



**UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

“ACITIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DEL CHITOSAN/PROPÓLEO EN GEL SOBRE EL ENTEROCOCCUS FAECALIS”

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN ENDODONCIA**

AUTORA: Od. GRETTER LUACES ACOSTA

CI: 1725233074

DIRECTORA: Esp. KENIA KAREN KUN ASTUDILLO

CI: 0704837475

CUENCA-ECUADOR

2017



RESUMEN

Objetivo: Comparar la eficacia antibacteriana del chitosan/propóleo en gel, con la del hidróxido de calcio (Calcifar-P), la clorhexidina en gel al 2%, el extracto de propóleo al 30% y el gel de chitosan sobre el *Enterococcus faecalis*.

Materiales y métodos: Se realizó un estudio comparativo *in vitro* transversal, utilizando la difusión en agar con el método de Kirby – Bauer. La muestra fue de 14 replicaciones por grupo y se calculó mediante el programa Fisterra. Los halos inhibitorios fueron medidos en milímetros después de 24 horas de incubación, a una temperatura de 37°C, los resultados obtenidos se procesaron por medio de las pruebas estadísticas de Shapiro-Wilk, Kruskal-Wallis y Kolmogorov-Smirnov.

Resultados: La media del halo inhibitorio del gel de chitosan/propóleo fue de 22,36 mm, la del Calcifar-P fue de 13,93 mm, en el caso de la clorhexidina en gel al 2% 15,86 mm, el gel de chitosan tuvo una media de halo inhibitorio de 17,71 mm, el extracto de propóleo al 30 % tuvo la menor media con un valor de 11,36 mm. Ninguno de los anteriores valores superó el control positivo cuya media fue de 34,86 mm.

Conclusión: En este estudio se llegó a la conclusión que el chitosan/propóleo en gel tiene mejor eficacia antimicrobiana comparada con el hidróxido de calcio (Calcifar-P), la clorhexidina en gel al 2%, el extracto de propóleo al 30% y el gel de chitosan.

PALABRAS CLAVES: ENTEROCOCCUS FAECALIS, DIFUSION EN AGAR CON EL METODO DE KIRBY – BAUER, CHITOSAN, PROPOLEO, EFICACIA ANTIBACTERIANA, HALO INHIBITORIO.



ABSTRACT

Purpose: Comparing the antibacterial efficiency of chitosan / propolis gel, calcium hydroxide (Calcifar-P), chlorhexidine gel 2%, 30% propolis extract and chitosan gel on *Enterococcus faecalis*.

Materials and methods: A cross - sectional *in vitro* study was carried out, using agar diffusion with Kirby - Bauer method. The samples were 14 replications per group and were calculated using Fisterra program. The inhibitory halos were measured in millimeters after 24 hours of incubation, at 37 ° C; the results obtained were processed by the statistical tests of Shapiro-Wilk, Kruskal-Wallis and Kolmogorov-Smirnov.

Results: The average of the chitosan / propolis gel inhibitory halo was 22.36 mm, the one with Calcifar-P was 13.93 mm, in the case of chlorhexidine gel 2% 15.86 mm, the chitosan gel had an average inhibitory halo of 17.71 mm, the 30% propolis extract had the lowest average with a value of 11.36 mm. None of the above values exceeded the positive control whose average was 34.86 mm.

Conclusion: This study concluded that chitosan / propolis gel has better antimicrobial efficiency compared with calcium hydroxide (Calcifar-P), 2% gel chlorhexidine, 30% propolis extract and chitosan gel.

Keywords: *Enterococcus faecalis*, agar diffusion with Kirby – Bauer method, chitosan, propolis, antibacterial efficacy, halo inhibitor



ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO	3
DEDICATORIA	8
AGRADECIMIENTO	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1. Planteamiento del problema y justificación	11
2. MARCO TEÓRICO.....	12
2.1 Microbiología en endodoncia	12
2.1.1Tipos de infección.....	13
2.1.2 Enterococcus faecalis	13
2.2 Medicación intraconducto.....	14
2.2.1 Hidróxido de calcio	15
2.2.2 Clorhexidina en gel.....	15
2.2.3 Productos naturales	16
2.2.3.1 Chitosan.....	16
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo general:.....	19
3.2 Objetivos específicos:	19
4. HIPÓTESIS	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS	20
5.1Tipo de estudio.....	20
5.1.2 Universo y muestra	20
5.2 VARIABLES.....	21
5.2.1 Operacionalización de variables	21
5.3 PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS.....	21
5.3.1 Clasificación de los grupos de estudio.....	21
5.3.3 Medición de los halos y recolección de los datos	26
5.3.1 Plan de análisis.....	26



6. RESULTADOS.....	26
8. DISCUSIÓN	40
9. CONCLUSIONES.....	44
10. RECOMENDACIONES	45
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
12. ANEXOS	52



ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS

Tabla 1 Distribución muestral de los grupos de estudio	27
Tabla 2 Distribución según tamaño de los halos inhibitorios.....	28
Tabla 3 Estadística descriptiva del halo inhibitorio del gel de chitosan/propóleo.	
.....	29
Tabla 4 Estadística descriptiva del halo inhibitorio del gel de chitosan	30
Tabla 5 Estadística descriptiva del halo inhibitorio de la clorhexidina en gel al 2%.....	31
Tabla 6 Estadística descriptiva del halo inhibitorio del Calcifar- P.	32
Tabla 7 Estadística descriptiva del halo inhibitorio del extracto de propóleo al 30%.....	33
Tabla 8 Estadística descriptiva del halo inhibitorio de Ampicilina (control positivo).....	34
Tabla 9 Estadística descriptiva del halo inhibitorio del agua destilada (control negativo)	35
Gráfico 1 Estadística descriptiva del halo inhibitorio del agua destilada (control negativo)	36
Tabla 10 Prueba de Kruskal-Wallis entre el gel de chitosan/propóleo y ampicilina.....	37
Tabla 11 Prueba de Kruskal-Wallis entre el gel de chitosan/propóleo y el Calcifar-P.	37
Tabla 12 Prueba de Kruskal-Wallis entre el gel de chitosan/propóleo y clorhexidina en gel al 2%.	38
Tabla 13 Prueba de Kruskal-Wallis entre el gel de chitosan/propóleo y el extracto de propóleo al 30%.....	38
Tabla 14 Prueba de Kruskal-Wallis entre el gel de chitosan/propóleo y el gel de chitosan.....	39
Tabla 15 Prueba de Kruskal-Wallis entre el gel de chitosan/propóleo y el gel de chitosan.....	39



Cláusula de Licencia y Autorización para Publicación en el Repositorio
Institucional

Yo Gretter Luaces Acosta en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación **“ACITIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO DEL CHITOSAN/PROPÓLEO EN GEL SOBRE EL ENTEROCOCCUS FAECALIS”**, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 28 de agosto del 2017.

Gretter Luaces Acosta

C.I: 1725233074



Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo Gretter Luaces Acosta, autora del trabajo de titulación “ACITIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DEL CHITOSAN/PROPÓLEO EN GEL SOBRE EL ENTEROCOCCUS FAECALIS”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 28 de agosto del 2017.

Gretter Luaces Acosta

C.I: 1725233074



DEDICATORIA

Dedico este trabajo a:

A mis hijos Sergio y Sofía que han sido mi inspiración constante, quienes con sus ojitos llenos de ilusión borraban mi cansancio de cada día en este camino tan difícil.

A mi esposo Diego que ha sido mi motor en estos dos duros años, enseñándome que nada es imposible.

A mi familia en la distancia, que siempre creyó en mí.

A todas esas personas anónimas que iluminaron mi camino cuando este se oscureció, abriéndome puertas para alcanzar esta meta.



AGRADECIMIENTO

A Dios, por darme las agallas necesarias para superar esta cuesta y lograr mi propósito.

A mi esposo e hijos por su apoyo, paciencia y comprensión.

A la Dra Kenia Kun Astudillo Directora de tesis, quien, con su guía, tiempo y conocimientos, hizo posible la culminación de este trabajo.

Al PhD Bernardino Isaac Cerda Cristerna asesor externo de este trabajo, por su valioso aporte.

Al Dr. Juan Gallegos Merchán, por su asesoramiento durante la ejecución de este proyecto.

Al Dr. Juan Calderón por su infinita paciencia y dedicación.

A la PhD Mayra Vera Cabezas por su ayuda incondicional.

A todos los docentes y colegas que me acompañaron durante esta etapa de mi formación profesion

1. INTRODUCCIÓN

El *Enterococcus faecalis* es un coco Gram positivo, microaeróflico y responsable del fracaso en endodoncia (1,2), motivo por el cual se impone la combinación de la preparación mecánica de los conductos radiculares con la irrigación y la medicación intraconducto, para lograr la reducción de la carga bacteriana existente (3).

Varios compuestos químicos han sido propuestos para este fin, siendo los más usados el hidróxido de calcio y la clorhexidina. La literatura reciente plantea además el uso del propóleo y chitosan, en este caso, como vehículo de principios activos (4).

El chitosan es un polisacárido natural producido por desacetilación de la quitina, presente en el exoesqueleto de los crustáceos, biocompatible, biodegradable y antibacteriano (5,6); mientras el propóleo es un producto natural, resinoso, rico en compuestos flavonoides, responsables de sus propiedades antibacterianas (7).

Dentro de los métodos para evaluar la actividad antimicrobiana de los desinfectantes endodónticos, la prueba de difusión en agar es la más aceptada a nivel mundial para determinar la sensibilidad bacteriana *in vitro*. Se trata de un método simple, estándar y reproducible, dentro de sus limitaciones están el pH del sustrato, período de incubación, sensibilidad y capacidad de difusión del fármaco (8).

El objetivo del presente estudio *in vitro* es comparar la eficacia antibacteriana *in vitro* del chitosan/propóleo en gel, con la del hidróxido de calcio (Calcifar-P), clorhexidina en gel al 2%, el extracto de propóleo al 30% y el gel de chitosan, sobre la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 292122, según halos de inhibición,

previa incubación a 37°C, por 24 horas. La muestra consiste en 14 repeticiones por grupo, para un total de 98 unidades de estudio.

1.1. Planteamiento del problema y justificación

La persistencia de microorganismos en el sistema de conductos radiculares incluso después de la terapia endodóntica, constituye un desafío para el clínico (9). La irrigación y medicación intraconducto juegan un rol fundamental en endodoncia como complemento de la preparación mecánica (3). Últimamente se ha planteado el uso de productos de origen natural como métodos de desinfección en esta práctica (10).

En un estudio *in vitro* fue planteado el uso del chitosan en gel, como vehículo de sustancias antimicrobianas, obteniéndose halos inhibitorios al menos dos veces más grandes que los producidos por el resto de sustancias probadas (4). Este biopolímero es biocompatible y biodegradable lo cual favorece su aplicación como biomaterial (5,11). El propóleo es un compuesto natural, conocido por ser antibacteriano, antifúngico, antiviral y ha mostrado que puede ser menos citotóxico que el hidróxido de calcio (12).

Por tanto, este proyecto de investigación comparará la eficacia antibacteriana *in vitro* del chitosan/propóleo en gel con la del hidróxido de calcio (Calcifar-P), el extracto de propóleo al 30%, el gel de chitosan y la clorhexidina en gel al 2%, debido a la necesidad de investigar e implementar el uso de medicamentos intraconducto, de origen natural, que posiblemente tengan una actividad antimicrobiana superior a la acción de los compuestos químicos típicamente usados en esta práctica como el hidróxido de calcio y la clorhexidina, sobre la microbiota del sistema de conductos radiculares, con especial énfasis en el *Enterococcus faecalis*, patógeno responsable del fracaso en endodoncia (9,13). Esta investigación se plantea para beneficio directo de los pacientes y de quienes practicamos la terapia endodóntica.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Microbiología en endodoncia

W.D. Miller, el padre de la microbiología oral, fue el primer investigador que vinculó la enfermedad pulpar con la presencia de bacterias en el año de 1890 (14). Más tarde en 1965, el estudio realizado por Kakehashi y colaboradores confirmó que la microbiota era la etiología de la enfermedad pulpar y periapical (15). Actualmente se asevera que las bacterias son la principal causa de la periodontitis apical (13).

Las infecciones endodónticas son mixtas, de etiología polimicrobiana y con predominio de bacterias anaerobias estrictas, evidenciándose múltiples factores de virulencia en los microorganismos presentes en las mismas, ya sean los productos segregados como enzimas, exotoxinas, proteínas de shock térmico o los productos estructurales como son los lipopolisacáridos, los péptidoglucanos, el ácido lipoteicoico, las fimbrias, flagelos, proteínas y vesículas de la membrana exterior, las lipoproteínas, el ADN y los exopolisacáridos (16).

La microbiota oral (bacterias, virus, hongos, protozoarios y arqueas) constituye una comunidad de comensales que puede cambiar a patógenos oportunistas y causar la infección endodóntica. Esta comprende más de 1000 taxones individuales, la mayoría de los cuales aún no han sido cultivados (17).

Un número significativo de parámetros microecológicos dictarán el establecimiento del biofilm en la cavidad oral: pH local, presión parcial de oxígenos, potencial redox, disponibilidad de nutrientes selectivos, virulencia de la microbiota y el estado del sistema inmune del huésped, el cual afecta el resultado del tratamiento endodóntico. Para invadir el espacio del conducto radicular, los microorganismos presentes en la cavidad oral, tienen que irrumpir en los tejidos duros del diente (17).

Luego de lo anterior, los microorganismos colonizan las superficies de la dentina y/o tejido necrótico, dando lugar a la formación del biofilms (18). Algunos

sistemas de regulación genética, como el quorum-sensing (QS), son responsables de facilitar la formación de biofilms (1).

2.1.1 Tipos de infección

Las infecciones primarias intrarradiculares se caracterizan por un consorcio mixto compuesto de aproximadamente 10 a 30 especies bacterianas por conducto. Los grupos bacterianos más frecuentes y abundantes en las infecciones primarias incluyen especies anaerobias Gram-negativas (13).

Las infecciones persistentes/secundarias intrarradiculares son la principal causa de periodontitis apical post-tratamiento. Dentro de su etiología se habla de la persistencia de microorganismos en el conducto al momento de la obturación. La mayoría de los estudios han revelado la presencia de bacterias Gram-positivas, en este tipo de infecciones, donde el *Enterococcus faecalis* es la más frecuentemente detectada, con una prevalencia que alcanza hasta el 90% (13).

Las infecciones extrarradiculares son independientes y pueden persistir incluso después del tratamiento de conducto. Existen reportes de mineralización del biofilm a este nivel (13).

2.1.2 *Enterococcus faecalis*

Microrganismo encontrado en la cavidad oral, en condiciones normales, es un coco Gram positivo, microaerofílico, anaeróbico, considerado un patógeno oportunista, forma biofilms en ambientes hostiles por sí solo, lo cual puede contribuir a su papel en las infecciones intrarradiculares persistentes. El *E. faecalis* posee la capacidad de coexistir con otros patógenos en el conducto radicular e inhibir su crecimiento (1,2).

Dentro de los factores de virulencia del *Enterococcus faecalis* tenemos la bomba de protones, adhesinas, metaloproteinasas y el ácido lipoteicoico, el más inmunogénico y principal factor de virulencia de la bacteria (19,20).

La dificultad para su eliminación se debe a su capacidad de penetración en los túbulos dentinarios, evadiendo la acción de la preparación quimiomecánica durante el tratamiento del conducto radicular (21).

2.1.2.3 Difusión en agar con el método de Kirby – Bauer

También conocido como antibiograma. Realizado a las bacterias aisladas con diferentes tipos de antibióticos para conocer su resistencia o susceptibilidad hacia los mismos. La prueba de Kirby-Bauer se lleva a cabo bajo condiciones asépticas, distribuyendo el inóculo de una bacteria aislada en una placa Petri con agar Mueller Hinton, lo que permite el crecimiento de la mayoría de las bacterias patógenas. Los resultados se determinan midiendo las zonas de inhibición del crecimiento de la bacteria, por la efectividad del antibiótico (8).

2.2 Medicación intraconducto

No existe evidencia sólida en la literatura que demuestre la descontaminación del sistema de conductos radiculares con la instrumentación mecánica, lo cual es justificable, teniendo en cuenta la compleja anatomía existente. Es por esta razón que la terapia endodóntica debe complementarse con la preparación química del conducto, que incluye la irrigación y la colocación de medicamentos en el interior de éste entre citas, a fin de lograr una mayor descontaminación (3).

Dentro de los medicamentos más usados en la medicación intraconducto tenemos el hidróxido de calcio y la clorhexidina en gel, también han sido planteados productos de origen natural como el propóleo entre otros descritos en este trabajo, mientras que el chitosan ha sido propuesto como un vehículo de principios activos para este fin (4).

2.2.1 Hidróxido de calcio

La pasta de hidróxido de calcio sigue siendo la medicación de elección entre citas, para la reducción de las bacterias y sus productos del sistema de conductos radiculares (22).

Su mecanismo de acción consiste en la liberación de iones hidroxilo en un entorno acuoso con los consecuentes efectos letales sobre la célula bacteriana como daño a la membrana citoplasmática por incremento del pH, denaturalización de las proteínas, alteraciones en el ADN e inactivación de endotoxinas bacterianas. Su acción biológica, que consiste en la inducción del proceso de mineralización, se alcanza a un pH de 8,6 a 10,3 (23).

Diferentes vehículos se han utilizado para mezclar el polvo de hidróxido de calcio tales como agua, solución anestésica, solución salina, solución Ringer, clorhexidina y paramonoclorofenol alcanforado (CMCP), los cuales determinan su velocidad de disociación. Sin embargo, al ser usado como medicamento intraconducto su remoción previa la obturación es incompleta, constituyendo esto su principal desventaja (23,24).

En esta investigación se usó el hidróxido de calcio en su presentación Calcifar-P (Eufar-Colombia), mismo que se presenta en forma de pasta blanca, con una textura cremosa contenido en una jeringa dispensadora de 2g. Dentro de sus componentes se encuentran el hidróxido de calcio, óxido de zinc y sulfato de bario (25).

2.2.2 Clorhexidina en gel

La clorhexidina es una biguanida catiónica, que alcanza su óptima actividad antimicrobiana con valores de pH que van de 5,5 a 7,0. La eficacia de la clorhexidina se debe a su sustantividad, a altas concentraciones del producto, la unión de sus moléculas cargadas positivamente a los grupos fosfato de la pared celular bacteriana, con carga negativa, hace que la clorhexidina penetre en el interior de la bacteria, alterando así el equilibrio osmótico celular, lo cual

provoca la precipitación y/o coagulación del citoplasma, resultando en la muerte del microrganismo. A bajas concentraciones produce efecto bacteriostático (23).

El espectro de acción de la clorhexidina incluye una amplia gama de bacterias Gram negativas y Gram positivas, anaerobias, aerobias, facultativas además de levaduras y virus. Su composición consta de digluconato de clorhexidina al 2% en un gel que incluye 1% de natrosol e hidroxietilcelulosa (26).

En forma de gel, la clorhexidina mantiene casi todos los túbulos dentinarios abiertos, logrando el contacto directo del principio activo con el biofilm por períodos más largos y de esa manera inhibe el crecimiento bacteriano. Su viscosidad mantiene los residuos en suspensión (acción reológica) (26).

La clorhexidina en gel es más eficaz que el hidróxido de calcio en la eliminación de *E. faecalis* (24). Su uso se recomienda por cortos períodos de tiempo (3-5 días) y en casos de exudación, ya que es antimicrobiana en presencia de sangre y sustancias orgánicas. No se han publicado efectos adversos con respecto a su aplicación como medicación intraconducto (26).

En el presente estudio se utilizó la clorhexidina en gel al 2% (Maquira, Brasil), la cual se presenta en una jeringa dispensadora de 3g, en su composición se incluyen digluconato de clorhexidina al 2%, metilparabeno, propilenglicol, hidroxietilcelulosa y agua purificada (27).

2.2.3 Productos naturales

2.2.3.1 Chitosan

Polisacárido natural, más abundante en la naturaleza después de la celulosa, obtenido por desacetilación parcial de la quitina, presente en el exoesqueleto de los artrópodos. Comprende copolímeros de glucosamina y N-acetilglucosamina. Se presenta en forma de polvo, pasta o gel, este último se forma en un medio ácido acuoso por hidratación del polímero (28,5).

En medios ácidos los grupos amino del chitosan capturan iones hidrógeno, dando como resultado una carga global positiva, tratándose de un polícatión, hecho que le confiere una capacidad bioadhesiva a las superficies negativamente cargadas como la membrana celular bacteriana (5).

Este polímero básico, cuando es diluido en ácidos forma sales, por ionización de sus grupos amino con los iones hidronios disponibles en la solución. Al protonarse los grupos amino el chitosan se convierte en un polielectrólito catiónico soluble o sal de chitosan, con propiedades similares a los electrolitos (sales) y polímeros (compuestos de alto peso molecular) y en ocasiones se denominan polisales (29). Un ejemplo de ello son los apósitos para heridas de acetato de chitosan aprobados por la FDA (30).

En su actividad antimicrobiana este biopolímero produce daños en la pared celular y membrana citoplasmática de bacterias y hongos, con la consecuente fuga de proteínas que aumenta la permeabilidad de la membrana celular. Al ocurrir la internalización de productos oligoméricos en el citoplasma de la bacteria, se producirá una síntesis incompleta del ARN y finalmente la aglutinación de los componentes citoplasmáticos, unido a la modificación de los valores de pH, producirá la muerte del microorganismo (31).

Las partículas de chitosan han mostrado ser efectivas en la neutralización de los lipopolisacáridos bacterianos, lo cual provocará reducción de la expresión de las citoquinas proinflamatorias liberadas por los macrófagos (32), así como lo hace el hidróxido de calcio (23).

El chitosan es considerado no tóxico, biocompatible, biodegradable además de presentar inmunogenicidad, actividad fungicida y antiviral (29).

Si bien es cierto que la FDA aprueba el chitosan en apósitos para heridas, ciertas modificaciones implementadas en el chitosan podrían hacerlo más o menos tóxico por causa de los residuos de los reactantes que deben ser retirados cuidadosamente (29).

Estudios más recientes referentes a la citotoxicidad del chitosan apuntan más hacia su actividad antitumoral, habiéndose observado su actividad citotóxica sobre las células del carcinoma de vejiga (apoptosis) dependiente del grado de acetilación, pH y peso molecular (33). En un estudio donde se ensayaron apósitos de clorhexidina con partículas de chitosan y apósitos sólo de clorhexidina, se comprobó que los primeros atenuaron el efecto citotóxico del antiséptico sobre los fibroblastos humanos, además de un efecto de liberación prolongada y localizada del mismo y por ende actividad antimicrobiana en el tiempo (34).

Su consistencia física más el hecho de permitir la liberación sostenida de principios activos hacen que pueda ser usado como vehículo de sustancias antimicrobianas colocadas en el sistema de conductos radiculares (5, 4,6).

2.2.3.2 Propóleo

El propóleo es una sustancia resinosa que las abejas obtienen de las plantas y usan en las colmenas para cubrir sus paredes, llenar grietas o huecos y embalsamar invasores muertos (7).

La composición química del propóleo incluye elementos orgánicos como compuestos fenólicos, ésteres, flavonoides, a lo cuales se atribuye su acción antibacteriana. Todo lo anterior variará dependiendo de la flora local del sitio de recolección (7).

Este compuesto natural además de antibacteriano es antifúngico, antiviral, antinflamatorio, hepatoprotector, antioxidante, antitumoral, inmunomodulador, anestésico y agente anticaries. Es usado como medio de almacenamiento para el diente avulsionado, como agente de recubrimiento pulpar y como sellante en la hipersensibilidad dentinaria, también se ha planteado su uso como medicación intraconducto (12, 7,35).

2.2.3.3 Otros productos naturales

La Morinda citrifolia (Rubiaceae) (MCJ), conocida comercialmente como noni, es endémica de los países tropicales, su jugo tiene una amplia gama de efectos terapéuticos como por ejemplo antibacteriano, antimicótico, antiviral, antitumoral, antihelmíntico, analgésico, hipotensor, antiinflamatorio y fortalecedor del sistema inmune (36). Su actividad antibacteriana contra el *E. faecalis* es del 69% (10).

También el *Pinus elliottii*, planta originaria del sureste de los Estados Unidos, cuyo compuesto principal es el ácido deshidroabiético, mostró actividad antibacteriana frente a bacterias anaerobias presentes en la infección endodóntica primaria (37).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general:

- Comparar la eficacia antibacteriana in vitro del chitosan/propóleo en gel, con la del hidróxido de calcio (Calcifar-P), la clorhexidina en gel al 2%, el extracto de propóleo al 30% y el gel de chitosan sobre las cepas *Enterococcus faecalis* ATCC 292122.

3.2 Objetivos específicos:

- Evaluar y medir la eficacia del chitosan/propóleo en gel según el halo inhibitorio provocado sobre la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 292122.
- Evaluar y medir la eficacia del hidróxido de calcio en su presentación de Calcifar-P, según el halo inhibitorio provocado sobre la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 292122.
- Evaluar y medir la eficacia de la clorhexidina en gel al 2% según el halo inhibitorio provocado sobre la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 292122.
- Evaluar y medir la eficacia del extracto de propóleo al 30% según el halo inhibitorio provocado sobre la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 292122.

- Evaluar y medir la eficacia del gel de chitosan según el halo inhibitorio provocado sobre la cepa Enterococcus faecalis ATCC 292122.

4. HIPÓTESIS

El chitosan/propóleo en gel tiene mejor eficacia antimicrobiana comparada con el hidróxido de calcio (Calcifar-P), clorhexidina en gel al 2%, el extracto de propóleo al 30% y el gel de chitosan.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Tipo de estudio

Estudio comparativo *in vitro* transversal.

5.1.2 Universo y muestra

El cálculo muestral se realizó con el programa Fisterra, bajo los siguientes parámetros:

- ✓ Nivel de seguridad del 95%
- ✓ Potencia del 80%

Se usó la fórmula de comparación de medias obteniendo un valor de 14 replicaciones por cada grupo de estudio:

$$n = \frac{2 (Z_\alpha + Z_\beta)^2 * S^2}{d^2}$$

n = Sujetos necesarios en cada una de las muestras.

Z_a = Valor Z correspondiente al riesgo deseado.

Z_b = Valor Z correspondiente al riesgo deseado.

S² = Varianza de la variable cuantitativa que tiene el grupo control o de referencia.

d = Valor mínimo de la diferencia que se desea detectar (datos cuantitativos).

5.2 VARIABLES

5.2.1 Operacionalización de variables

VARIABLE	DEFINICIÓN TEÓRICA	DEFINICIÓN OPERATIVA	INDICADOR	TIPO ESTADÍSTICO	ESCALA
Halo inhibitorio	Zona alrededor de un disco de sensibilidad en un antibiograma en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada con el gérmen. Es una medida de la potencia del antibiótico frente al gérmen (8).	Diámetro de la zona de inhibición que se forma alrededor de cada disco (38).	mm	Cuantitativa	Razón

5.3 PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS

5.3.1 Clasificación de los grupos de estudio

Los grupos de estudio que componen este proyecto de investigación son los siguientes: chitosan/propóleo en gel, hidróxido de calcio en su presentación Calcifar- P (Eufar-Colombia), clorhexidina en gel al 2% (Maquira, Brasil), extracto de propóleo al 30%, gel de chitosan, disco de sensibilidad de Ampicilina como control positivo y agua destilada como control negativo.

5.3.1.1 Preparación del extracto de propóleo

El propóleo bruto fue recolectado en la comuna de Cacha perteneciente al cantón Riobamba de la provincia de Chimborazo a través del MAGAP (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca) de Cuenca. Las

colmenas estaban ubicadas en un espacio de 60 hectáreas de extensión, donde se encuentran bosques de eucalipto, plantas frutales, maíz, hortalizas y chaparros.

El experto a cargo fue el doctor en Bioquímica y Farmacia Juan Calderón en el departamento de estudios ambientales de la Universidad del Azuay. En un primer paso se colocó el propóleo recolectado (300 gr), en fundas transparentes para conservación de alimentos, herméticamente cerradas, se realizó la eliminación de las impurezas y reducción a partículas de menor tamaño para optimizar el proceso de extracción (**Anexo B Fig. 1**) (39).

Posteriormente, 30 gramos de propóleo depurado fueron depositados en un rollo preformado de papel filtro, marca Wathman Nº 40, en el interior del Soxleth, a una temperatura que no superara los 60º, por 10 horas, para garantizar la extracción del propóleo soluble mediante una solución etanólica al 70 % (**Anexo B Fig. 2**) (40,41). Obteniendo de esta manera la recirculación del disolvente dado por evaporación, enfriamiento y condensación, dando lugar a una forma líquida mediante el arrastre del propóleo soluble al disolvente. Es importante mencionar que este proceso se acompañó de agitación magnética constante (41).

Es así que se obtuvo un volumen extraído de 2000 ml, el cual se filtró tres veces consecutivas, con el propósito de eliminar el mayor contenido de ceras posible (23,6 g) y garantizar la pureza del producto final, viéndose que los contenidos filtrados van de restos de colmena, insectos e impurezas extremadamente insolubles hasta ceras también no solubles, pero de un aspecto más homogéneo (**Anexo B Fig. 3**) (40).

El extracto se obtuvo por evaporación del alcohol. Posteriormente se realizó el cálculo analítico de determinación del rendimiento de sustancias sólidas solubles totales obteniéndose 30 g/ml, lo cual significa un extracto de propóleo al 30%. (40).

Con la finalidad de realizar una caracterización química del producto final a este se le realizó una espectrofotometría en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, para lo cual se usó un espectrofotómetro Infrarrojo Thermo Scientific modelo Nicolet iS5 (**Anexo B Fig. 4**), identificando grupos funcionales como hidroxilos (-OH), metilos (-CH₃), así como enlaces carbono-carbono de anillos aromáticos. Todos los grupos antes mencionados forman parte de compuestos químicos como los flavonoides, antraquinonas y terpenos, responsables de la actividad antimicrobiana del propóleo y además son indicativos de la presencia de ceras (42,43).

5.3.1.2 Preparación de los geles de chitosan.

El chitosan se importó a través del proveedor de productos bioquímicos Glenthiam Life Science (Reino Unido), para ser procesado en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, por la PhD Mayra Vera Cabezas. El ácido acético requerido para la elaboración de estos geles se adquirió por intermedio de la experta en la mencionada facultad.

El gel de chitosan se obtuvo al mezclar 4ml de ácido acético al 1% con el chitosan en polvo; en tanto el gel chitosan/propóleo se obtuvo igual al anterior más 1ml de extracto de propóleo al 30%. La mezcla resultante se llevó al agitador de cabeza y hélice, al cual se le adaptó una espátula de cemento y se realizó la agitación a 500 rpm durante 10 minutos, hasta obtener un gel de consistencia homogénea, en ambos casos. Cabe mencionar que dicha preparación se realizó en condiciones asépticas (**Anexo B Fig. 5**) (4).

5.3.1.3 Cultivo y siembra de la cepa de *Enterococcus faecalis*

La cepa de *Enterococcus faecalis* usada en este proyecto de investigación procedía de la empresa importadora de insumos y productos de laboratorio Medibag (Quito). Todo el proceso microbiológico se llevó a cabo dentro de una cámara de bioseguridad Euro Aire II, para garantizar la no contaminación de la cepa o el ambiente de trabajo.

La siembra y observación de la eficacia antibacteriana de las sustancias correspondientes a los siete grupos de estudio sobre la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 se realizó en el Laboratorio Clínico Neolab de la ciudad de Cuenca, bajo la tutoría del Dr. Juan Gallegos Merchán, microbiólogo encargado.

En primera instancia, se procedió a liofilizar la cepa de *Enterococcus faecalis*, para lo cual se la mantuvo a temperatura ambiente el día anterior, luego de ello se dejó salir un poco del líquido hidratante de la ampolla que contiene la cepa y acto seguido se mezcló de manera equitativa el resto con el microrganismo ubicado en la parte inferior de la ampolla y se esperó de 5 a 10 minutos (44,45).

En un segundo tiempo se realizó la siembra del microrganismo en agar sangre dispuesto en la caja Petri, para esto se usó un asa de inoculación estéril (**Anexo B Fig. 6**). La razón de usar este tipo de agar es por ser un medio de cultivo sólido, ya que el *Enterococcus faecalis* no presenta motilidad, además de permitir el crecimiento de colonias bacterianas sin restricción (44,45).

La siembra se hizo en forma de “zig–zag”, del extremo superior hacia abajo de la caja, sin dejar espacios libres. La caja Petri se rotuló para ser incubada a 37°C por 24 horas, a fin de obtener las colonias bacterianas. La colocación de la caja fue de forma invertida, para garantizar la reproducción y crecimiento de la cepa (8,44).

5.3.2 Preparación del inóculo

Transcurridas las 24 horas de incubación se comprobó el crecimiento bacteriano de la cepa para poder obtener el inóculo (**Anexo B Fig. 7**), esto se hizo depositando las colonias bacterianas en un tubo de ensayo estéril lleno de agua destilada y agitando en el Vortex hasta 20 segundos y finalmente se comprobó la turbidez del inóculo que debe ser 0,08 más menos 2 según la escala de MacFarland (**Anexo B Figura 8**) (8).

5.3.2.1 Inoculación de las placas

Quince minutos después de haber preparado el inóculo, se introdujo un hisopo dentro de la suspensión y al retirarlo se rotó varias veces contra la pared del tubo por encima del nivel del líquido con la finalidad de eliminar el exceso de inóculo (**Anexo B Fig. 9**), que luego fue llevado al agar Müller-Hinton (8).

La siembra o inoculación se realizó pasando dicho aplicador tres veces seguidas en la superficie del agar, y luego por la periferia de este para conseguir una siembra uniforme, girando la caja Petri a 60 grados (**Anexo B Fig. 10**) (8).

Este medio de cultivo se considera el adecuado por no contener sustancias inhibidoras, de manera que los compuestos a testear difundan en el mismo y además porque permite el crecimiento de la mayoría de bacterias patógenas (8,45).

5.3.2.2 Colocación de los reactivos

Posterior al secado del agar (3-5 minutos) se colocaron en él los discos previamente embebidos en hidróxido de calcio y clorhexidina, puesto que en la prueba piloto se comprobó una difusión satisfactoria de este gel en agar, (**Anexo B Fig. 11-12**) así mismo se empleó un disco con agua destilada como control negativo y uno de ampicilina como control positivo (8).

Al colocar los discos en el agar se hizo ligera presión para garantizar un contacto adecuado del disco con el mismo. Estos se situaron a 15 mm o más del borde de la caja Petri a fin de que no se produjera ninguna interferencia entre los halos de inhibición, colocando solo tres reactivos por caja (8).

En este estudio se hizo una modificación del método de Kirby-Bauer debido a que los geles de chitosan se colocaron directamente en el agar por medio de la realización de pocillos de 6 mm de diámetro, para lograr un contacto directo de dichos geles con el agar y garantizar así su difusión en el mismo (**Anexo B Fig. 13**) (4).

5.3.2.3 Incubación

Finalmente se llevaron a la estufa las cajas Petri con los reactivos de los diferentes grupos de estudio y los controles positivo y negativo para ser incubados a 37°C por 24 horas. La incubación de las cajas Petri se hizo de forma invertida (agar en la parte superior), para garantizar la reproducción y crecimiento de la cepa y en grupos no superiores a 5 cajas, por razones de distribución uniforme del calor durante el proceso de incubación (8,44).

5.3.3 Medición de los halos y recolección de los datos

Posterior a la incubación se procedió a la medición de los halos de inhibición con regla milimetrada, al reverso de la caja Petri y se recolectaron los valores para su análisis estadístico e interpretación (**Anexo B Fig. 14**) (8).

5.3.1 Plan de análisis

Para analizar la información se creó una base de datos en excel con los valores en milímetros de los halos inhibitorios correspondientes a los siete grupos de estudio, en sus catorce replicaciones, misma que fue exportada al paquete estadístico SPSS 22.0 (Armon. NY, USA).

Luego de calcular las medidas de tendencia central de cada grupo se realizó el análisis de normalidad con la prueba estadística de Kolmogorov-Smirnov, debido a que las unidades de estudio son mayores a 50, resultando una distribución no paramétrica.

Seguidamente se realizó la comparación de medias con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, por tratarse de muestras independientes. Se consideran resultados significativos niveles iguales o menores al 5% ($p \leq 0.05$).

6. RESULTADOS

Para realizar el análisis comparativo, lograr los objetivos del estudio y comprobar la hipótesis planteada, se llevó a cabo una incubación por 24 horas

a 37°C del *Enterococcus faecalis* y luego fueron testeados los siete grupos de estudio. Después de tomar los datos se realizaron las pruebas estadísticas de Kolmogorov-Smirnov para verificar la normalidad de los datos (**Anexo A tabla N ° 1**) y Kruskal-Wallis para la comparación entre grupos (**tabla N ° 10-15**).

El halo inhibitorio del gel de chitosan/propóleo (**Anexo B Fig. 15**) presentó la mayor media sobre el *Enterococcus faecalis*, en segundo lugar, estuvo el provocado por el gel de chitosan (**Anexo B Fig. 16**), seguido por el halo inhibitorio de la clorhexidina en gel al 2% (Maquira-Brasil) (**Anexo B Fig. 17**), con halos inhibitorios menores siguen: el Calcifar-P (Eufar-Colombia) (**Anexo B Fig. 18**) y el extracto de propóleo al 30% (**Anexo B Fig. 19**). No hubo una diferencia estadísticamente significativa entre el gel de chitosan/propóleo y el resto de grupos de estudio. El control positivo (disco de sensibilidad de Ampicilina) (**Anexo B Fig. 20**) produjo los mayores halos inhibitorios en el agar Mueller Hinton. (**Tabla 3-9; Gráfico 1**)

7. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Tabla 1 Distribución muestral de los grupos de estudio

Grupos de estudio	Frecuencia	Porcentaje
Ampicilina	14	14,28%
Calcifar-P	14	14,28%
Clorhexidina en gel al 2%	14	14,28%
Extracto de propóleo al 30%	14	14,28%
Agua destilada	14	14,28%
Gel de chitosan	14	14,28%
Gel de chitosan/propóleo	14	14,28%
Total	98	100,0%

Fuente: Base de datos/ Elaborado por: Greter Luaces, 2017.

En la presente tabla, se observa, que por cada grupo de estudio se realizaron 14 replicaciones, obteniéndose en total 98 unidades de estudio.

Tabla 2 Distribución según tamaño de los halos inhibitorios

Grupos de estudio	Halo inhibitorio en mm	Frecuencia	Porcentaje
Ampicilina	31 – 40 mm	14	100,0%
Calcifar-P	11 – 20 mm	14	100,0%
Clorhexidina en gel al 2%	11 – 20 mm	14	100,0%
Extracto de propóleo al 30%	1 – 10 mm	1	7,1%
	11 – 20 mm	13	92,9%
Agua destilada	1 – 10 mm	14	100,0%
Gel de chitosan	11 – 20 mm	14	100,0%
Gel de chitosan/propóleo	21 – 30 mm	14	100,0%
Total		98	100,0%

Fuente: Base de datos / Elaborado por: Greter Luaces, 2017.

La ampicilina presentó halos inhibitorios de 31 – 40 mm en todos los casos. El Calcifar-P presentó halos de 11 – 20 mm en todas las muestras. La clorhexidina en gel al 2% produjo halos de 11 – 20 mm en todas las muestras. El extracto de propóleo al 30% presentó, en el 92,9% de casos, halos de 11 – 20 mm y en un 7,1%, halos de 1 – 10 mm. El agua destilada produjo halos de 1 – 10 mm en todas las muestras. El gel de chitosan produjo en el 100% de casos, halos de 11 – 20 mm. El gel de chitosan-propóleo produjo halos de 21 – 30 mm en todas las cajas Petri.

Tabla 3 Estadística descriptiva del halo inhibitorio del gel de chitosan/propóleo

Descriptivo	Estadístico/error típico
Media	22,36 / 0,289
Intervalos de confianza (95%).	
Límite inferior	21,73
Límite superior	22,98
Media recortada al 5%	22,45
Mediana	23
Varianza	1,17
Desviación estándar	1,082
Mínimo	20
Máximo	23
Rango	3
Amplitud intercuartil	2
Asimetría	-1,272 / 0,597
Curtosis	-0,021 / 1,154

Fuente: Base de datos / Elaborado por: Gretter Luaces, 2017.

La media del halo inhibitorio del gel de chitosan/propóleo fue de 22,36 con una desviación estándar de +/- 1,082.

Tabla 4 Estadística descriptiva del halo inhibitorio del gel de chitosan

Descriptivo	Estadístico/error típico
Media	17,71 / 0,125
Intervalos de confianza (95%).	
Límite inferior	17,44
Límite superior	17,98
Media recortada al 5%	17,74
Mediana	18
Varianza	0,22
Desviación estándar	0,469
Mínimo	17
Máximo	18
Rango	1
Amplitud intercuartil	1
Asimetría	-1,067 / 0,597
Curtosis	-1,034 / 1,154

Fuente: Base de datos / Elaborado por: Gretter Luaces, 2017.

La media del halo inhibitorio del gel de chitosan fue de 17,71 con una desviación estándar de +/- 0,469.

Tabla 5 Estadística descriptiva del halo inhibitorio de la clorhexidina en gel al 2%

Descriptivo	Estadístico/error típico
Media	15,86 / 0,143
Intervalos de confianza (95%).	
Límite inferior	15,55
Límite superior	16,17
Media recortada al 5%	15,84
Mediana	16
Varianza	0,286
Desviación estándar	0,535
Mínimo	15
Máximo	17
Rango	2
Amplitud intercuartil	0
Asimetría	-0,216 / 0,597
Curtosis	1,15 / 1,154

Fuente: Base de datos / Elaborado por: Gretter Luaces, 2017.

La media del halo inhibitorio de la clorhexidina en gel al 2% fue de 15,86 con una desviación estándar de +/- 0,535.

Tabla 6 Estadística descriptiva del halo inhibitorio del Calcifar- P

Descriptivo	Estadístico/error típico
Media	13,93 / 0,165
Intervalos de confianza (95%).	
Límite inferior	13,57
Límite superior	14,28
Media recortada al 5%	13,92
Mediana	14
Varianza	0,379
Desviación estándar	0,616
Mínimo	13
Máximo	15
Rango	2
Amplitud intercuartil	0
Asimetría	0,024 / 0,597
Curtosis	0,302 / 1,154

Fuente: Formulario de datos / Elaborado por: Greter Luaces, 2017.

La media del halo inhibitorio del Calcifar-P fue de 13,93 con una desviación estándar de +/- 0,616.

Tabla 7 Estadística descriptiva del halo inhibitorio del extracto de propóleo al 30%

Descriptivo	Estadístico/error típico
Media	11,36 / 0,248
Intervalos de confianza (95%).	
Límite inferior	10,82
Límite superior	11,89
Media recortada al 5%	11,34
Mediana	11
Varianza	0,863
Desviación estándar	0,929
Mínimo	10
Máximo	13
Rango	3
Amplitud intercuartil	1
Asimetría	1,159 / 0,597
Curtosis	0,338 / 1,154

Fuente: Base de datos / Elaborado por: Gretter Luaces, 2017.

La media del halo inhibitorio del extracto de propóleo al 30% fue de 11,36 con una desviación estándar de +/- 0,929.

Tabla 8 Estadística descriptiva del halo inhibitorio de Ampicilina (control positivo)

Descriptivo	Estadístico/error típico
Media	34,86 / 0,143
Intervalos de confianza (95%).	
Límite inferior	34,55
Límite superior	35,17
Media recortada al 5%	34,84
Mediana	35
Varianza	0,286
Desviación estándar	0,535
Mínimo	34
Máximo	36
Rango	2
Amplitud intercuartil	0
Asimetría	-0,216/ 0,597
Curtosis	1,15 / 1,154

Fuente: Base de datos / Elaborado por: Gretter Luaces, 2017.

La media del halo inhibitorio de la ampicilina fue de 34,86 con una desviación estándar de +/- 0,535.

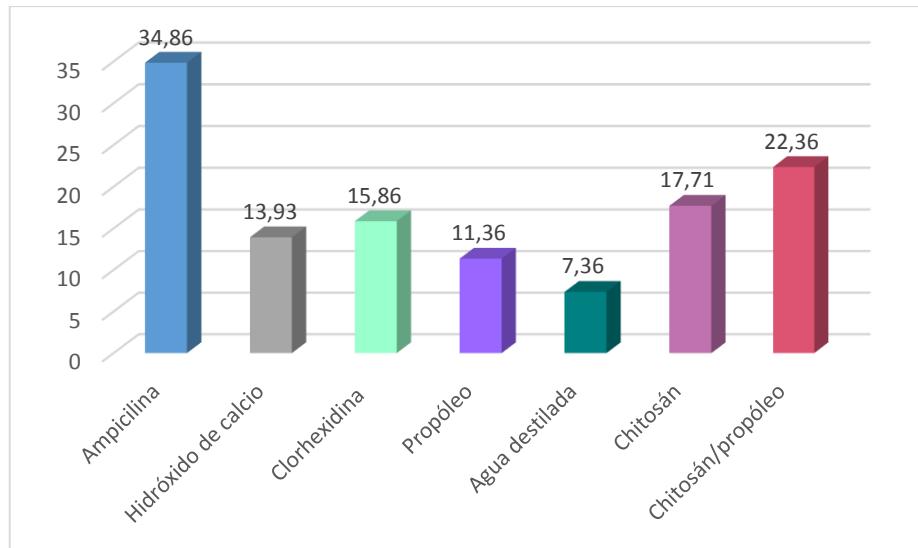
Tabla 9 Estadística descriptiva del halo inhibitorio del agua destilada (control negativo)

Descriptivo	Estadístico/error típico
Media	7,36 / 0,133
Intervalos de confianza (95%).	
Límite inferior	7,07
Límite superior	7,64
Media recortada al 5%	7,34
Mediana	7
Varianza	0,247
Desviación estándar	0,497
Mínimo	7
Máximo	8
Rango	1
Amplitud intercuartil	1
Asimetría	0,67 / 0,597
Curtosis	-1,838 / 1,154

Fuente: Base de datos / Elaborado por: Gretter Luaces, 2017.

La media del halo inhibitorio del agua destilada fue de 7,36 con una desviación estándar de +/- 0,497.

Gráfico 1 Estadística descriptiva del halo inhibitorio del agua destilada (control negativo)



Fuente: Base de datos / **Elaborado por:** Greter Luaces, 2017.

El gel de chitosan/propóleo produjo el halo inhibitorio de crecimiento bacteriano más amplio (22,36 mm), seguido del gel de chitosan (17,71mm) y la clorhexidina en gel al 2% (15,86). Ninguno superó al control positivo (Ampicilina) con un halo inhibitorio de 34,86 mm.

Tabla 10 Prueba de Kruskal-Wallis entre el gel de chitosan/propóleo y ampicilina

Antibiótico	Media	p
Gel de chitosan/propóleo	22,36	0,448
Ampicilina	34,86	0,448

Fuente: Base de datos / Elaborado por: Gretter Luaces, 2017.

Con la prueba de comparación de muestras independientes (Kruskal-Wallis) se demostró que no hay diferencias estadísticamente significativas entre el halo inhibitorio del gel de chitosan/propóleo y el de la ampicilina ($p > 0,05$).

Tabla 11 Prueba de Kruskal-Wallis entre el gel de chitosan/propóleo y el Calcifar-P

Antibiótico	Media	p
Chitosan/propóleo	22,36	0,448
Calcifar-P	13,93	0,448

Fuente: Base de datos / Elaborado por: Gretter Luaces, 2017.

Con la prueba de comparación de muestras independientes (Kruskal-Wallis) se demostró que no hay diferencias estadísticamente significativas entre el halo inhibitorio del gel de chitosan/propóleo y el del Calcifar-P ($p > 0,05$).

Tabla 12 Prueba de Kruskal-Wallis entre el gel de chitosan/propóleo y clorhexidina en gel al 2%

Antibiótico	Media	p
Gel de chitosan/propóleo	22,36	0,448
Clorhexidina en gel al 2%	15,86	0,448

Fuente: Formulario de datos / Elaborado por: Gretter Luaces, 2017.

Con la prueba de comparación de muestras independientes (Kruskal-Wallis) se demostró que no hay diferencias estadísticamente significativas entre el halo inhibitorio del gel de chitosan/propóleo y el de clorhexidina en gel al 2% ($p > 0,05$).

Tabla 13 Prueba de Kruskal-Wallis entre el gel de chitosan/propóleo y el extracto de propóleo al 30%

Antibiótico	Media	p
Gel de chitosan/propóleo	22,36	0,448
Extracto de propóleo al 30%	11,36	0,448

Fuente: Base de datos / Elaborado por: Gretter Luaces, 2017.

Con la prueba de comparación de muestras independientes (Kruskal-Wallis) se demostró que no hay diferencias estadísticamente significativas entre el halo inhibitorio del gel de chitosan/propóleo y el del extracto de propóleo al 30% ($p > 0,05$).

Tabla 14 Prueba de Kruskal-Wallis entre el gel de chitosan/propóleo y el gel de chitosan

Antibiótico	Media	p
Gel de chitosan/propóleo	22,36	0,448
Gel de chitosan	17,71	0,448

Fuente: Base de datos / Elaborado por: Gretter Luaces, 2017.

Con la prueba de comparación de muestras independientes (Kruskal-Wallis) se demostró que no hay diferencias estadísticamente significativas entre el halo inhibitorio bacteriano de chitosan-propóleo y el de chitosan solo ($p > 0,05$).

Tabla 15 Prueba de Kruskal-Wallis entre el gel de chitosan/propóleo y el agua destilada

Antibiótico	Media	p
Gel de chitosan/propóleo	22,36	0,448
Agua destilada	7,36	0,448

Fuente: Base de datos / Elaborado por: Gretter Luaces, 2017.

Con la prueba de comparación de muestras independientes (Kruskal-Wallis) se demostró que no hay diferencias estadísticamente significativas entre el halo inhibitorio del gel de chitosan/propóleo y el de agua destilada ($p > 0,05$).

8. DISCUSIÓN

Este trabajo es un estudio pionero en el Ecuador que tuvo como objetivo comparar la eficacia antibacteriana *in vitro* del chitosan/propóleo en gel, con la del hidróxido de calcio (Calcifar-P), la clorhexidina en gel al 2%, el extracto de propóleo al 30% y el gel de chitosan sobre la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 292122. Según los resultados obtenidos en la presente investigación se pudo comprobar que la media de halo inhibitorio del gel de chitosan/propóleo fue la más alta (22,36 mm), seguido del gel de chitosan (17,71 mm), la clorhexidina (15,86mm) y el hidróxido de calcio (13.93 mm). La menor media estuvo representada por el extracto de propóleo al 30% (11,36 mm). Cabe resaltar que ninguno de los grupos de estudio superó el valor de la media del halo inhibitorio del grupo control positivo (34,86 mm) y que no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre el gel de chitosan/propóleo y los diferentes grupos de estudio.

Dichos resultados se obtuvieron a partir de la medición de los halos inhibitorios de crecimiento bacteriano en el agar Mueller Hinton, inoculado con el *Enterococcus faecalis*, luego de 24 horas de incubación.

En este estudio se decidió obtener el extracto de propóleo a fin de garantizar la calidad del producto. Se decidió realizar una extracción etanólica en lugar de acuosa por el hecho de que esta vía incrementa el rendimiento de sólidos solubles totales extraídos y por ende los propóleos disueltos en solventes orgánicos (Etanol) presentan mayor actividad antibacteriana (40).

Lo anterior se debe a que las soluciones preparadas a partir de los sólidos extraídos en el proceso de lixiviación, como es el caso del propóleo obtenido en esta tesis, presentarán mayor cantidad de flavonoides, metabolitos a los cuales

se atribuye la capacidad antibacteriana del propóleo y estos últimos son muy solubles en etanol (40).

Por tanto, la actividad bactericida de los extractos dependerá del tipo de solvente utilizado durante su extracción, de la procedencia del propóleo y del tipo de bacteria sobre la cual se aplican los extractos (40).

Durante el proceso de extracción del propóleo, el volumen obtenido se filtró por tres veces consecutivas, a fin de eliminar el mayor contenido de ceras posible (23,6 g) (40); aun así, la espectrofotometría denota su presencia en el producto final, no pudiendo cuantificarse, debido al carácter cualitativo de la misma (43).

Uno de los pasos durante la elaboración del extracto de propóleo es su concentración, es decir, la eliminación del disolvente, en este caso la solución etanólica al 70%, lo cual ocurre mediante la evaporación de la misma (41). Si bien la espectrofotometría arroja grupos hidroxilos y metilos en la caracterización química del extracto obtenido estos no son indicativos de la presencia de etanol propiamente dicho, sino de alcoholes de elevado peso molecular que forman parte de la composición química de las ceras presentes en el propóleo (46). Por otro lado, en un estudio donde se usó el etanol para la elaboración del extracto de propóleo se pudo comprobar que este alcohol no influyó en la actividad antimicrobiana del extracto de propóleo al usar el etanol como grupo control (47). Por tal razón puede descartarse una sinergia entre el propóleo y el etanol usado para su extracción en cuanto a la actividad antibacteriana del extracto resultante.

El ácido fórmico es la mejor alternativa para solubilizar el chitosan; pero generalmente se usa el ácido acético, razón por la cual este fue el que se utilizó, conforme al estudio de base. También el chitosan puede solubilizarse en ácido clorhídrico, ácido nítrico y ácido cítrico, siendo insoluble en ácido sulfúrico y fosfórico (29).

Los resultados obtenidos en esta investigación son similares a los obtenidos por Ballal y colaboradores en el 2007 (48), donde la media del halo inhibitorio de

la clorhexidina en gel al 2% (12 mm) fue superior a la del hidróxido de calcio (9 mm) sobre el *Enterococcus faecalis* a las 24 horas de incubación usando el método de difusión en agar. El hecho de que se hayan obtenido medias ligeramente mayores en el presente estudio puede deberse a las diferencias en la metodología utilizada, en el caso de esta investigación se usó el agar Mueller Hinton como medio de cultivo debido a que el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recomienda su uso en forma rutinaria para la realización del antibiograma en medio sólido o difusión en agar por presentar buena reproducibilidad de los resultados y no contener sustancias inhibidoras, de manera que los compuestos a testear difunden de mejor manera en el mismo (8,45).

Otro estudio realizado por Gomes y colaboradores en el 2006 (49) donde se comparó la actividad antimicrobiana del hidróxido de calcio combinado con clorhexidina en gel al 2% contra algunos patógenos endodónticos, entre ellos el *Enterococcus faecalis*, utilizó así mismo el método de difusión en agar y la prueba de contacto directo por medio de la creación de pocillos en el agar, obteniendo también como media superior la del halo inhibitorio de la CHX en gel al 2% con un valor máximo de 21,67 mm, lo cual es coincidente con los resultados de esta investigación (20 mm).

Resultados semejantes a este estudio fueron reportados por Álvarez y colaboradores en el 2016 (4) donde igualmente se usó el método de Kirby Bauer modificado, en el caso de los geles de chitosan y chitosan/propóleo para comparar la eficacia antimicrobiana de los grupos de estudio sobre el *Enterococcus faecalis* posterior a las 24 horas de incubación. En este caso la media de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano del extracto de propóleo al 30% estuvo por debajo de los 10 mm, ligeramente inferior a la obtenida en el presente trabajo (11,36 mm), lo cual es fácilmente explicable por el hecho de que el poder antibacteriano de los propóleos varía según la flora presente en el sitio de recolección y en ambos estudios la media de ambos fue la menor, sin tomar en cuenta el agua destilada como control negativo. De la

misma manera en la mencionada investigación el gel de chitosan/propóleo alcanzó la media más alta con valores similares, pero ligeramente inferiores a los del presente estudio (22,36 mm), lo cual se justifica por la adición de un propóleo menos antibacteriano al obtenido en esta investigación y ambos geles no pudieron superar la capacidad antibacteriana del control positivo (disco de Ampicilina).

Sin embargo, en otros estudios se muestran resultados contradictorios en cuanto a la capacidad antimicrobiana de los extractos de propóleo sobre el *Enterococcus faecalis*. Es el caso del estudio de Kayaoglu y colaboradores en el 2011(7) donde se obtuvieron resultados superiores con los extractos de propóleo sobre el *Enterococcus faecalis* en comparación con el hidróxido de calcio, pero sin superar a la clorhexidina en su actividad antimicrobiana, punto en común con los resultados aquí encontrados. La diferencia entre los resultados se debe sin duda a la metodología empleada, como fue un mayor período de incubación, medios de cultivo diferentes sin dejar de mencionar la procedencia de los extractos de propóleo.

Cabe mencionar que no existen en la literatura consultada, hasta la fecha, estudios con la metodología empleada en este trabajo a cabalidad, más que el de Álvarez y colaboradores en el 2016 (4), ya citado en párrafos anteriores, el cual es el estudio base de esta investigación.

9. CONCLUSIONES

- Según las medias de halo inhibitorio obtenidas, las sustancias testeadas en este estudio presentan diferente actividad antimicrobiana *in vitro* sobre el *Enterococcus faecalis*.
- El gel de chitosan/propóleo mostró tener mayor eficacia antimicrobiana *in vitro* sobre el *E. faecalis* que el resto de sustancias testeadas con una media de halo inhibitorio de 22,36 mm.
- El gel de chitosan ocupó el segundo lugar en eficacia antibacteriana con una media de halo inhibitorio de 17,71 mm.
- La media de halo inhibitorio de la clorhexidina en gel al 2% (15,86 mm) fue superior comparada con el hidróxido del calcio (Calcifar-P) (13,93 mm).
- El extracto de propóleo al 30 % tuvo la menor media de halo inhibitorio con un valor de 11,36 mm.
- Ninguna de las sustancias testeadas pudo superar la media de halo inhibitorio del grupo control positivo.
- Los geles de chitosan/propóleo y chitosan junto con la clorhexidina en gel al 2% obtuvieron las medias de halo inhibitorio más altas, lo cual denota una potente actividad antimicrobiana *in vitro* sobre el *Enterococcus faecalis*, sugiriendo que podrían ser una buena alternativa para ser empleados como medicación intraconducto.



10. RECOMENDACIONES

- Se recomienda replicar esta investigación con una muestra de estudio de mayor tamaño.
- Se podría reducir la cantidad de grupos de estudio a los geles de chitosan/propóleo y chitosan, extracto de propóleo al 30% e hidróxido de calcio.
- Evaluar la citotoxicidad del chitosan en estudios posteriores, así como su eficacia antibacteriana frente a otras especies.



11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. He Z, Liang J, Zhou W, Xie Q, Tang Z, Ma R, et al. Effect of the quorum-sensing luxS gene on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Eur J Oral Sci.* 2016; 124(3):234–40.
2. Chávez de Paz LE, Davies JR, Bergenholz G, Svensäter G. Strains of *Enterococcus faecalis* differ in their ability to coexist in biofilms with other root canal bacteria. *Int Endod J.* 2015; 48(10):916–25.
3. Mittal N. Antibiotics as an intracanal medicament in endodontics: A review. Neelam Mittal Jyoti Jain. *Indian Journal of Dentistry.* 2013; (4):29-34.
4. K.I. Alvarez-Martinez, Y. Vázquez-Bello1, B.I. Cerda-Cristerna, Hernández-Rosas, M. Cruz-Tobón, L.O. Sánchez-Vargas. *In vitro antimicrobial activity of chitosan/propolis gels for intracanal medication.* *Dental Materials.* 2016.
5. Arnaud TMS, de Barros Neto B, Diniz FB. Chitosan effect on dental enamel de-remineralization: an in vitro evaluation. *J Dent.* 2010; 38(11):848–52.
6. Grover C, Shetty N. Evaluation of calcium ion release and change in pH on combining calcium hydroxide with different vehicles. *Contemp Clin Dent.* 2014 Oct; 5(4):434–9.
7. Kayaoglu G, Ömürlü H, Akca G, Gürel M, Gençay Ö, Sorkun K, et al. Antibacterial activity of Propolis versus conventional endodontic disinfectants against *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules. *J Endod.* 2011; 37(3):376–81.
8. García J, Cantón R, García J, Gómez M, Martínez Rodríguez C, et al. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Métodos básicos para el estudio de sensibilidad de antimicrobianos. 2000:1-54.



- 9.** Rôças IN, Siqueira JF Jr. Characterization of microbiota of root canal-treated teeth with post-treatment disease. *J Clin Microbiol.* 2012; (50):1721–1724.
- 10.** Kandaswamy D, Venkateshbabu N, Gogulnath D, Kindo AJ. Dentinal tubule disinfection with 2% chlorhexidine gel, propolis, morinda citrifolia juice, 2% povidone iodine, and calcium hydroxide. *Int Endod J.* 2010; 43(5):419–23.
- 11.** Y Li B, Zhang.Yang Y, Qiu W, Wang X, Liu B, et al. Synthesis, characterization, and antibacterial activity of chitosan/TiO₂ nanocomposite against *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Carbohydr Polym.* 2016 ;(152):825–31.
- 12.** Madhubala MM, Srinivasan N, Ahamed S. Comparative evaluation of propolis and triantibiotic mixture as an intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2011; 37(9):1287–9.
- 13.** Siqueira JF, Rôças IN. Present status and future directions in endodontic microbiology. *Endod Topics.* 2014; 30(1):3–22.
- 14.** Jain H, Mulay S, Mullany P. Persistence of endodontic infection and *Enterococcus faecalis*: Role of horizontal gene transfer. *ResearchGate.* 2016.
- 15.** Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald. The effects of surgical exposure of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontology.* 1965; 20:340–9.
- 16.** Hargreaves KM, Cohen S, Berman LH, editores. *Cohen's pathways of the pulp.* 10th ed. St. Louis, Mo: Mosby Elsevier; 2011.
- 17.** Zehnder M, Belibasakis GN. On the dynamics of root canal infections—what we understand and what we don't. *Virulence.* 2015; 6(3):216–22.
- 18.** Ricucci D, Siqueira JF Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod* 2010; 36:1277–88.



19. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, et al. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 2002; 35:221–8.
20. Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, Gomes BPFA. Antimicrobial Susceptibility and Characterization of Virulence Genes of *Enterococcus faecalis* Isolates from Teeth with Failure of the Endodontic Treatment. *J Endod*. 2016 Jul; 42(7):1022–8.
21. Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. The susceptibility of starved, stationary phase and growing cells of *Enterococcus faecalis* to endodontic medicaments. *J Endod*. 2005; 31(5):380–6.
22. Peters CI, Koka RS, Highsmith S, Peters OA. Calcium hydroxide dressings using different preparation and application modes: density and dissolution by simulated tissue pressure. *Int Endod J*. 2005; 38:889–95.
23. Mohammadi Z, Dummer PMH. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J*. 2011; 44(8):697–730.
24. Zancan RF, Vivan RR, Lopes MRM, Weckwerth PH, Andrade FB de, Ponce JB, et al. Antimicrobial Activity and Physicochemical Properties of Calcium Hydroxide Pastes Used as Intracanal Medication. *Journal of Endodontics*. 2016; 42(12):1822–8.
25. Calcifar-P-promosa dental [internet].2014 Disponible en <http://promosadental.tripod.com>.
26. Gomes BPFA, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JFA, Souza-Filho FJ, Ferraz CCR. Chlorhexidine in endodontics. *Braz Dent J*. 2013; 24(2):89–102.
27. Clorhexidina Gel 2% - Maquira [internet].2012 Disponible en <http://maquira.com>.

- 28.** Elsaka SE, Elnaghy AM. Antibacterial activity of calcium hydroxide combined with chitosan solutions and the outcomes on the bond strength of RealSeal sealer to radicular dentin. *J Biomed Res.* 2012; 26(3):193–9.
- 29.** Propiedades, obtención, caracterización y aplicaciones del quitosano [Internet].2015 disponible en: <https://www.researchgate.net/publication>.
- 30.** El apósito de chitosan induce la hemostasia en el modelo porcino de lesión de la arteria femoral [Internet].2008 disponible en <https://www.researchgate.net/publication>.
- 31.** Mazzarelli RAA, El Mehtedi M, Bottegoni C, Gigante A. Physical properties imparted by genipin to chitosan for tissue regeneration with human stem cells: A review. *Int J Biol Macromol.* 2016; 93(Pt B):1366–81.
- 32.** Shrestha A, Cordova M, Kishen A. Photoactivated Polycationic Bioactive chitosan Nanoparticles Inactivate Bacterial Endotoxins. *Journal of Endodontics.* 2015; 41(5):686–91.
- 33.** Younes I, Frachet V, Rinaudo M, Jellouli K, Nasri M. Cytotoxicity of chitosans with different acetylation degrees and molecular weights on bladder carcinoma cells. *Int J Biol Macromol.* 2016; 84:200-7.
- 34.** Ambrogi V, Pietrella D, Nocchetti M, Casagrande S, Moretti V, De Marco S, Ricci M. Montmorillonite–chitosan–chlorhexidine composite films with antibiofilm activity and improved cytotoxicity for wound dressing. *J Colloid Interface Sci.* 2017; 491:265-72.
- 35.** Al-Shaher A, Wallace J, Agarwal S, Bretz W, Baugh D. Effect of Propolis on Human Fibroblasts from the Pulp and Periodontal Ligament. *Journal of Endodontics.* 2004; 30(5):359–61.
- 36.** Murray PE, Farber RM, Namerow KN, Kuttler S, Garcia-Godoy F. Evaluation of Morinda citrifolia as an endodontic irrigant. *J Endod.* 2008; 34(1):66–70.
- 37.** Caetano da Silva SD, Mendes de Souza MG, Oliveira Cardoso MJ, da Silva Moraes T, Ambrósio SR, Sola Veneziani RC, et al. Antibacterial activity of *Pinus*

elliottii against anaerobic bacteria present in primary endodontic infections. *Anaerobe*. 2014; 30:146–52.

38. El antibiograma-Microbiología e Inmunología [internet]. Disponible en <http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar>.

39. Propóleo [internet]. 2017 Disponible en <http://www.botanical online.com>.

40. Tolosa L, Cañizares E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *Ars Pharmaceutica*. 2002; 43(1-2):187-204.

41. Cook EF, Martin EW. Farmacia Práctica de Remington. Segunda edición. México, Uteha; 1965.

42. Cataling A, Silaghi-Dumitrescu, R. & Sârbu, C. Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV-vis spectroscopic data. *J. Food Comp. Anal.* 2011; 24 (4-5):516-522.

43. Mazurek S, Szostak R. Comparison of infrared attenuated total reflection and Raman spectroscopy in the quantitative analysis of diclofenac sodium in tablets. *Vibrational Spectroscopy*. 2011; 57(1):157–162.

44. Morales M, Pérez R, Juárez M, Moreno ML. Manual de microbiología. Segunda edición. 2012.

45. Aquiahuatl Ramos.M. A, Pérez Chabela, M. L. Manual de prácticas del Laboratorio de Microbiología General. México. 2004; 116 p.

46. Delgado ML, Andrade JA, Ramírez CA. Caracterización fisicoquímica de propóleos colectados en el Bosque La Primavera Zapopan, Jalisco. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. 2015; Vol.6 (28): 74-87.

47. Ferreira FB, Torres SA, Rosa OP, Ferreira CM, Garcia RB, Marcucci MC, Gomes BP. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected



endodontic pathogens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 104(5):709-16.

48. Ballal V, Kundabala M, Acharya S, Ballal M. Antimicrobial action of calcium hydroxide, chlorhexidine and their combination on endodontic pathogens. *Aust Dent J.* 2007; 52(2):118-21.

49. Gomes BPF de A, Vianna ME, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CCR, Filho FJ de S. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics.* 2006; 102(4):544-50.

12. ANEXOS

ANEXO A

Tabla A. Prueba de Normalidad.

Antibiótico	Kolmogorov-Smirnov	Grados de libertad	P
Ampicilina	0,391	14	0,000
Hidróxido de calcio	0,332	14	0,000
Clorhexidina	0,391	14	0,000
Propóleo	0,435	14	0,000
Agua destilada	0,407	14	0,000
Chitosan	0,443	14	0,000
Chitosan-propóleo	0,438	14	0,000

Fuente: Base de datos / Elaborado por: Greter Luaces, 2017.

Con la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov se rechaza la hipótesis nula (todos los grupos de estudio presentan igual halo inhibitorio): (p es < 0,005) y se obtiene una distribución no paramétrica.

ANEXO B



Fig. 1 Propóleo bruto

Elaborado por: Grettter Luaces Acosta, 2017

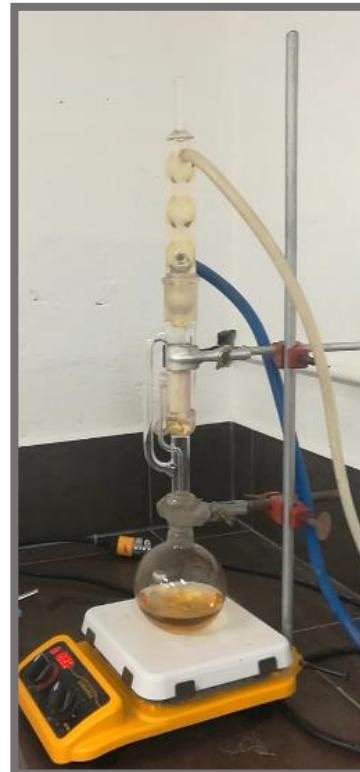


Fig. 2 Extracción del propóleo mediante el Soxleth

Elaborado por: Grettter Luaces Acosta, 2017



Fig. 3 De derecha a izquierda filtración de las impurezas y ceras insolubles

Elaborado por: Greter Luaces Acosta, 2017



Fig. 4 Espectrofotómetro Infrarrojo Thermo Scientific Modelo Nicolet iS5

Elaborado por: Greter Luaces Acosta, 2017

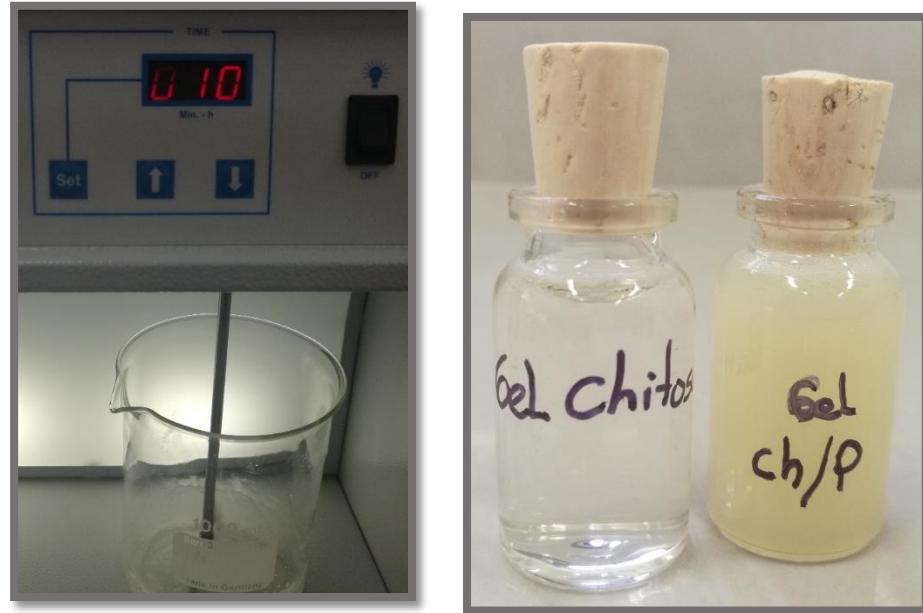


Fig. 5 Obtención de los geles de chitosan

Elaborado por: Grettter Luaces Acosta, 2017



Fig. 6 Siembra de la cepa de Enterococcus faecalis

Elaborado por: Grettter Luaces Acosta, 2017

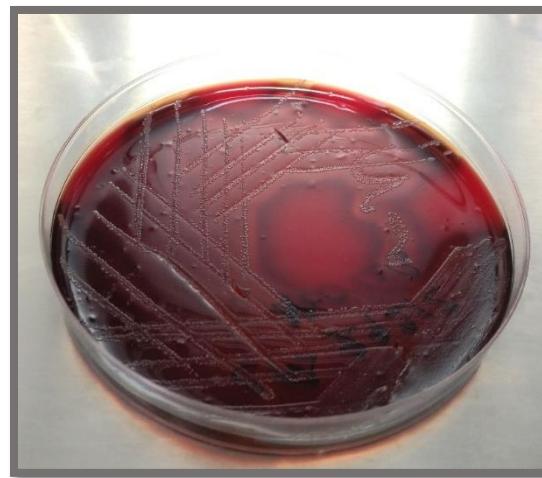


Fig. 7 Comprobación del crecimiento bacteriano de la cepa

Elaborado por: Grettter Luaces Acosta, 2017



Fig. 8 Comprobación de la turbidez del inóculo

Elaborado por: Grettter Luaces Acosta, 2017

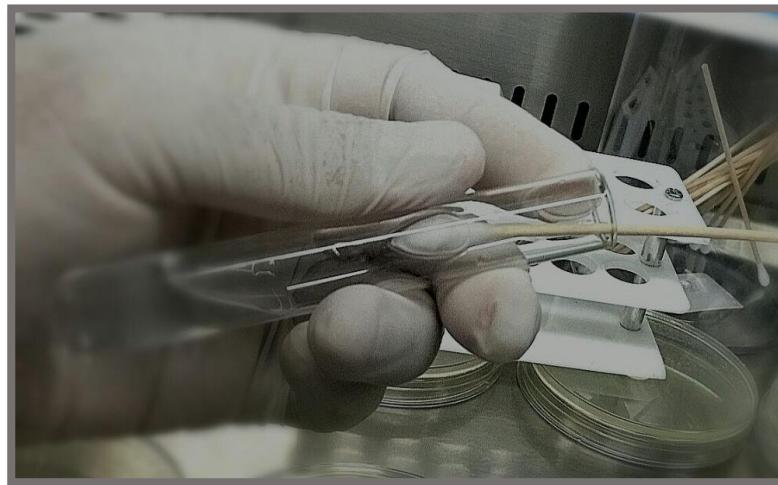


Fig. 9 Retirada del hisopo de la suspensión rotándolo varias veces contra la pared del tubo para eliminar el exceso de inóculo

Elaborado por: Gretter Luaces Acosta, 2017

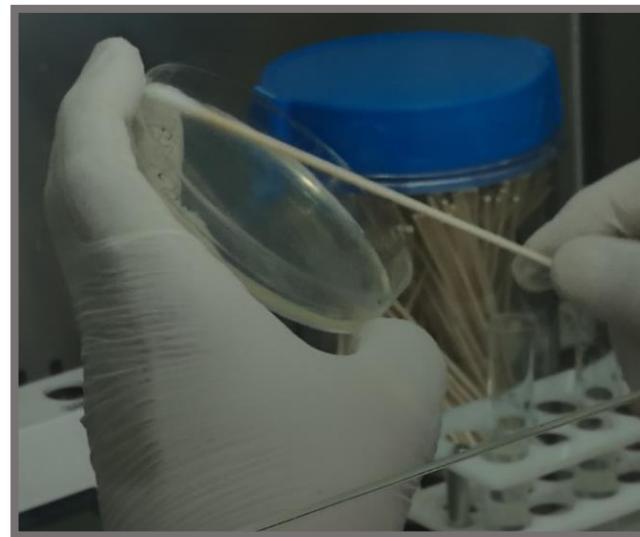


Fig. 10 Siembra del inóculo en el agar Mueller Hinton

Elaborado por: Gretter Luaces Acosta, 2017



Fig. 11 Colocación de la clorhexidina en gel al 2% en los discos

Elaborado por: Grettter Luaces Acosta, 2017

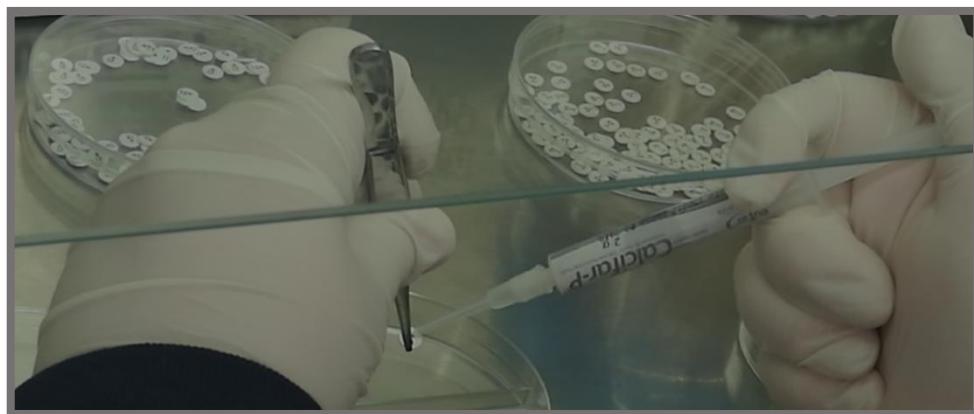


Fig. 12 Colocación del hidróxido de calcio en los discos

Elaborado por: Grettter Luaces Acosta, 2017

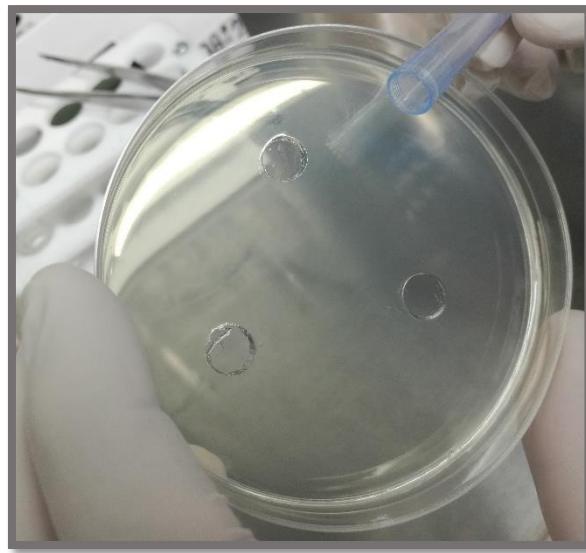


Fig. 13 Elaboración de los pocillos en el agar para la colocación de los geles

Elaborado por: Gretter Luaces Acosta, 2017



Fig. 14 Medición de los halos de inhibición con regla milimétrada

Elaborado por: Gretter Luaces Acosta, 2017



Fig. 15 Halo inhibitorio del gel chitosan/propóleo

Elaborado por: Greter Luaces Acosta, 2017

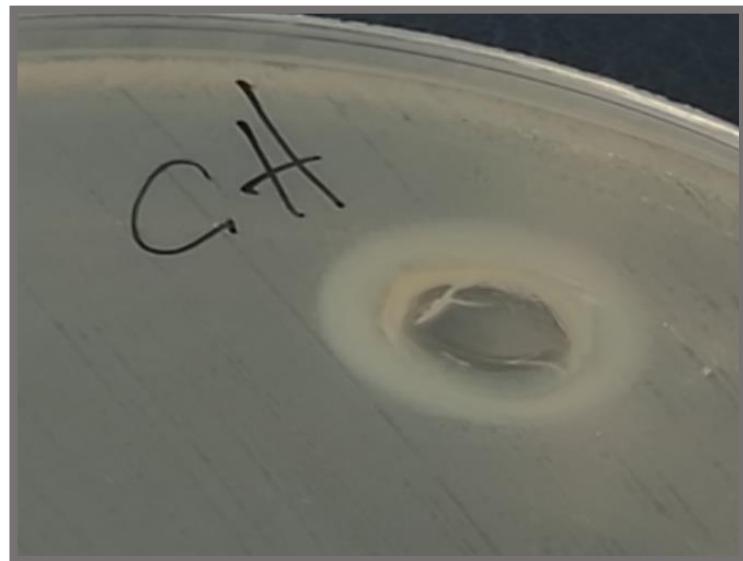


Fig. 16 Halo inhibitorio del gel de chitosan

Elaborado por: Greter Luaces Acosta, 2017

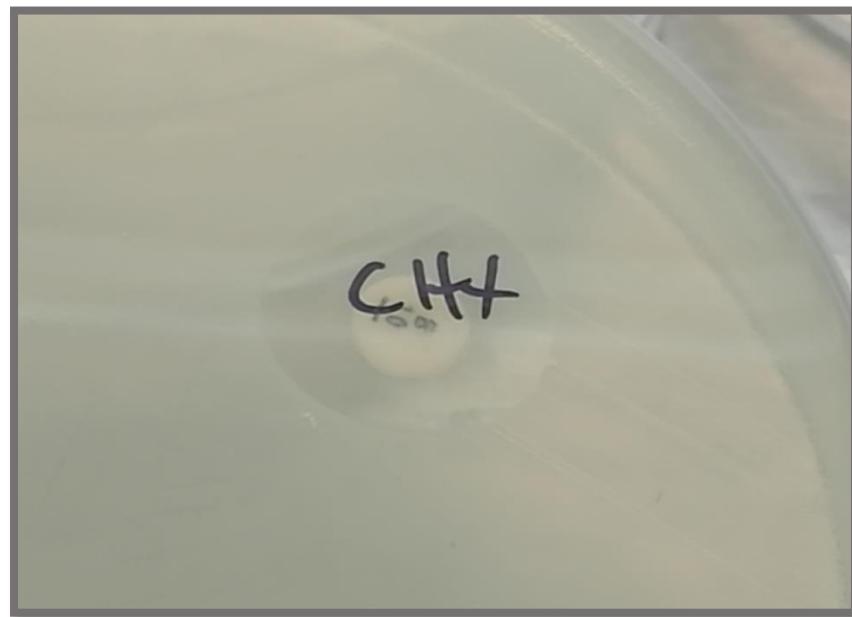


Fig. 17 Halo inhibitorio de la clorhexidina en gel al 2%

Elaborado por: Gretter Luaces Acosta, 2017

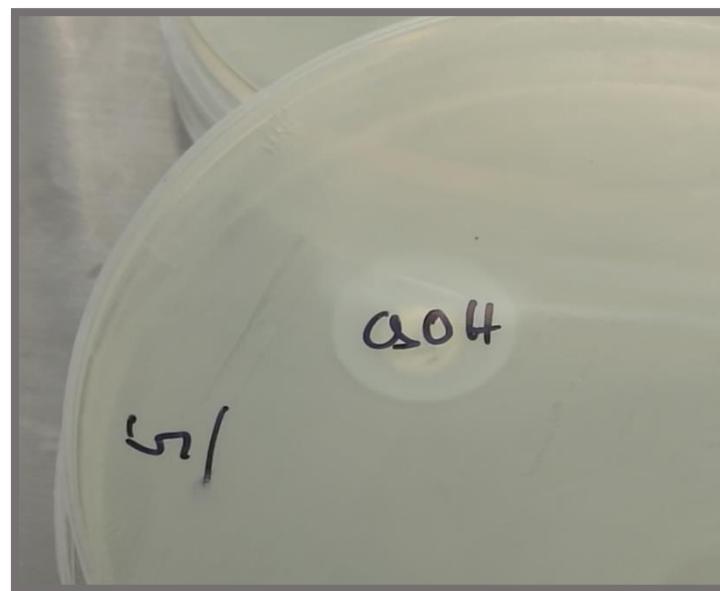


Fig. 18 Halo inhibitorio del hidróxido de calcio (Calcifar-P)

Elaborado por: Gretter Luaces Acosta, 2017

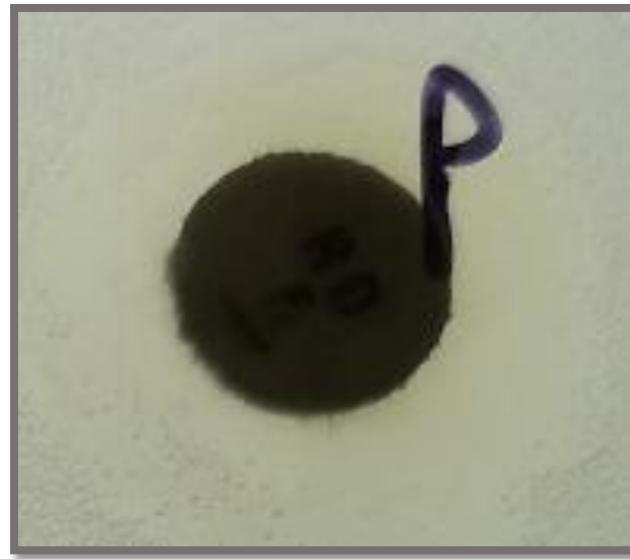


Fig. 19 Halo de inhibición del propóleo

Elaborado por: Grettter Luaces Acosta, 2017

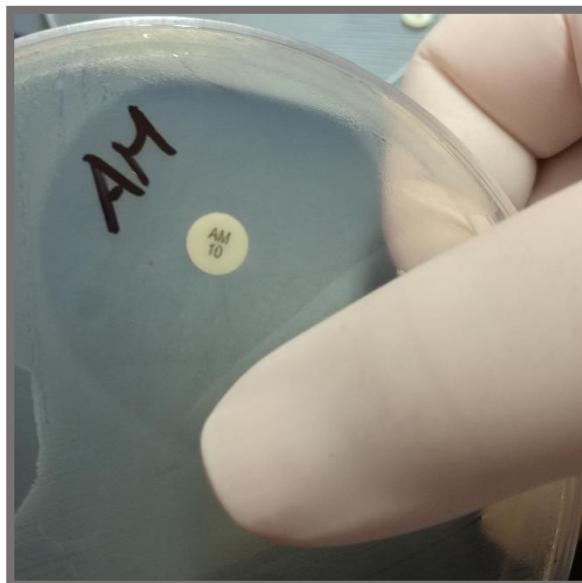


Fig. 20 Halo inhibitorio de la Ampicilina

Elaborado por: Grettter Luaces Acosta, 2017

ANEXO C

FICHA DE MEDICIÓN



UNIVERSIDAD DE CUENCA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Tesis Previa a la Obtención del Título de especialista en endodoncia

TEMA: "ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DEL CHITOSAN/PROPÓLEO EN GEL SOBRE EL *ENTEROCOCCUS FAECALIS*"

Investigadora: **Gretter Luaces Acosta** Período de incubación: 24 horas

Halo inhibitorio en milímetros Temperatura de incubación: 3