciones del fabricante (Himedia) donde se suspende 38gr en 1000ml de agua destilada.

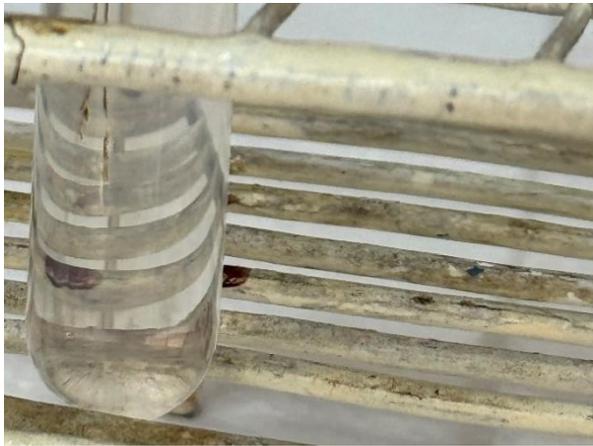


Siguiendo las indicaciones del fabricante se esterilizo en autoclave a una presión de 121° C durante 15min, posteriormente se dejó enfriar, para verter en las placas.



Placas Petri con Agar Muller Hinton;  
todas las placas se estandarizaron a un  
volumen de 20ml de contenido de agar.

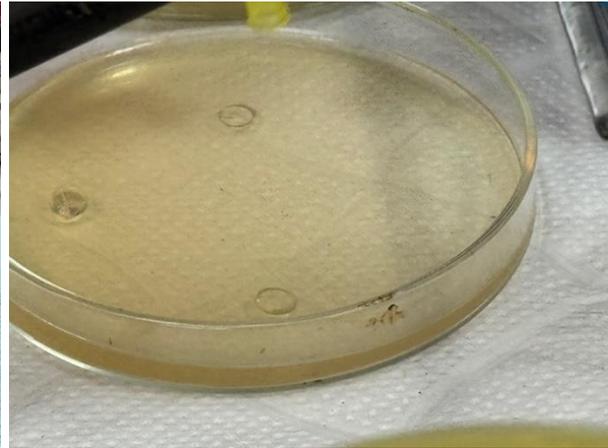
Anexo N: ejecución del procedimiento.



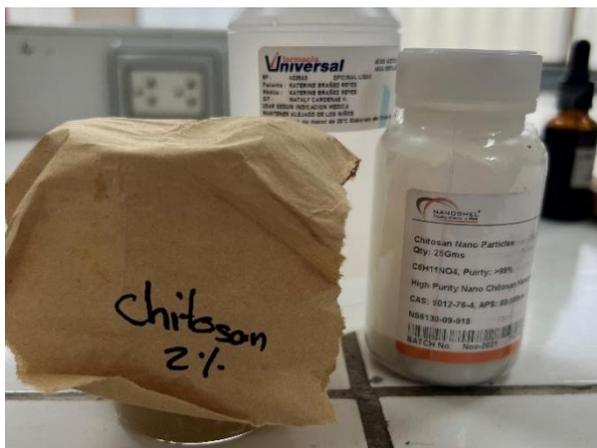
Turbidez equivalente al estándar  
0.5 según la escala Mc Farland



Cultivo de la cepa: retiro del hisopo  
rotando contra la pared para eliminar  
exceso de inóculo

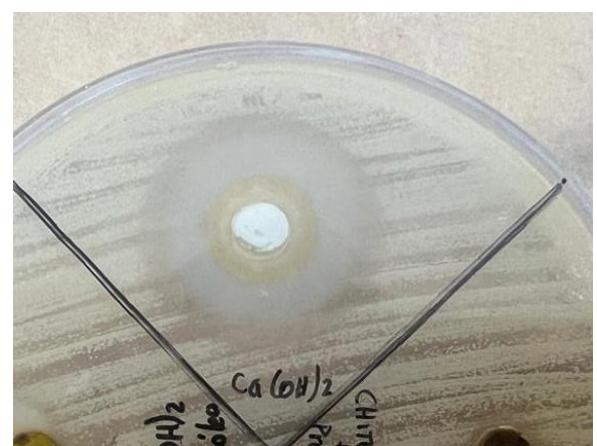
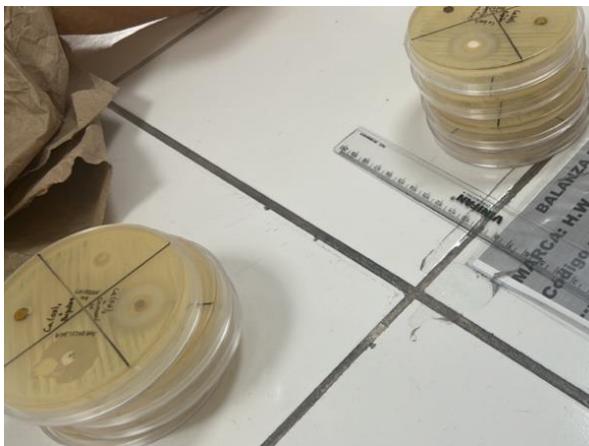
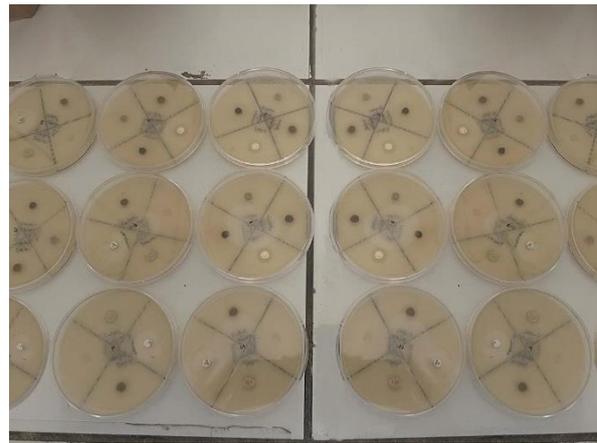


Elaboración de pocillos para la colocación de las sustancias.



Placas en la incubadora a 37° grados para luego ser retiradas a las 24, 48 y 72 horas y realizar la medición de los halos.

## Anexo O: Medición de Halos.



Medición de los halos de inhibición con regla milimetrada.

## Anexo P: Ficha de medición

<b>Resistencia Bacteriana (mm)</b>					
<b>Placas</b>	Periodo de incubación: 24hrs				
<b>Petri</b>	Solución salina	Ampicilina Control positivo	Hidróxido de calcio Ca(OH) <sub>2</sub>	Chitosan Nano Partículas / Hidróxido de calcio	Hidróxido de calcio / Propóleo
<b>1</b>	-	33mm	21mm	24mm	16mm
<b>2</b>	-	34mm	19mm	21mm	15mm
<b>3</b>	-	32mm	20mm	22mm	13mm
<b>4</b>	-	34mm	19mm	23mm	16mm
<b>5</b>	-	32mm	21mm	21mm	14mm
<b>6</b>	-	33mm	20mm	21mm	13mm
<b>7</b>	-	33mm	21mm	22mm	14mm
<b>8</b>	-	34mm	19mm	23mm	15mm
<b>9</b>	-	34mm	20mm	23mm	14mm
<b>10</b>	-	31mm	19mm	20mm	13mm
<b>11</b>	-	34mm	19mm	20mm	15mm

<b>Resistencia Bacteriana (mm)</b>					
<b>Placas</b>	Periodo de incubación: 48hrs				
<b>Petri</b>	Solución salina Control negativo	Ampicilina Control positivo	Hidróxido de calcio Ca(OH) <sub>2</sub>	Chitosan Nano Partículas / Hidróxido de calcio	Hidróxido de calcio / Propóleo
<b>1</b>	-	35mm	24mm	26mm	17mm
<b>2</b>	-	37mm	23mm	25mm	16mm
<b>3</b>	-	34mm	23mm	28mm	14mm
<b>4</b>	-	36mm	23mm	28mm	17mm
<b>5</b>	-	35mm	25mm	27mm	16mm
<b>6</b>	-	35mm	23mm	27mm	15mm
<b>7</b>	-	36mm	24mm	26mm	15mm
<b>8</b>	-	35mm	23mm	28mm	17mm
<b>9</b>	-	36mm	23mm	27mm	16mm
<b>10</b>	-	33mm	22mm	25mm	14mm
<b>11</b>	-	37mm	24mm	27mm	17mm

<b>Resistencia Bacteriana (mm)</b>					
<b>Placas</b>	Periodo de incubación: 72hrs				
<b>Petri</b>	Solución	Ampicilina	Hidróxido de calcio Ca(OH) <sub>2</sub>	Chitosan Nano Partículas / Hidróxido de calcio	Hidróxido de calcio / Propóleo
	salina	Control			
	Control negativo	positivo			
<b>1</b>	-	35mm	25mm	27mm	18mm
<b>2</b>	-	37mm	24mm	25mm	16mm
<b>3</b>	-	34mm	23mm	28mm	14mm
<b>4</b>	-	37mm	24mm	28mm	18mm
<b>5</b>	-	35mm	25mm	28mm	16mm
<b>6</b>	-	36mm	24mm	27mm	15mm
<b>7</b>	-	37mm	24mm	27mm	16mm
<b>8</b>	-	36mm	23mm	28mm	17mm
<b>9</b>	-	37mm	24mm	28mm	16mm
<b>10</b>	-	34mm	22mm	26mm	15mm
<b>11</b>	-	37mm	24mm	27mm	18mm

## Anexo Q: Matriz de consistencia

Problema	Objetivos	Justificación	Hipótesis	Variables	Indicador	Valor	Método
¿Cuál será la eficacia antimicrobiana de las nanopartículas de chitosan asociado al Ca(OH) <sub>2</sub> en comparación al propóleo asociado al Ca(OH) frente al <i>Enterococcus faecalis</i> en un cultivo in vitro?	General:	Existe una opinión ampliamente aceptada de que la limpieza y la conformación del sistema de conducto radicular es el paso más importante hacia la esterilidad del conducto. Sin embargo, la compleja anatomía de los dientes y los conductos radiculares crean un entorno que es un desafío para instrumentar y limpiar. Si bien nuestro conocimiento sobre las bacterias persistentes, los agentes desinfectantes y el medio químico del conducto radicular necrótico ha aumentado	Debido a que el chitosan tiene comprobada acción antibacteriana tanto en cepas Gram-positivas como en Gram-negativas, es probable que la asociación de las nanopartículas de chitosan con el hidróxido de calcio presente mayor acción antibacteriana que la asociación del propóleo con el hidróxido de calcio frente al <i>Enterococcus</i>	V. INDEPENDIENTE			Tipo de investigación:
	Comparar la eficacia antibacteriana de la asociación de nanopartículas de chitosan con Hidróxido de Calcio y la asociación de propóleo con Hidróxido de Calcio frente al <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 en un cultivo in vitro.			Sustancias experimentales	Componentes químicos	- Chitosan nanopartículas asociado al Hidróxido de calcio - Propóleo 3% asociado al Hidróxido de calcio - Hidróxido de Calcio	Experimental, comparativo, longitudinal y prospectivo.  Población:  Cepa patrón de <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212.  Muestra: Para determinar el tamaño muestral se realizó una prueba piloto, y se utilizó la fórmula de comparación de medias
	Específicos:			Efectividad antibacteriana sobre <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212.	Tamaño del diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano	Expresado en mm	Criterios de inclusión:
				V. DEPENDIENTE			

	<p>29212 a las 24 horas, 48 y 72 horas.</p> <p>- Determinar la eficacia antibacteriana in vitro del extracto de propóleo con el Hidróxido de Calcio frente al <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 a las 24, 48 y 72 horas.</p> <p>- Determinar la eficacia antibacteriana in vitro del Hidróxido de Calcio frente al <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 a las 24, 48 y 72 horas.</p>	<p>considerablemente, no hay duda de que se necesita una investigación clínica y básica más innovadora para optimizar el uso de los métodos y materiales existentes</p>	<p><i>faecalis</i> ATCC 29212.</p>				<p>-Cultivos de bacterias de <i>Enterococcus faecalis</i> provenientes de la cepa ATCC 29212 anaerobia facultativa correctamente inoculados. Criterios de exclusión</p> <p>-Placa Petri que presente algún tipo de daño o rajadura en su estructura durante el proceso.</p> <p>-Placa Petri cuyo resultado en el proceso de incubación pueda ser dudoso.</p>
--	---	---	------------------------------------	--	--	--	--