



INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD**

**TESIS**

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DE LOS  
EXTRACTOS DE CÁLCICES DE *HIBISCUS*  
*SABDARIFFA* EN *ENTEROCOCCUS*  
*FAECALIS* Y *STREPTOCOCCUS*  
*SANGUINIS* EN UN MODELO *IN VITRO*  
EN PUNTAS DE GUTAPERCHA**

Para obtener el título de

**Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud**

**Presenta:**

C.D. Olga Lidia Cano Silva

**Directora**

Dra. América Patricia Pontigo Loyola

**Codirectora**

Dra. Elena Saraí Baena Santillán

**Comité tutorial**

Dr. Javier Castro Rosas  
Dr. Marco Antonio Becerril Flores  
Dra. María de Lourdes Márquez Corona



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias de la Salud

School of Medical Sciences

Área Académica de Medicina

Department of Medicine

03/12/2025

Asunto: Autorización de impresión

**Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado**  
**Directora de Administración Escolar**  
**Presente.**

El Comité Tutorial de la **TESIS** del programa educativo de posgrado titulada **"Efecto antibacteriano de los extractos de cálices de *Hibiscus sabdariffa* en *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus sanguinis* en un modelo *in vitro* en puntas de gutapercha"**, realizado por la sustentante **Olga Lidia Cano Silva**, con número de cuenta 294262 perteneciente al programa de **Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud**, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

#### AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN


Por lo que la sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

Atentamente

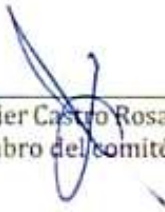
"Amor, Orden y Progreso"


Pachuca, Hidalgo a 03 de diciembre del 2025


El Comité Tutorial

  
Dra. América Patricia Pontigo Loyola  
Directora

  
Dra. Elena Sarmiento Baena Santillán  
Coadirectora

  
Dr. Javier Castro Rosas  
Miembro del comité

  
Dr. Marco Antonio Becerril Flores  
Miembro del comité

  
Dra. María de Lourdes Márquez Corona  
Miembro del comité

Circuito ex-Hacienda la Concepción s/n Carretera  
Pachuca Actopan, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo,  
México. C.P.42168  
Teléfono: 52(771)7172000 Ext. 41556 y 41557  
medicina@uaeh.edu.mx

"Amor, Orden y Progreso"



2025



uaeh.edu.mx

## **Agradecimientos**

A la vida, a la fuerza que se encuentra en el corazón de cada ser humano que nos hace no desistir ante los sueños que nos hace levantarnos y perseverar cada día, Dios gracias por no dejarme sola en ningún momento de mi vida.

A mis padres quienes han sido fuente de inspiración quienes han apoyado cada reto en el que decido embarcarme y que se enorgullecen de mí como yo de ellos.

A mi hijo, Tadeo quien me ha transformado la vida, y me inspiras a ser mejor persona de lo que fui, contigo seguiré aprendiendo y recorriendo la vida de tu pequeña mano siempre, a ti te dedico cada logro que tenga en la vida.

A la UAEH que me ha cobijado desde hace mucho tiempo en sus instalaciones y me ha formado profesionalmente como en su lema lo dice AMOR, ORDEN Y PROGRESO.

A mi Directora de tesis la Dra. América Patricia Póntigo Loyola por su apoyo incondicional.

A mi codirectora la Dra. Elena Saraí Baena Santillán quien confió en mi persona desde el primero momento, mi agradecimiento infinito.

Al Dr. Javier Castro Rosas quien me recibió en su laboratorio donde me sentí como en un segundo hogar.

A mi comité evaluador que ha sido una guía importante para abrirme paso por este camino de la investigación por cada momento que me dedicaron en el que me sentí apoyada.

A cada maestro que tuve los llevo en el corazón con mucho cariño, gracias por sus enseñanzas.

A la Dra. Lizbeth Portillo quien me recibió en una estancia en la Universidad Politécnica Francisco I. Madero quien no dudo en compartir su tiempo y conocimiento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo para la realización de este proyecto.

## ÍNDICE GENERAL

Portada.....	1
Oficio autorización de impresión.....	2
Agradecimiento.....	3
ÍNDICE GENERAL.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS .....	7
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
ABSTRACT .....	11
I. INTRODUCCIÓN .....	12
II. GENERALIDADES .....	14
2.2 Microbioma bucal y tejidos que conforman al diente .....	14
2.3 Caries, enfermedad pulpar y periapical como resultado de disbiosis en el microbioma bucal .....	14
2.3.1 Clasificación de enfermedad pulpar y periapical .....	15
2.3.1.1 Pulpa clínicamente normal .....	16
2.3.1.2 Pulpitis reversible .....	17
2.3.1.3 Pulpitis irreversible asintomática .....	17
2.3.1.4 Pulpitis irreversible sintomática .....	18
2.3.1.5 Necrosis pulpar .....	19
2.3.2. Bacterias patógenas implicadas en enfermedad pulpar y periapical .....	20
2.3.2.1 <i>Enterococcus faecalis</i> .....	20
2.3.2.2 <i>Streptococcus sanguinis</i> .....	21
2.4 Endodoncia .....	21
2.4.1. Irrigantes y desinfectantes utilizados en endodoncia .....	22
2.4.1.1 Hipoclorito.....	23
2.4.1.2 Clorhexidina .....	24
2.4.1.3 EDTA® .....	25
2.5 Materiales de obturación en endodoncia .....	25
2.5.1 Gutapercha.....	26
2.6 Resistencia bacteriana y reinfección después del tratamiento de conductos.....	26

2.7 Efecto antibacteriano de las plantas contra bacterias bucales .....	29
2.7.1 Mecanismos de acción de metabolitos secundarios de plantas .....	29
2.7.1.1. Flavonoides y otros polifenoles .....	30
2.7.1.2 Terpenos .....	30
2.7.1.3 Alcaloides .....	31
2.8 Jamaica ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> ) .....	31
2.8.1 Toxicología de <i>H. Sabdariffa</i> .....	32
2.8.2 Efecto antimicrobiano <i>in vitro</i> de jamaica ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> ).....	32
2.2 Antecedentes del problema .....	34
3. Planteamiento del problema .....	37
III. JUSTIFICACIÓN.....	39
IV. HIPÓTESIS .....	40
V. OBJETIVOS .....	41
5.1 Objetivo General.....	41
5.2 Objetivos Específicos .....	41
VI. MATERIALES Y MÉTODOS .....	42
6.1 Materiales .....	42
6.1.1 Cálices de Jamaica.....	42
6.1.2 Cepas bacterianas .....	42
6.1.3 Medios de cultivo .....	42
6.1.4 Reactivos y disolventes .....	42
6.1.5 Irrigantes y desinfectantes .....	42
6.1.6 Puntas de gutapercha .....	42
6.1.7 Equipo.....	42
6.2 Métodos .....	43
6.2.1 Obtención de extractos de cálices de jamaica ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> ).....	43
6.2.2 Efecto antimicrobiano <i>in vitro</i> de los extractos .....	43
6.2.2.1 Preparación de las cepas bacterianas .....	43
6.2.2.2 Preparación de los extractos .....	44
6.2.3 Efecto antimicrobiano por técnica de difusión en agar .....	44
6.2.4 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB).....	44
6.2.5 Curva de muerte.....	45

6.2.6 Adherencia bacteriana a las puntas de gutapercha .....	46
6.2.7 Manejo de RPBI después de la experimentación. ....	47
6.3 Contexto de la investigación.....	49
6.4 Diagrama de metodología general.....	50
6.5 Definición de variables (dependientes, independientes).....	51
6.6 Análisis Estadístico .....	52
VII. RESULTADOS.....	53
7.1 Rendimiento de extracto según solvente utilizado .....	53
7.2 Valores de pH de los extractos e irrigantes y desinfectantes utilizados en endodoncia.....	53
7.3 Efecto antimicrobiano por técnica de difusión en agar.....	54
7.4 Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida de .....	54
extractos de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i> .....	54
7.5 Efecto de los extractos de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i> en la sobrevivencia de <i>E. faecalis</i> y <i>S. sanguinis</i> . ....	55
7.6 Adherencia bacteriana a puntas de gutapercha.....	62
7.7 Desinfección de puntas de gutapercha.....	63
VIII DISCUSIÓN .....	65
8.1 Efecto antimicrobiano por técnica de difusión en agar .....	67
8.2 Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida de los extractos de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i> .....	69
8.2.1 Determinación del efecto bactericida/bacteriostático de las soluciones de ensayo.	69
IX CONCLUSIONES .....	72
X RECOMENDACIONES .....	73
XI REFERENCIAS .....	74
XII ANEXOS .....	85

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Esquema de metodología general.

**Figura 2.** Efecto del extracto acuoso de cálices de *Hibiscus sabdariffa* variedad Tecoanapa de Guerrero sobre recuentos de células viables de *E. faecalis* en intervalos de tiempo.

**Figura 3.** Efecto del extracto etanólico de cálices de *Hibiscus sabdariffa* variedad Tecoanapa de Guerrero sobre recuentos de células viables de *E. faecalis* en intervalos de tiempo

**Figura 4.** Efecto del extracto de acetato de etilo de cálices de *Hibiscus sabdariffa* variedad Tecoanapa de Guerrero sobre recuentos de células viables de *E. faecalis* en intervalos de tiempo.

**Figura 5.** Efecto del extracto de acetona de cálices de *Hibiscus sabdariffa* variedad Tecoanapa de Guerrero sobre recuentos de células viables de *E. faecalis* en intervalos de tiempo.

**Figura 6.** Efecto del extracto acuoso de cálices de *Hibiscus sabdariffa* variedad Tecoanapa de Guerrero sobre recuentos de células viables de *S. sanguinis* en intervalos de tiempo.

**Figura 7.** Efecto del extracto etanólico de cálices de *Hibiscus sabdariffa* variedad Tecoanapa de Guerrero sobre recuentos de células viables de *S. sanguinis* en intervalos de tiempo.

**Figura 8.** Efecto del extracto de acetato de etilo de cálices de *Hibiscus sabdariffa* variedad Tecoanapa de Guerrero sobre recuentos de células viables de *S. sanguinis* en intervalos de tiempo.

**Figura 9.** Efecto del extracto acuoso de acetona de cálices de *Hibiscus sabdariffa* variedad Tecoanapa de Guerrero sobre recuentos de células viables de *S. sanguinis* en intervalos de tiempo.

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Validación de pruebas de sensibilidad pulpa clínicamente normal

**Tabla 2.** Validación de pruebas para pulpitis reversible

**Tabla 3.** Validación de pruebas para pulpitis irreversible asintomática

**Tabla 4.** Validación de pruebas para pulpitis irreversible sintomática

**Tabla 5.** Validación de pruebas para necrosis pulpar

**Tabla 6.** Grupos de sustancias utilizadas en la prevención y el control de la placa dental

**Tabla 7.** Estudios del efecto antibacteriano de los extractos de cálices de *H. sabdariffa*

**Tabla 8.** Antecedentes de desinfección de puntas de gutapercha

**Tabla 9.** Tipo de residuos estado físico, envasado y color.

**Tabla 10.** Definición de variables

**Tabla 11.** Rendimiento de los extractos cálices de *Hibiscus sabdariffa* variedad Teconoapa de Guerrero 100 g de cálices con diferentes solventes

**Tabla 12.** Valores de pH de los extractos de cálices de *Hibiscus sabdariffa* e irrigantes intraconducto

**Tabla 13.** Diámetros de halos de inhibición de extractos de cálices de cálices de *Hibiscus sabdariffa* variedad Tecoanapa de Guerrero e irrigantes comerciales contra dos cepas de bacterias patógenas orales.

**Tabla 14.** Concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración mínima bactericida (CMB) y relación CMI/CMB de extractos de cálices de *Hibiscus sabdariffa* variedad Teconoapa de Guerrero contra dos cepas patógenas orales.

**Tabla 15.** Adherencia bacteriana de *E. faecalis* a los conos de gutapercha

**Tabla 16.** Adherencia bacteriana de *S. sanguinis* a los conos de gutapercha

**Tabla 17.** Desinfección de puntas utilizando los extractos de cálices de *H. sabdariffa* para *E. faecalis*



**Tabla 18.** Desinfección de puntas utilizando los extractos de cálices de *H. sabdariffa* para *S. sanguin*

## RESUMEN

El fracaso de tratamiento de endodoncia se debe principalmente a que algunas bacterias logran sobrevivir a los procedimientos de desinfección, tanto del canal radicular, como de sus materiales de obturación como la gutapercha. El objetivo del presente estudio experimental *in vitro* fue determinar el efecto antibacteriano de compuestos de cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) variedad Tecanapa de Guerrero en la inhibición de *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus sanguinis* sobre puntas de gutapercha. Para ello se utilizaron extractos acuosos, etanólicos, acetónicos y de acetato de etilo a partir de cálices de *Hibiscus sabdariffa* variedad Tecanapa de Guerrero, comparados con la actividad de irrigantes y desinfectantes que se utilizan actualmente en endodoncia como hipoclorito de sodio (NaClO), EDTA® y clorhexidina utilizando técnica de difusión en placa mediando los halos de inhibición. También se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima bactericida (CMB) de los extractos mediante el método de macro dilución en caldo y técnica de vertido en placa. Se utilizó además un experimental *in vitro* en puntas de gutapercha para determinar la adherencia bacteriana y el efecto antimicrobiano en medio de cultivo de los extractos de cálices de *H. sabdariffa*. Los experimentos se replicaron tres veces. Se realizó un análisis exploratorio de datos para comprobar los supuestos de igualdad de varianzas y distribución normal de errores de los resultados obtenidos de la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos cálices de *H. Sabdariffa* e irrigantes intraconducto. Los logaritmos de las UFC se analizaron con el programa estadístico Statgraphics Centurion para el análisis de varianza de una sola vía (ANOVA). Se realizó comparación de medias con la prueba de Tukey. Los resultados mostraron que todos los extractos de cálices de *Hibiscus sabdariffa* mostraron actividad antimicrobiana bactericida en las bacterias patógenas estudiadas teniendo resultados similares a hipoclorito y clorhexidina. Los extractos con mejores resultados fueron los de acetato de etilo y acetona. Los componentes bioactivos de estos extractos son potenciales para su posterior uso en pruebas como irrigante intraconducto.

**Palabras clave:** *Hibiscus sabdariffa*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sanguinis*, actividad antimicrobiana, irrigantes intraconducto, puntas de gutapercha

## ABSTRACT

Failure of endodontic treatment is mainly due to the fact that some bacteria survive the disinfection procedures, both of the root canal and of its filling materials such as gutta-percha. The objective of this *in vitro* experimental study was to determine the antibacterial effect of compounds from calyxes of jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) variety Tecanapa de Guerrero on inhibition of *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus sanguinis* on gutta-percha tips. Aqueous, ethanolic, acetonic and ethyl acetate extracts from *H. sabdariffa* variety Tecanapa de Guerrero were used compared with the activity of irrigators and disinfectants currently used in endodontics such as sodium hypochlorite (NaClO), EDTA® and chlorhexidine using sing plate diffusion technique to measure inhibition halos. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (BMC) of the extracts were also determined by the macro dilution in broth method and plate pouring technique. An *in vitro* experiment on gutta-percha tips was also used to determine the bacterial adhesion and antimicrobial effect calyxes extracts of *H. sabdariffa* in culture medium. The experiments were repeated at least three times. An exploratory analysis of data was performed to verify the equal variance and normal error distribution assumptions of the *in vitro* antimicrobial activity results for calyxes extracts of *H. sabdariffa* and intra-conduit irritating extracts. The logarithms of the CFU were analyzed with the statistical program Statgraphics for the analysis of variance of a single path (ANOVA). Comparison of averages with the Tukey test. The results showed that all extracts based on calyxes of *Hibiscus sabdariffa* showed bactericidal antimicrobial activity in the pathogenic bacteria studied. The best performing extracts were those of ethyl acetate and acetone. The bioactive components of these extracts are potential for further use in tests as an intraduct irrigator.

**Keywords:** *Hibiscus sabdariffa*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sanguinis*, antimicrobial activity, irritating intraduct, gutta-percha

## I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de la cavidad oral son un problema de salud pública para muchos países del mundo. Dentro de las patologías con más prevalencia se encuentra la caries dental, esta logra acceder a los tejidos más profundos del diente como la pulpa dental afectando este tejido que da irrigación e inervación a estos órganos dentarios causándoles procesos infecciosos.<sup>1</sup>

Una opción para tratar dientes ampliamente destruidos por esta patología es realizar un tratamiento de conductos también conocido como endodoncia, cuyo objetivo principal es lograr una minuciosa limpieza mecánica y química del sistema de canales radiculares, para luego sellarlos tridimensionalmente con un material inerte como la gutapercha y así prevenir su reinfección.<sup>2</sup>

Posterior a esto, se procede a la rehabilitación de la corona dentaria, con lo que se logra finalmente limitar el daño por caries dental y prevenir la pérdida de dientes. A pesar de que este tipo de terapias tienen un pronóstico favorable si se indican de forma adecuada, la literatura señala que existe la posibilidad de fracaso. Una de las principales causas de fracaso en los tratamientos de endodoncia es la remoción incompleta del tejido pulpar o de los microorganismos presentes en los túbulos dentinarios. Estos microorganismos tienen la capacidad de sobrevivir a los procedimientos biomecánicos o haber invadido los canales radiculares a través de la filtración coronal en dientes con raíces obturadas.<sup>3</sup>

Diversos estudios han revelado que la microbiota presente en los canales radiculares de raíces con tratamiento endodóntico difiere de la que normalmente se encuentra en los dientes no tratados. En este sentido, referente a los microorganismos, la literatura señala que las bacterias más frecuentemente encontradas en tratamientos realizados por primera vez, así como en aquellos con recidiva de infección, se limitan a una variedad muy específica de microorganismos, donde predominan especies Gram positivas, anaerobias facultativas, entre las que destacan *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium* y *Enterococcus faecalis*, así mismo, se encuentran otras como *Streptococcus sanguinis* que no es propia del conducto, pero se encuentra también en el biofilm dental y nos sirve como referente del comportamiento bacteriano ante la actividad antimicrobiana de nuestros extractos e irrigantes. Estas bacterias han sido aisladas tanto al interior del sistema de canales

radiculares como en lesiones periapicales. También se ha encontrado en dientes infectados sin historia de tratamiento de endodoncia previo, pero donde se observa con mayor frecuencia es en dientes que han presentado recidiva, es decir, fracaso del procedimiento endodóntico.<sup>4</sup>

Las soluciones desinfectantes e irrigantes intraconducto que se han utilizado en los últimos años han presentado resultados parcialmente exitosos puesto que la ciencia está generando constantemente cuestionamiento acerca de su uso y efectos no benéficos en distintos pacientes que van desde quemaduras en tejidos circundantes hasta efectos tóxicos o anafilácticos, por lo que es importante buscar alternativas con productos naturales con efecto antimicrobiano contra patologías infecciosas radiculares.

## **II. GENERALIDADES**

### **2.2 Microbioma bucal y tejidos que conforman al diente**

La ecología bucal humana ha sido estudiada desde tiempos remotos, es diversa y compleja, comprende bacterias, micro eucariotas, arqueas y virus; esta se encuentra elaborada y estructurada de tal forma que el intercambio metabólico de un estado local se encuentra explicado por distintos microambientes de la cavidad oral. Recientes estudios han demostrado la existencia de más de 700 especies bacterianas. La microbiota oral tiene un papel importante en la salud bucal, ya que las enfermedades bucales más prevalentes, la caries dental, la enfermedad periodontal, tienen etiologías principalmente microbianas.<sup>6</sup>

La composición del microbioma oral se determina a lo largo de la vida de los seres humanos por factores que incluyen la genética del huésped y la transmisión materna, así como por factores ambientales, como hábitos alimentarios, la práctica de higiene bucal, los medicamentos, los niveles de estrés y los factores sistémicos. En lugar de ser fija, la composición de la microbiota oral cambia a lo largo de la vida, en consonancia con el hecho de que es un entorno dinámico.<sup>7</sup>

Un diente es una estructura anatómica calcificada que se localiza en la cavidad oral de múltiples especies y que en los humanos tiene como diferentes funciones, como la masticación y fonación. Los dientes están compuestos de múltiples tejidos de diferente densidad y dureza: como el esmalte (el tejido más externo y duro) compuesto en gran parte por minerales como, el calcio, que lo hacen resistente a la masticación y al desgaste; asimismo, la dentina (debajo del esmalte) un tejido duro y poroso que contiene fibras de Tomes que son prolongaciones de los odontoblastos contenidos en la pulpa; otro tejido es el cemento (recubre la raíz del diente) que permite una fijación en el hueso maxilar y la pulpa (el tejido blando interno con nervios y vasos sanguíneos).<sup>8</sup>

### **2.3 Caries, enfermedad pulpar y periapical como resultado de disbiosis en el microbioma bucal**

La caries dental es una enfermedad bucodental multifactorial grave que provoca la desmineralización de los tejidos duros del diente y afecta a más de la mitad de la población mundial. Es el resultado de una disbiosis dental, esto ocurre cuando el equilibrio natural de

bacterias beneficiosas y patógenas en la boca se altera, este desequilibrio en el microbioma oral que permite la proliferación de bacterias productoras de ácido, como *Streptococcus mutans* y lactobacilos, las cuales metabolizan azúcares y producen ácidos que desmineralizan el esmalte dental, causando las cavidades características de la caries. Se encuentra asociada a distintos factores relacionados como el sexo, estado nutricional, tipo de dentición, educación, condiciones de vida, nivel económico y el tipo de área demográfica.<sup>9</sup>

Las enfermedades pulpares y periapicales, son enfermedades bucales con mayor prevalencia, suelen ser el resultado de un daño irreversible a la pulpa dental como resultado de estímulos intensos y severos, como caries dental, traumatismo accidental o causas iatrogénicas.<sup>10</sup> Dentro de las paredes dentinarias se localiza la pulpa dental, que es un tejido vascularizado e innervado que proporciona diversas funciones al diente, como responder a señales externas, proporcionar nutrición y mejorar la sensibilidad neuronal reparando a través de la mineralización.<sup>7</sup> La pérdida de este tejido hace que el diente pierda vitalidad y por tanto requiera de tratamiento endodóntico. La terapia de conducto radicular es un tratamiento clásico y eficaz utilizado en la práctica dental con tasas de éxito aceptables para el tratamiento de estas enfermedades.<sup>10, 11</sup>

### **2.3.1 Clasificación de enfermedad pulpar y periapical**

La etiología de la afectación pulpar puede estar derivada por distintas razones, una de ellas son las infecciones que son producidas por microorganismos, en su mayoría anaerobios y bacterias Gram negativos, que son una de las causas más importantes que pueden afectar la pulpa.<sup>12</sup> Algunos autores confirman la importancia de estos microorganismos como causantes de dichas patologías. Esta infección puede llegar a la pulpa a través de la corona o de la raíz del diente. Las caries, las fisuras o fracturas y los defectos del desarrollo dentario son las causas más frecuentes de infección a través de la corona. Por la raíz, son caries del cuello, bolsas periodontales y las bacteremias.<sup>13</sup>

Así mismo se encuentran otras causas como los traumatismos dentoalveolares que pueden provocar luxaciones dentales, fisuras o fracturas coronales, radiculares o combinadas; así mismo otras patologías, como el bruxismo o la abrasión dental y otras causas iatrogénicas en la preparación incorrecta de cavidades o desgastes dentales.<sup>14</sup>

La patología pulpar y periapical es un proceso que se desarrolla como una respuesta inflamatoria como un mecanismo directo e inmunitario. Los mecanismos directos son considerados los microorganismos que acceden a la pulpa a través de los túbulos dentinarios expuestos por caries, traumatismos o factores irritantes.<sup>15</sup>

La patología pulpar en forma de pulpitis y necrosis produce alteración periapical, además la etiología iatrogénica debido a la sobre instrumentación o sobre obturación en los tratamientos de conductos radiculares. Para su diagnóstico se requiere pruebas radiográficas y de sensibilidad a ciertos estímulos.<sup>16</sup>

### 2.3.1.1 Pulpa clínicamente normal

La pulpa dental es un tejido altamente vascularizado e innervado ubicado dentro de las paredes dentinarias rígidas, y realiza varias funciones, como responder a señales externas, proporcionar nutrición y mejorar la sensibilidad neuronal reparando la pulpa a través de la mineralización. Clínicamente el tejido pulpar se encuentra asintomático y responden a pruebas de sensibilidad pulpar. El tejido pulpar está libre de síntomas responde a pruebas de sensibilidad, no hay evidencia de sintomatología espontánea como se muestra en la tabla 1 donde podemos encontrar el resultado de estas diversas pruebas, su intensidad y duración. La imagen radiográfica no presenta cambios en tejidos periapicales, no se observa reabsorción, caries o exposición mecánica a la pulpa.<sup>17, 18, 19</sup>

**Tabla 1. Validación de pruebas de sensibilidad pulpa clínicamente normal**

Prueba	Resultado*	Intensidad	Duración	Especificidad %
Térmica frío	+	Leve/moderada	Desaparece, 1 a 2 segundos después de retirar el estímulo	70-92
Térmica calor	-			41-81
Eléctrica	+	Leve/moderada	Desaparece al retirar el estímulo	92-93
Cavitaria	+	Leve/moderada	Desaparece al retirar el estímulo	
Percusión	-			51
Palpación	-			



---

Movilidad -

---

\* + Respuesta positiva a esta prueba - Respuesta negativa a esta prueba

### 2.3.1.2 Pulpitis reversible

Cuando la pulpa es estimulada se puede dar el siguiente diagnóstico clínico, la pulpitis reversible que está basado en hallazgos objetivos y subjetivos, indicando que la inflamación puede resolverse y la pulpa podría regresar a la normalidad. Se presenta en obturaciones fracturadas o destapadas, tratamientos restaurativos recientes con sensibilidad posoperatoria, caries, abrasión, trauma, retracciones gingivales. Esto por la exposición de los tubulos dentinarios que contienen a las fibrillas de Tomes que transmiten al diente cierta sensibilidad, el paciente puede presentar leve a moderada incomodidad, sin antecedentes de dolor espontáneo o severo ante la aplicación de estímulos térmicos, respuesta rápida, de corta duración, caracterizados por dolores leves que desaparecen pocos segundos después de retirar el estímulo como se muestra en la tabla 2. En caso de pérdida parcial de la estructura dental, dolor leve al morder. No evidencia de dolor a la percusión o palpación.<sup>17, 18,19</sup>

**Tabla 2. Validación de pruebas para pulpitis reversible**

Prueba	Resultado *	Intensidad	Duración	Especificidad %
Térmica frío	++	Hipersensible	Desaparece al retirar el estímulo	68-92
Térmica calor	+/-	Nula a leve		68-86
Eléctrica	+	Aumentada		71- 98
Cavitaria	+	Aumentada		
Percusión	-			
Palpación	-			
Movilidad	-			

\* + Respuesta positiva a esta prueba - Respuesta negativa a esta prueba

### 2.3.1.3 Pulpitis irreversible asintomática

Cuando el nervio del diente se encuentra ya invadido, se presenta una pulpitis irreversible asintomática, siendo el diagnóstico clínico basado en hallazgos subjetivos y objetivos, que indican que la pulpa vital inflamada es incapaz de cicatrizar, presenta características como

carencia de sintomatología, pero con proceso inflamatorio que puede avanzar hasta la necrosis. Caries de larga evolución, profunda con o sin exposición pulpar aparente, recubrimiento pulpar directo, restauraciones profundas, preparaciones cavitarias, persistencia de una agresión de baja intensidad y larga duración como se muestra en la tabla 3. La imagen radiográfica no evidencia cambios en la zona periapical, en algunos casos se relaciona con la imagen de osteítis condensante, incremento en los patrones de trabéculado óseo, radio-opacidad periapical.<sup>17, 18,1</sup>

**Tabla 3. Validación de pruebas para pulpitis irreversible asintomática**

Prueba	Resultado *	Intensidad	Duración	Especificidad %
<i>Térmica frío</i>	+	Leve/ Moderada	Desaparece al retirar el estímulo o permanece con moderada a baja intensidad	68-92
<i>Térmica calor</i>	+	Leve/ Moderada		68-86
<i>Eléctrica</i>	+/-	Leve/ Moderada		71- 98
<i>Cavitaria</i>	+			
<i>Percusión</i>	-	Negativa/ Leve	Desaparece al retirar el estímulo	70
<i>Palpación</i>	-	Variable		
<i>Movilidad</i>	-			

\* + Respuesta positiva a esta prueba - Respuesta negativa a esta prueba

#### 2.3.1.4 Pulpitis irreversible sintomática

La causa más común es la invasión bacteriana de la pulpa por caries, a pesar de que las otras causas tales como químicas, térmicas o mecánicas, también pueden dar esta consecuencia. Una pulpitis reversible puede deteriorarse en irreversible. El diagnóstico está basado en indicar que el tejido pulpar es incapaz de cicatrizar. Debido a la caries obturaciones destapadas, extensas, enfermedades endoperiodontales, atrición recubrimiento pulpar directo. El dolor es prolongado, persistente, espontáneo, referido o de aparición inmediata a la estimulación térmica, hiperosmótica con aumento de calor, sensación transitoria de alivio a muy bajas temperaturas como se muestra en la tabla 4; la respuesta a múltiples estímulos,

puede ser pulsátil, localizado, referido o irradiado, relacionado con cambios posturales y de aparición nocturna. Puede haber o no dolor a la percusión y sensibilidad al morder. Requiere toma de analgésicos.

Radiográficamente la corona se asocia evidentemente del factor etiológico con la cavidad pulpar. Si el proceso inflamatorio se extiende hacia el área periapical, se observa aumento del espacio del ligamento periodontal.<sup>17, 18,19</sup>

**Tabla 4. Validación de pruebas para pulpitis irreversible sintomática**

Prueba	Resultado *	Intensidad	Duración	Especificidad %
Térmica frío	++	Aumentada	Se mantiene al retirar el estímulo, prolongado.	68-92
Térmica calor	+++	Aumentada		68-86
Eléctrica	++	Moderada		71- 98
Cavitaria	++++	Severa		
Percusión	++	Severa		70
Palpación	-			
Movilidad	+	Sensación de diente extruido	Al aplicar la prueba	

\*+ Respuesta positiva a esta prueba - Respuesta negativa a esta prueba

### 2.3.1.5 Necrosis pulpar

La necrosis pulpar es la categoría de diagnóstico clínico que indica la muerte del tejido pulpar usualmente presenta respuesta negativa ante test de sensibilidad, el diente presenta translucidez dental alterada por hemolisis de glóbulos rojos durante el proceso de descomposición del tejido pulpar cambio de color coronal, con tonalidad parda, verdosa o grisácea. Puede presentar caries profunda, restauración desalojada, microfiltración o exposición al medio oral. Normalmente asintomática con respuesta leve a estímulos de calor, como se muestra en la tabla 5; la apariencia radiográfica es variable, si la lesión bacteriana avanza se observará alteración en el área periapical.<sup>16, 17,1</sup>

**Tabla 5. Validación de pruebas para necrosis pulpar**

Prueba	Resultado *	Intensidad	Duración	Especificidad %
Térmica frío	-		Se mantiene al retirar el estímulo, prolongado.	68-92
Térmica calor	-/+	Ocasional		68-86
Eléctrica	-			71- 98
Cavitaria	-			
Percusión	-			70
Palpación	-			68-86
Movilidad				68-92

\* + Respuesta positiva a esta prueba - Respuesta negativa a esta prueba

### **2.3.2. Bacterias patógenas implicadas en enfermedad pulpar y periapical**

Existen factores químicos y físicos que pueden inducir la inflamación perirradicular, la evidencia indica que los agentes microbiológicos son esenciales en la progresión y perpetuación de la patología inflamatoria perirradicular. Miller en 1980, fue el primero en demostrar la invasión de los túbulos dentinarios de la dentina cariada y no cariada e informó que en la microflora tubular se encontraban cocos y bacilos.<sup>17</sup>

El conducto infectado constituye el principal motivo de irritación persistente en los tejidos perirradiculares, además, los microorganismos implicados en las infecciones intrarradiculares y extrarradiculares son los que producen mayor fracaso en la terapia endodóntica.<sup>18</sup>

#### **2.3.2.1 *Enterococcus faecalis***

Los enterococos son microorganismos anaerobios facultativos Gram positivos que se pueden encontrar individualmente, en parejas o como cadenas cortas; estos crecen en medios con presencia o ausencia de oxígeno y pueden sobrevivir en ambientes desfavorables con pH alcalino. Son resistentes a las sales biliares, detergentes, metales pesados, etanol, ácidos y desecación. Pueden crecer en temperaturas de 10- 45 grados centígrados y sobrevivir hasta 60 grados centígrados por 30 minutos; es la especie encontrada con mayor frecuencia en los

conductos de dientes en tratamiento de endodoncia tienen prevalencias que rondan el 90 % de los casos. El hecho de que esta bacteria se encuentre más habitualmente en dientes tratados o cuando se han realizado varias citas o se ha dejado abierto el diente para drenaje sugiere que invade y coloniza de manera secundaria el conducto y luego se hace persistente.<sup>19</sup>

#### **2.3.2.2 *Streptococcus sanguinis***

Es un organismo Gram positivo de la variedad de *Streptococcus viridians*, considerado un colonizador fronterizo comensal de los dientes y una de las especies más comunes en la biopelícula oral. La placa dental, las caries y la gingivitis/periodontitis son causadas por la disbiosis de la flora oral este microorganismo; también se encuentra en la sangre, o en las válvulas cardíacas en la endocarditis subaguda e infrecuentemente en la saliva y en las muestras faríngeas. Las formas L se asocian con la estomatitis aftosa recurrente. Una vez que entra en la circulación sanguínea y se adhiere o coloniza válvulas se asocia a la causa más común de endocarditis bacteriana subaguda. Algunos autores también la han encontrado presente en los conductos radiculares ya que en infecciones secundarias o absesos se encuentra flora tanto aerobia, anaerobia y microorganismos facultativos.<sup>20</sup>

### **2.4 Endodoncia**

La endodoncia representa una disciplina clínica que comprende el desarrollo de actividades académicas especializadas en microbiología, biología oral, patología, epidemiología, radiología y biomateriales; todas al servicio del diagnóstico, la prevención y el tratamiento de la patología pulpar periapical, mediante la comparación de los signos y síntomas propios de cada patología. Los tratamientos endodónticos, tanto quirúrgicos como no quirúrgicos, tienen una alta tasa de éxito en el tratamiento y la prevención de la periodontitis apical cuando se realizan según los principios clínicos estándar y aceptados. Sin embargo, en algunos casos persisten lesiones periapicales endodónticas, por lo que se debe considerar un tratamiento adicional cuando la periodontitis apical persiste. Si bien se han propuesto diversas modalidades de tratamiento para dientes endodónticos con periodontitis apical persistente, se necesitan métodos menos invasivos con resultados más predecibles.<sup>21</sup>

### **2.4.1. Irrigantes y desinfectantes utilizados en endodoncia**

Son sustancias que pueden ser aplicadas de manera tópica sobre tejidos vivos, teniendo la capacidad de destruir microorganismos o de inhibir su reproducción. Las sustancias que se emplean sobre objetos inanimados con el mismo objetivo se denominan desinfectantes. La diferencia entre antiséptico y desinfectante depende esencialmente de la concentración empleada. En dosis bajas, una sustancia puede comportarse como antiséptico, mientras que, su concentración más alta, resultarían lesivas para los tejidos se emplean como desinfectante. Los desinfectantes y antisépticos constituyen una herramienta esencial para controlar la diseminación de agentes infecciosos. Con su uso de manera apropiada se pueden obtener máximos beneficios, debemos tomar en cuenta que, ningún antiséptico es universalmente eficaz; algunos agentes químicos son buenos como antisépticos, pero no son efectivos como desinfectantes o ciertos desinfectantes resultan tóxicos como antisépticos.<sup>22</sup>

Las sustancias químicas actúan sobre la placa cuantitativa y cualitativamente; por ejemplo, los agentes antiadhesivos evitan la adherencia bacteriana; las sustancias anti-putrefacción o los hipocloritos son anti-adhesivos, pero son tóxicos en el medio oral. Los agentes antimicrobianos detienen o retrasan la proliferación bacteriana. Dichas sustancias químicas también alteran la formación del biofilm dental, los grupos de sustancias utilizadas en la prevención y control de la placa dental se muestran en la tabla 6.<sup>23</sup> Los agentes inhibitorios más eficaces son aquellos cuya acción persiste en la boca durante el mayor tiempo posible, la persistencia de la acción o sustentividad depende de varios factores:

1. Retención prolongada por adsorción en las superficies bucales, incluidos los dientes cubiertos por biofilm.
2. Conservación de la actividad antimicrobiana una vez adsorbidos.
3. Neutralización de la actividad antimicrobiana en medio bucal o lenta desaparición de las superficies.<sup>24 25</sup>

**Tabla 6. Grupos de sustancias utilizadas en la prevención y el control de la placa dental**

<i>Grupo</i>	
Antibióticos	Penicilina, vancomicina, kanamicina, espiramicina.
Enzimas	Proteasa, lipasa, nucleasas, dextranasa, multanasa, glucosa oxidasa, aminoglucosidasa.
Antisépticos bisguanídicos	Clorhexidina, alexidina, oclenitidina.
Compuestos de amonio cuaternario	Cloruro de cetilpiridino, cloruro de benzalconio.
Fenoles y aceites esenciales	Timol, hexilresorcinol, eucaliptol, triclosán.
Fluoruros	Fluoruro sódico, monofluorofosfato sódico, fluoruro estañoso, fluoruro de amina.
Agentes oxidantes	Peróxido de hidrogeno, peroxibato sódico, peroxicarbonato sódico.
Alcoholes aminados	Octapinol, delmopinol.
Sales metálicas	Estaño, zinc y cobre.
Detergentes	Laurisulfato sódico.

#### **2.4.1.1 Hipoclorito**

El hipoclorito de sodio (NaClO) ha sido definido por la Asociación Americana de Endodoncia como un líquido claro, pálido, verde-amarillento, extremadamente alcalino y con fuerte, que presenta una acción disolvente sobre el tejido necrótico y restos orgánicos, además de ser un potente agente antimicrobiano. A pesar de que el hipoclorito de sodio es ampliamente utilizado en endodoncia, aún no existe un consenso sobre la concentración ideal. Una irrigación frecuente y copiosa con una solución de hipoclorito de sodio al 2.5 % de concentración, puede mantener una reserva suficiente de cloro para eliminar un número significativo de células bacterianas, compensando el efecto irritante causado por el uso de concentración altas.<sup>26</sup>

Durante la terapia endodóntica, el irrigante puede ser extruido a través del foramen apical debido al aumento de la presión positiva cuando la aguja no alcanza la longitud de trabajo, por lo que queda atascada en el canal y no existe reflujo hacia la cámara pulpar. Suele ocurrir en dientes con longitudes radiculares largas y con algún grado de reabsorción apical relacionada con enfermedades que afectan el periápice. Los síntomas más comunes en este accidente son edema, dolor, equimosis, hemorragias, enfisema y reacciones alérgicas. En algunas ocasiones, puede comprometer la vida del paciente dependiendo de la ubicación del diente, relación con estructuras anatómicas, espacios aponeuróticos vecinos (especialmente sublingual y submental), que comprometen la vía aérea.<sup>27</sup>

#### **2.4.1.2 Clorhexidina**

En la odontología es el antiséptico de elección para el control de placa por ser un agente de amplio espectro con pocos efectos secundarios como también es muy usado en restauraciones con el fin de eliminar la formación de bacterias provocando caries secundaria, para la irrigación y desinfección de los conductos radiculares. La clorhexidina puede ayudar en muchas otras situaciones y áreas de la salud como agente antiséptico.<sup>28</sup>

Químicamente pertenece a las biguanidas, las cuales presentan un amplio espectro antimicrobiano, es decir que tiene acción antibacterial, antiviral y antifúngica.<sup>29</sup>

Su amplio espectro incluye varios tipos de bacterias: Gram positivas, Gram negativas, anaerobias y aerobias, en menor proporción contra hongos y levaduras. Tiene efecto bacteriostático cuando se encuentra en bajas concentraciones debido a que solo llega a adherirse a la membrana celular bacteriana y tiene efecto bactericida en altas concentraciones debido a que es capaz de ingresar a la célula destruyendo la membrana y provocando la precipitación del citoplasma, causando así la muerte celular.<sup>30</sup>

También tiene efecto antiplaca, impidiendo la formación de biofilm dental o destruyendo la placa ya formada. Una de las más importantes características es la sustantividad, la cual provoca la unión a superficies de la cavidad oral y posteriormente actúa como una reserva de liberación lenta pudiendo tener actividad antimicrobiana luego de la absorción.<sup>31</sup>

Los efectos secundarios más comunes de la clorhexidina incluyen cambios en la percepción del sabor, manchas en los dientes y la lengua, y, en algunos casos, irritación en la



boca. Aunque los efectos secundarios graves son poco frecuentes, pueden incluir reacciones alérgicas como erupciones cutáneas, urticaria, hinchazón y dificultad para respirar.<sup>32</sup>

#### **2.4.1.3 EDTA®**

El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA®) se sintetiza principalmente a partir de 1, 2-diaminoetano (etilendiamina), formaldehído, agua y cianuro de sodio. Es una solución acuosa que se utiliza en endodoncia para limpiar y preparar los conductos radiculares. Tiene diversos usos como lo es, eliminar el smear layer o barrillo dentinario, que es una capa de residuos que se forma durante la instrumentación del conducto, como irrigante de los conductos radiculares donde remueve residuos dentinarios y aumenta el diámetro de los túbulos dentinales, facilitando la acción de medicamentos intraconducto.<sup>33</sup>

Así mismo el EDTA es un agente quelante que se combina con el ion calcio y lo inactiva, por lo que ejerce un efecto descalcificador sobre la dentina también puede erosionar la superficie dentinaria, lo que dificulta la adaptación del material de obturación a las paredes del conducto pudiendo alterar la morfología de las paredes del conducto.<sup>34</sup>

### **2.5 Materiales de obturación en endodoncia**

En la actualidad el éxito del tratamiento del conducto radicular se basa en principios amplios. Entre ellos se incluyen la planeación del diagnóstico, tratamiento, conocimiento de la anatómico y la morfológico radicular, así mismo, los conceptos tradicionales de debridación, desinfección y obturación del conducto radicular.<sup>35</sup>

Por lo tanto, la obturación es un reflejo de la limpieza y conformación y es evaluada de acuerdo a la longitud, conicidad, densidad, nivel de la obturación de la gutapercha y el sellado coronario, esto es, ya sea provisional o la restauración definitiva. La obturación del espacio radicular es necesaria para minimizar la filtración coronal desde el ambiente intra oral. La obturación reduce la filtración y contaminación bacteriana, sella el ápice respecto a los fluidos tisulares periapicales y sepulta los irritantes remanentes en el conducto.<sup>36</sup>

La obturación tridimensional del conducto radicular es esencial para el resultado de curación a largo plazo. El conducto radicular debe estar sellado apical, coronal y lateralmente. Varios

métodos se han recomendado para la obturación. Desafortunadamente, todos los materiales y técnicas sufren de un cierto nivel de filtración.<sup>37</sup>

### **2.5.1 Gutapercha**

Gutapercha (del malayo getah = caucho y pertja = árbol) es un tipo de goma parecida al caucho, translúcida, sólida y flexible, fabricada a base del látex proveniente de árboles del género *Palaquium*, originario del Archipiélago Malayo conformado por las islas de Malasia, Indonesia, Borneo, Timor, Java y Papúa, y se ha utilizado en odontología desde el siglo XIX.<sup>38</sup>

Los conos de gutapercha son termoplásticos y son usados como material de relleno de los conductos radiculares han mostrado estar compuestos de:

- Gutapercha (18.9 a 21.8 %).
- Óxido de zinc (56.1 a 75.3 %) = proporciona rigidez.
- Sulfatos de metales pesados como bario (1.5 a 17.3 %) = radiopacadores.
- Ceras y resinas (1 a 4.1 %) = plastificantes.<sup>39</sup>

Los dientes con indicación para obturación con este material son aquellos que requieran un perno para el refuerzo de la restauración, dientes anteriores que requieren blanqueamiento o en casos de apicectomía. Siempre que se trabaje con paredes irregulares o configuraciones no circulares (ovalada, en forma de riñón, en "moño") ya sea debido a la anatomía del conducto o como resultado de la preparación. Cuando se prevé la presencia de un conducto lateral o accesorio, cuando se determina la presencia de forámenes apicales múltiples o en casos de resorción interna.<sup>40</sup>

## **2.6 Resistencia bacteriana y reinfección después del tratamiento de conductos**

La resistencia bacteriana a los antibióticos es la capacidad de las bacterias de sobrevivir a los efectos de los antibióticos. Esto puede ocurrir en el tratamiento de endodoncia, lo que puede complicar el tratamiento y aumentar el riesgo de infección. Dentro de las causas de la resistencia bacteriana son el uso excesivo de antibióticos, la exposición a los antibióticos, la unión entre bacterias para compartir material genético. Algunos de los mecanismos de

resistencia bacteriana son expresión de genes que resisten a los antibióticos, eliminación de los antibióticos por la membrana celular, reducción de la absorción de los antibióticos, inactivación o degradación de los antibióticos por enzimas.<sup>41</sup> Aunque se ha documentado que *Enterococcus faecalis* puede soportar el alto pH, se sabe relativamente poco acerca de los mecanismos de supervivencia que le permiten tolerar esta exposición.<sup>42</sup>

La capacidad para sobrevivir en condiciones adversas es importante para la mayoría de las bacterias, debido a los largos periodos de inanición que comúnmente experimentan. Varios sistemas de regulación desempeñan papeles esenciales en la capacidad de las bacterias para soportar el agotamiento de nutrientes. Estos sistemas están bajo el control de determinados genes, cuya transcripción se activa bajo condiciones de inanición.<sup>43</sup>

En general, cuando las bacterias se enfrentan a un agente adverso o potencialmente letal, se activa una respuesta de estrés que les permite soportar la amenaza, sobrevivir y recuperarse. Cuando se induce esta respuesta, dicho estado puede conferir una protección general contra una variedad de otros factores de estrés; por ejemplo, una respuesta de estrés inducida por falta de nutrientes puede proporcionar protección contra la exposición al calor. *Enterococcus faecalis* es capaz de sintetizar una amplia variedad de proteínas cuando se expone a condiciones ambientales adversas, como son un ambiente con un pH alto o la exposición a hipoclorito de sodio (irrigante utilizado en endodoncia). Si la falta de nutrientes, la exposición a solución de hipoclorito de sodio o al hidróxido de calcio inducen a *Enterococcus faecalis* a generar una respuesta de estrés, entonces esta puede conferir protección cruzada para ésta bacteria cuando se ve expuesta posteriormente, por ejemplo, a una nueva medicación con hidróxido de calcio, 20 mecanismo que podría explicar en parte su resistencia.<sup>44</sup>

Estudios han demostrado que a un pH 11,5 o mayor, *Enterococcus faecalis* no puede sobrevivir; sin embargo, sí puede hacerlo a concentraciones menores.<sup>45</sup> Debido al efecto buffer de la dentina, es poco probable que el pH alto del hidróxido de calcio alcance los túbulos dentinarios, donde *Enterococcus faecalis* tiene la capacidad de penetrar profundamente. Aunque el pH de las pastas de hidróxido de calcio utilizado en endodoncia generalmente es 12,3 en la dentina radicular, la alcalinidad alcanzada no excede al pH 10,3 después de cubrirse los canales con hidróxido de calcio; este valor puede caer incluso a pH 8,5- 9,0 dentro del sistema de canales radiculares debido al efecto de tamponamiento de la

dentina, valor que no es lo suficientemente alto como para erradicar a *Enterococcus faecalis*. Por otra parte, dado que el tratamiento endodóntico en general incluye el uso alternado de medicamentos en diversas etapas de la instrumentación radicular, *Enterococcus faecalis* se expone frecuentemente a un pH alcalino "subletal", lo que podría hacer que las células bacterianas generen una respuesta de estrés que mejore su supervivencia. Así, la exposición repetida de *Enterococcus faecalis* a la solución de hipoclorito de sodio e hidróxido de calcio podrían inducir mecanismos de resistencia frente a la exposición subsiguiente, incluso a niveles que podrían ser letales.<sup>45</sup> Además de la respuesta adaptativa en un pH alcalino y la síntesis de proteínas inducida por el estrés, también se ha descrito la existencia en estas bacterias de una bomba de protones con la capacidad de acidificar el citoplasma, mecanismo que sería clave para la supervivencia de *Enterococcus faecalis* a pH alto, siendo incluso más importante que los mecanismos adaptativos señalados anteriormente. El mecanismo de funcionamiento de esta bomba de protones consiste básicamente en una respuesta de la bacteria a la penetración de iones hidroxilo al citoplasma bacteriano, los cuales elevarían el pH intracelular. Ante esto, la bomba de protones se activa y responde enviando iones potasio (cargados positivamente) hacia el citoplasma bacteriano, logrando así su acidificación e impidiendo la ocurrencia de la inhibición enzimática.<sup>45</sup>

Dependiendo de la disponibilidad de nutrientes en el sistema de canales y la capacidad para sobrevivir en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes, los microorganismos que permanezcan al interior de los canales radiculares pueden morir o seguir siendo viables. En caso de mantenerse viables, su proliferación puede ser impedida o reducida. Pese a los mecanismos de resistencia señalados con anterioridad, el fracaso del tratamiento endodóntico atribuido a microorganismos residuales sólo se producirá si éstos poseen patogenicidad, alcanzado un número suficiente y tienen acceso a los tejidos periapicales para inducir o mantener la enfermedad perirradicular. Por otra parte, la variación de la resistencia al pH alcalino puede estar relacionada con la existencia de genotipos variables entre cepas de *Enterococcus faecalis*, es decir, pueden ocurrir variaciones genéticas de las cepas de *Enterococcus faecalis* en el tiempo, que generen fenotipos de mayor resistencia al pH alcalino.<sup>46</sup>

## **2.7 Efecto antibacteriano de las plantas contra bacterias bucales**

Las plantas pueden tener un efecto antibacteriano en las bacterias orales, ya que contienen metabolitos secundarios que pueden inhibir el crecimiento de los microorganismos. Los productos naturales derivados de las plantas medicinales han demostrado ser una fuente abundante de compuestos biológicamente activos, muchos de los cuales han sido la base para el desarrollo de nuevos productos químicos líderes para productos farmacéuticos. Con respecto a las enfermedades causadas por microorganismos, la creciente resistencia de muchos patógenos comunes a los agentes terapéuticos utilizados actualmente, como los antibióticos y los agentes antivirales, ha renovado el interés en el descubrimiento de nuevos compuestos antiinfecciosos. Existen aproximadamente 500 000 especies de plantas en todo el mundo, de las cuales solo el 1 % ha sido investigado fitoquímicamente, existe un gran potencial para descubrir nuevos compuestos bioactivos.<sup>47</sup>

Encontramos en la literatura numerosos informes sobre el uso de plantas tradicionales y productos naturales para el tratamiento de enfermedades bucales. Muchos medicamentos derivados de plantas utilizados en sistemas medicinales tradicionales se han registrado en farmacopeas como agentes utilizados para tratar infecciones y varios de ellos se han investigado recientemente por su eficacia contra patógenos microbianos bucales. Las actividades antimicrobianas generales de plantas medicinales y productos vegetales, como aceites esenciales, se han revisado previamente. El propósito de esta revisión es presentar algunos ejemplos recientes de la literatura de estudios que han servido para validar el uso tradicional de plantas medicinales con actividad biológica específica. En particular, los extractos de plantas medicinales tradicionales o fotoquímicos que han demostrado inhibir el crecimiento de patógenos bucales, reducir el desarrollo de placa dental, influir en la adhesión de bacterias a superficies y reducir los síntomas de enfermedades bucales.<sup>48</sup>

### **2.7.1 Mecanismos de acción de metabolitos secundarios de plantas**

El reino vegetal produce cientos de miles de compuestos orgánicos de bajo peso molecular. Con base en las funciones asumidas de estos compuestos, la comunidad científica los ha clasificado en tres grupos generales: metabolitos primarios, que son directamente necesarios para el crecimiento de las plantas; metabolitos secundarios (o especializados), que median las interacciones planta-ambiente; y hormonas, que regulan los procesos y el metabolismo de

los organismos. Se han realizado numerosos estudios *in vitro* que han investigado la actividad de sustancias vegetales naturales contra las bacterias bucales. Estos estudios se han centrado en bacterias que se sabe que están implicadas en la etiología de las enfermedades bucales y dentales. Los primeros estudios han establecido claramente que varias sustancias tenían potencial para ser utilizadas en la industria dental, dada su actividad contra las bacterias cariogénicas.<sup>49</sup>

#### **2.7.1.1. Flavonoides y otros polifenoles**

Los flavonoides son compuestos polifenólicos de origen vegetal, conocidos por sus propiedades antioxidantes y beneficios para la salud, como la prevención de enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer. Los flavonoides son una clase importante de metabolitos secundarios ampliamente presentes en las plantas, que contribuyen a su crecimiento y desarrollo y tienen aplicaciones destacadas en la alimentación y la medicina. Su biosíntesis ha sido objeto de intensa investigación en biología vegetal durante mucho tiempo. Los flavonoides se derivan de la vía metabólica de los fenilpropanoides y su estructura básica consiste en un anillo bencénico C<sub>15</sub> de C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. En las últimas décadas, se han realizado numerosos estudios para dilucidar los mecanismos implicados en la biosíntesis de flavonoides en plantas.<sup>50</sup>

Los flavonoides son metabolitos secundarios, compuestos polifenólicos que se encuentran naturalmente en las plantas. Son compuestos de bajo peso molecular algunos de ellos son flavonoles, antocianinas, isoflavonoides, flavonas y flavononas son responsables de los intensos colores de frutas y verduras, destacan por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y capacidad para contribuir a la salud humana.<sup>51</sup>

#### **2.7.1.2 Terpenos**

Los terpenos son compuestos orgánicos aromáticos y volátiles, responsables del aroma y sabor característico de muchas plantas, los terpenos y aceites esenciales son materiales de gran uso comercial debido a su amplio espectro de propiedades biológicas antibacterianas, antifúngicas, de mejora de la permeación de membranas y antioxidantes, así como por su uso como sabores y fragancias. Se encuentran en una amplia variedad de plantas, incluyendo el

cannabis, y son los responsables de su aroma y sabor característico. Son hidrocarburos naturales que se forman a partir de unidades de isopreno.<sup>52</sup>

### **2.7.1.3 Alcaloides**

Los alcaloides son metabolitos secundarios de plantas, generalmente sintetizados a partir de aminoácidos, que comparten la propiedad de ser hidrosolubles en pH ácido y solubles en solventes orgánicos en pH alcalino. Los alcaloides son compuestos orgánicos nitrogenados que se encuentran principalmente en plantas, aunque también se pueden encontrar en animales y hongos. Los fitoquímicos pertenecientes al grupo de los alcaloides son metabolitos especializados característicos, dotados de innumerables actividades biológicas. Las plantas están protegidas con estos compuestos nitrogenados producidos naturalmente para combatir numerosas condiciones de estrés ambiental adversas. Los sistemas de salud tradicionales y modernos han aprovechado el potencial de estos compuestos orgánicos para el tratamiento de numerosas enfermedades. Diversas entidades químicas (grupos funcionales) unidas a la molécula central son responsables de su diversa gama de propiedades biológicas. El desarrollo de la caracterización de estos metabolitos vegetales y las enzimas involucradas en su biosíntesis es de suma importancia para ofrecer mayores ventajas en términos de propiedades biológicas y productividad.<sup>53</sup>

## **2.8 Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*)**

El nombre científico de la flor de jamaica es *Hibiscus sabdariffa* y pertenece a la familia de las malváceas, es mejor conocida como rosa de Jamaica o rosa Abisinia es un arbusto que puede crecer hasta tres metros de altura, su flor es Cardoza roja y tiene siete pétalos. La planta es anual se desarrolla mejor en regiones con clima tropical y subtropical, su cultivo se realiza en la época primavera-verano y se cosecha de octubre a noviembre; aunque puede crecer en climas áridos.<sup>54</sup>

La flor es una de las partes más importantes de la planta, debido a que es la más utilizada por los consumidores para cuestiones culinarias, cosméticas, florales y medicinales.<sup>55</sup>

Este último aspecto es el que ha tenido mayor relevancia como parte de la medicina tradicional por los efectos diuréticos, coleréticos, analgésicos, antitusivos e hipotensores.<sup>56</sup>

El *Hibiscus sabdariffa* tiene propiedades antimicrobianas. Esto se debe a que contiene fitoquímicos que inhiben el crecimiento de bacterias. Los estudios han demostrado que el extracto de *Hibiscus sabdariffa* tiene un efecto antibacteriano contra: *Streptococcus mutans*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Bacillus anthracis*.<sup>57</sup>

### **2.8.1 Toxicología de *H. Sabdariffa***

Se ha reportado que la dosis letal (LD 50) del extracto acuoso de cálices *H. Sabdariffa* en ratas es alrededor de 5000 mg/kg, sugiriendo que el extracto no es tóxico.<sup>58</sup>

La dosis de hasta 200 mg/kg debe ser seguras y no mostrar signos de toxicidad.<sup>59</sup>

### **2.8.2 Efecto antimicrobiano *in vitro* de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*)**

Se ha demostrado que extractos de *H. sabdariffa* tienen un amplio rango de actividad antimicrobiana contra bacterias. Por ejemplo, los extractos metanólico de cálices de *H. sabdariffa* han presentado actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *Bacillus stearothermophilus*, *M. luteus*, *S. marcescens*, *C. sporogenes*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. cereus*, y *Pseudomonas sp.* a concentraciones de  $0.30 \pm 0.2$  a  $1.30 \pm 0.2$  mg/mL.<sup>60</sup> Alternamente se encontraron que las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) de extracto acuoso de cáliz de *H. sabdariffa* fueron de 0,5 y 1,0 mg/mL para *S. aureus* ATCC 6358 y *E. coli* ATCC 8937, respectivamente. También se ha demostrado la actividad antimicrobiana de extractos metanólicos, etanólico, acuoso y de acetato de etilo de *H. sabdariffa* en medios de cultivo, utilizando 5 antibióticos como estándares (gentamicina, tetraciclina, ampicilina, penicilina y cefalosporina). Se observó que el extracto más efectivo fue el acuoso mostrando un halo e inhibición de 30 mm para *E. coli* (ATCC 25922), incluso claramente mayor a los mostrados por los antibióticos estándar.<sup>62</sup> Otro estudio realizado, mostró el efecto antimicrobiano de extracto metanólico de hojas de la planta de jamaica (*H. sabdariffa*). Indriani L. y colaboradores han obtenido como resultados una alta actividad antimicrobiana contra *S. aureus* (26 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (22 mm), *Klebsiella*



*pneumoniae* (22 mm), *Bacillus subtilis* (21 mm), *Escherichia coli* (20 mm), *Proteus vulgaris* (19 mm), *Candida albicans* (24 mm) y *Aspergillus niger* (17 mm).<sup>63</sup> Según los autores, a actividad antimicrobiana del extracto metanólico de hojas de *H. sabdariffa* podría deberse a la presencia de compuestos fenólicos como los flavonoides. En otro estudio, *S. aureus* fue el microorganismo más sensible al extracto metanólico de *H. sabdariffa*. Por lo tanto, las bacterias Gram positivas fueron más sensibles que las Gram negativas. Se sabe que el patrón de inhibición varía de acuerdo con la parte de la planta, el disolvente utilizado y el microorganismo.<sup>64</sup> Estos autores mencionan que la actividad antibacteriana del extracto puede ser atribuido a los compuestos fitoquímicos que contiene especialmente los de naturaleza fenólicos tales como ácido gálico, quercetina, rutina y luteolina y análogos, los cuales han sido previamente reportados en literatura. El extracto acuoso de *H. sabdariffa* mostró capacidad de inhibición igual contra *E. coli* y *S. aureus* (40 mm), el extracto etanólico exhibió mayor capacidad de inhibición contra a *E. coli* (47 mm) que contra *S. aureus* (20 mm).<sup>64</sup> Kristen L y colaboradores demostraron que la actividad antimicrobiana de extractos de *H. sabdariffa*, contra diferentes cepas de *E. coli* O157:H7 aisladas de 3 fuentes: clínica, alimenticia y veterinaria. El halo de inhibición más bajo que se presentó fue de 7.00 mm contra *E. coli* O157:H7 aislada de fuente clínica, mientras que el halo de inhibición más alto fue de 15,37 mm contra el microorganismo aislado a partir de una fuente de alimento. Los extractos metanólicos de *H. sabdariffa* inhiben cepas multirresistentes a antibióticos de *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Providencia stuartii*. Dicha actividad se atribuye a la variedad de compuestos encontrados en el extracto tales como alcaloides, flavonoides, fenoles, polifenoles, saponinas, esteroides y triterpenos, atribuyendo la actividad antimicrobiana a los alcaloides principalmente por su capacidad de interferir con la división celular. En la mayoría de los artículos en los que se reporta el efecto antimicrobiano in vitro de *H. sabdariffa* no se reporta cuales son exactamente los compuestos responsables del efecto antimicrobiano observado, sólo se supone o se plantean hipótesis de los posibles compuestos con actividad antimicrobiana.<sup>65</sup>

## 2.2 Antecedentes del problema

La resistencia bacteriana representa un problema de salud pública. Tanto es así que, la Organización Mundial de la Salud, considera la salud pública una prioridad en materia de salud, debido a su impacto tanto en la salud (ya que proyecciones recientes indican que para 2050 se producirán más muertes por esta causa que las ocasionadas por cáncer) como en su impacto económico (que, según un estudio reciente en el Reino Unido, costará a la economía mundial un estimado de 100 billones de dólares). La rápida aparición de bacterias multirresistentes y panresistentes a los antibióticos y antimicrobianos es un fenómeno mundial que pone en duda la eficacia de estos. Implementar protocolos y recomendaciones es esencial, así como concienciar al personal sanitario, basándose en el conocimiento de la generación de resistencias y su impacto a lo largo de los años.<sup>66</sup> Este trabajo abarca dos áreas, una en la que se pretende conocer los estudios más recientes en desinfección con extractos de cálicves de *H. sabdariffa* sobre bacterias orales, como se muestra en la tabla, 7 así como el uso de extractos naturales en la desinfección de puntas de gutapercha como se muestra en la tabla 8.

**Tabla 7. Estudios del efecto antibacteriano de los extractos de *H. sabdariffa***

Año/Autor	Tipo de estudio	Resultado
Baena-Santillán ES, <i>et al.</i> , 2022	Experimental <i>in vitro</i>	Los extractos con acetato de etilo, acetona y ácido hibiscus presentaron mayor efecto antimicrobiano que los enjuagues comerciales. <i>S. mutans</i> <i>S. aureus</i> <i>S. sanguini</i> <i>C. gingivalis</i> <sup>67</sup>
Padilla L, <i>et al.</i> , 2022	Experimental	<i>Streptococcus mutans</i> es sensible al 25 % (9.72mm), 50 % (10.76 mm), 75 % (13.59mm) y 100 % (14.23 mm). <sup>68</sup>

Unita L, <i>et al.</i> , 2018	Experimental	Hubo una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre la cantidad de colonias de <i>Streptococcus sp.</i> a partir de concentraciones del 40 %, 20 %, 10% . <sup>69</sup>
Sulistyani H, <i>et al.</i> , 2016	Experimental <i>in vitro</i>	La actividad antibacteriana más significativa se observó contra <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Prevotella intermedia</i> y <i>Porphyromonas gingivalis</i> CMI y CMB 7.2 mg/mL - 28.8 mg/mL y 14.4 a >57,6 mg/mL. <sup>70</sup>
Abdallah EM, <i>et al.</i> , 2016	Experimental <i>in vitro</i>	La mayor actividad antibacteriana de <i>H. sabdariffa</i> cálices fue registrado por <i>S. aureus</i> ( $18.5 \pm 0.5$ mm), seguido por <i>P. aeruginosa</i> ( $1.5 \pm 0.5$ mm), <i>E. coli</i> ( $14.5 \pm 0.5$ mm), <i>P. vulgaris</i> ( $14.5 \pm 0.5$ mm), y <i>B. cereus</i> ( $13.5 \pm 1.5$ mm), respectivamente. <sup>71</sup>

**Tabla 8. Antecedentes de desinfección de puntas de gutapercha**

Año/autor	Tipo de estudio	Resultados
Carvalho CS, Pinto MS, Batista SF, <i>et al.</i> , 2020	Experimental <i>in vitro</i> .	La concentración de 1 % y el 2,5 % de NaClO y el 2 % de CHX fueron eficaces para descontaminar los conos durante 30 segundos o 1 minuto para <i>Enterococcus faecalis</i> . <sup>72</sup>

---

Jagyasi DR, Chandwani ND, Gunwal MK, <i>et al.</i> , 2021.	Experimental <i>in vitro</i> .	La clorhexidina al 2 % mostró máxima acción antibacteriana contra <i>E. faecalis</i> y <i>S. aureus</i> , seguida del extracto de babul. También demostró mayor eficacia en la descontaminación de conos de gutapercha, seguida del babul y el hipoclorito de sodio al 3 % en 5 minutos. Eficacia antimicrobiana; <i>C. albicans</i> ; <i>E. faecalis</i> ; <i>S. aureus</i> . <sup>73</sup>
Vanapatla A, Nanda N, Satyarth S, <i>et al.</i> , 2022.	Experimental <i>in vitro</i> .	El hipoclorito de sodio (NaOCL), como grupo control, presentó un promedio de 5 UFC. La cúrcuma presentó el promedio más bajo, 55 UFC, y fue la más eficaz de los grupos experimentales. El neem y el calotropis presentaron los promedios más altos, 130 UFC y 200 UFC, respectivamente, lo que las convierte en las soluciones menos eficaces de las analizadas para <i>Enterococcus faecalis</i> . <sup>74</sup>
Jain A, Lavania A, Sharma N, <i>et al.</i> , 2024	Experimental <i>in vitro</i> .	El orden de acción antimicrobiana entre los diferentes desinfectantes experimentales contra <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Enterococcus faecalis</i> en la desinfección de conos GP fue el siguiente: Pancha Tulsi mayor a fibras de curcumina mayor a jugo de Amla mayor a aloe vera. <sup>75</sup>
Pauletto G, Guerim PHF, Barbosa AB, <i>et al.</i> , 2024	Experimental <i>in vitro</i> .	Comprobar la eficacia del hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2,5 %, el hipoclorito de calcio [Ca (OCl) <sub>2</sub> ] al 2,5 % y la clorhexidina (CHX) al 2 %. Los resultados demuestran que todas las soluciones probadas fueron efectivas en la descontaminación rápida de conos contaminados con <i>C. albicans</i> . <sup>76</sup>

---

\*UFC (Unidades Formadoras de Colonias)

### 3. Planteamiento del problema

La caries es uno de los problemas más comunes en nuestro país y aunque registran bajo impacto en la mortalidad, el informe sobre la situación mundial de la salud bucodental 2020 publicado por la Organización Mundial de la salud (OMS) muestra que 45 por ciento de la población; es decir, 3.5 millones de personas, padeció este tipo de afección; tres de cada cuatro personas vivían en países de ingreso bajo y medio y la caries de los dientes permanentes fue la más prevalente de todas las condiciones evaluadas.<sup>77</sup>

Según el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SIVEPAB) en el 2018 reporta que, aproximadamente personas adultas de 18 años pierden 0.1 piezas dentales por caries, asimismo, adultos entre 35 y 40 años pierden 2.1 piezas dentales y de los 65 a 74 años pierden alrededor de 9.4 piezas dentales.<sup>78</sup>

La caries, las infecciones pulpares y periapicales son las causas principales de pérdida dental, el tratamiento endodóntico es lo que se utiliza para rehabilitar algunos de estos dientes. Sin embargo, nos encontramos con algunas dificultades a la hora de realizar este tipo de tratamientos el primero son altos costos en la rehabilitación de estos dientes; haciendo estos tratamientos poco accesibles a la población, motivo por el cual los pacientes optan por extraer estas piezas dentarias. Lo que produce en el paciente una disfunción en la masticación, fonación, oclusión y estética. Otra dificultad a la que se enfrentan los clínicos, es la existencia de bacterias de patógenas como *Enterococcus Faecalis* que resisten al tratamiento y causa reinfección al diente. Asimismo, una de las alternativas para la desinfección de conductos radiculares, es el uso del Hipoclorito de Sodio, el cual posee una alta alcalinidad, así como efectos adversos como ser irritante y puede causar ulceraciones en piel, mucosas y córneas. Las características del hipoclorito de sodio confieren un potencial generador de necrosis hística, que en ciertos pacientes, mediante contacto directo o vapores, provoca reacciones alérgicas e incluso anafilácticas.<sup>79</sup>

Por todo lo anterior, la ciencia se encuentra en búsqueda de nuevas alternativas para la irrigación y desinfección intraconducto, algunas de las cuales se han estancado por no

encontrar alternativas que cumplan las características para un buen irrigante (solvente de tejidos o residuos, baja toxicidad, baja tensión superficial, lubricante, eliminación de capa superficial o capa residual (barro dentinario), disponibilidad, costo moderado, fácil utilización, buen tiempo de vida útil, no colorear superficies dentarias, soluble en agua, no interferir con los materiales de obturación, adecuado periodo de almacenamiento, fácil guardado, no sufra neutralización dentro del conducto). El poco conocimiento de nuevas alternativas ha llevado al profesional de la salud a seguir utilizando las mismas sustancias por años.<sup>80</sup>

Esta investigación se pretende aportar mediante un estudio *in vitro* el efecto antimicrobiano de los extractos de Jamaica como alternativa para la desinfección de puntas de gutapercha en comparación con los principales irrigantes que se utilizan actualmente en endodoncia y como alternativa bacteriostática/ bactericida en microorganismos de infecciones secundarias después del tratamiento endodóntico frente a bacterias de resistencia como *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus sanguinis*.<sup>81</sup>

La ciencia se encuentra en búsqueda de nuevas sustancias que produzcan resultados favorables, a costos asequibles y que sean una alternativa para pacientes sensibles a los componentes de los productos utilizados para alcanzar los niveles de desinfección, asimismo, sean equiparables a las soluciones químicas utilizadas, para así poder garantizar el éxito en los tratamientos de endodoncia para prevenir reinfecciones en las piezas dentales, así como asegurar la correcta desinfección de materiales de obturación como la gutapercha cuyos índices de contaminación aumentan el riesgo de estos eventos. En este sentido, se busca mejorar los protocolos de desinfección con productos de origen natural que mejoren las praxis de los endodoncistas y presenten menos efectos adversos los pacientes. Así los profesionales de la salud se verán beneficiados teniendo mejores protocolos de limpieza y desinfección de los materiales utilizados durante el tratamiento de endodoncia.<sup>82</sup>

### III. JUSTIFICACIÓN

La disbiosis en el microbioma oral genera enfermedades como la caries, enfermedad periodontal o pulpar, las cuales, que tiene un alta prevalencia en las poblaciones y son las principales causas de pérdida dental. Las enfermedades pulpares y periapicales involucran la descontaminación de los canales radiculares a través de distintas técnicas odontológicas. Dentro de estas técnicas está el uso de irrigantes intraconducto, las cuales corresponden a soluciones antimicrobianas comúnmente de origen químico- sintético cuyo objetivo es complementar la desinfección del conducto radicular impidiendo la permanencia y proliferación de organismos para así evitar el fracaso del tratamiento. Si bien, las soluciones que se utilizan actualmente producen muchos beneficios al tratamiento endodóntico, algunas de ellas presentan ciertas desventajas como citotoxicidad, alto costo y poca actividad frente a microorganismos de alta prevalencia en infecciones endodónticas donde predominan especies Gram positivas, anaerobias facultativas, entre las que destacan *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium* y *Enterococcus faecalis* así mismo se encuentran otras como *Streptococcus sanguinis* que no es propia del conducto se encuentra también en la placa dento bacteriana.<sup>83</sup>

Es importante considerar que existen productos naturales que presentan actividades antimicrobianas similares o superiores a soluciones ya utilizadas, esto puede generar nuevas propuestas en la formulación de irrigantes y desinfectantes aplicados al campo de la odontología. El posible uso de estas alternativas sería beneficioso para la salud produciendo materias primas más accesibles que disminuirían el costo de estos tratamientos. Sin embargo, tienen la limitación de que aún se necesita más investigación para aprovechar sus características y así lograr su implementación como irrigantes de uso común.<sup>84</sup>

#### IV. HIPÓTESIS

Existe efecto antimicrobiano de los extractos de cálices de *Hibiscus sabdariffa* (jamaica) en *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus sanguinis* en un modelo *in vitro* en puntas de gutapercha.



## V. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General

Evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* de los extractos de cálices de *Hibiscus Sabdariffa* en *Enterococcus Faecalis* y *Streptococcus sanguinis* en un modelo *in vitro* puntas de gutapercha.

### 5.2 Objetivos Específicos

- 1) Obtención de los extractos acuoso, etanólico, acetónico y de acetato de etilo a base de cálices de *Hibiscus sabdariffa* variedad Tecoaapa de Guerrero.
- 2) Determinar el efecto antibacteriano mediante la técnica de difusión en placa, de los extractos cálices acuosos, etánolicos, acetónicos y de acetato de etilo de cálices de *Hibiscus sabdariffa* sobre *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus sanguinis*.
- 3) Conocer la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) utilizando técnica de macro dilución y diluciones doble seriadas para los extractos acuosos, etánolicos, acetónicos y de acetato de etilo de cálices de *Hibiscus sabdariffa* sobre *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus sanguinis*.
- 4) Determinar la curva de muerte utilizando extractos acuoso, etanólico, acetónico y acetato de etilo de cálices de *Hibiscus sabdariffa* a 30, 60, 90 y 120 minutos sobre *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus sanguinis*.
- 5) Medir la adherencia bacteriana de *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus sanguinis* sobre puntas de gutapercha y probar efecto antimicrobiano de los extractos acusoso, etánolicos, acetónicos y de acetato de etilo de cálices de *Hibiscus sabdariffa*.

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Materiales**

#### **6.1.1 Cálices de Jamaica**

Se emplearon cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) de la variedad Tecoanapa de Guerrero. Los cálices se deshidrataron en una estufa a  $40 \pm 2$  °C por 7 días, se colocaron en bolsa de plástico estéril y se almacenaron y etiquetaron hasta su uso.

#### **6.1.2 Cepas bacterianas**

Se trabajó con cepa *E. faecalis* donada por Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) aislada para el artículo comparison of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Strains isolated from water and clinical samples: antimicrobial susceptibility and genetic relationship en 2013 para este trabajo y *S. sanguinis* (ATTC 1300)

#### **6.1.3 Medios de cultivo**

Agar para Métodos estándar (Bioxon, México) Caldo de soya tripticaseína (Bioxon, México), Peptona de caseína (Bioxon, México).

#### **6.1.4 Reactivos y disolventes**

Agua destilada, acetato de etilo (J.T. Baker, USA) Acetona (J.T. Baker USA) Etanol (J.T. Baker, USA) Tween 80 (Sigma, México)

#### **6.1.5 Irrigantes y desinfectantes**

Hipoclorito de sodio (Cloralex®, México), EDTA® 17% zeyco ®, Glucanato de clorhexidina solución al 2 % zeyco®

#### **6.1.6 Puntas de gutapercha**

Marca Meta Biomedic® tamaño M

#### **6.1.7 Equipo**

Autoclave eléctrica (Yamato, SM 200, Japón) agitador vortex (scientific, industries, USA), balanza analítica (OHAUS, USA), bomba de vacío (BÜCHI, Vacuum Pump V- 700, Suiza), incubadora bacteriológica (LAB. Line, Ambi Hi Low Chamber, USA), campana de flujo laminar (LANCONCO, USA), cuenta colonias (AMERICAN Optical Quebec, USA), parilla eléctrica (Cimerec, USA), refrigerador (Vendo, México) evaporador rotatorio (BÜCHI, Rotavapor R- 215, Suiza).

## **6.2 Métodos**

### **6.2.1 Obtención de extractos de cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*)**

Acuoso: Las muestras secas (100 g) se pesaron y se colocaron asépticamente en matraces estériles. Se añadió agua destilada (1200 mL) se calentaron a ebullición durante 10 minutos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Después, la fase líquida se filtró con papel filtro Whatman No. 4. El filtrado se sometió a secado y evaporación en estufa con recirculación de aire (LAB Line, AMBI Hi Low Chamber, USA) durante 24 horas a  $50 \pm 2$  °C para eliminar por completo el agua. Los extractos obtenidos (considerándolo como extracto concentrado) se colocaron en un frasco transparente limpio, el cual se refrigeró hasta su uso.<sup>78</sup>

Para los extractos obtenidos con etanol, acetona y acetato de etilo, porciones de 100 gramos de cálices de jamaica se colocaron en frascos de vidrio y se agregó a cada frasco 900 mL de etanol al 96 %, acetona o acetato de etilo.<sup>85</sup>

Los matraces se almacenaron a temperatura ambiente durante siete días con agitación manual (una vez al día). Después de este periodo de extracción, la fase líquida, se colocó en un embudo Büchner al cual se le colocó papel filtro Whatman No. 4. Los extractos filtrados se concentraron en un rotaevaporador (Büchi R- 215). Los disolventes se eliminaron por completo de los concentrados en una estufa con recirculación de aire (Lab- Line, Ambi Hi Low Chamber, USA) durante 24 horas a  $50 \pm 2$  °C. Los extractos obtenidos se colocaron en un frasco transparente limpio y se refrigeró hasta su uso.<sup>86</sup>

### **6.2.2 Efecto antimicrobiano *in vitro* de los extractos**

#### **6.2.2.1 Preparación de las cepas bacterianas**

Cada una de las cepas se inoculó en tubos con 3 mL de Caldo de Soya Tripticaseina (TSB, Bioxon, Becton Dickinson, México) y se incubó a  $35 \pm 2$  °C durante 24 horas. Posteriormente se realizaron diluciones decimales de los cultivos para producir una concentración final de  $10^7$  UFC /mL.<sup>87</sup>

#### **6.2.2.2 Preparación de los extractos**

Se prepararon soluciones al 10 % de cada extracto de cálices de *H. sabdariffa* (etanólico, acuoso, acetónico y de acetato de etilo). Para el extracto de etanol y acuoso se utilizó agua destilada y para el extracto acetónico y acetato de etilo, se empleó una solución de agua destilada con tween 80 al 20 % todos los extractos pasaron por tratamiento térmico o esterilización en autoclave.<sup>88</sup>

#### **6.2.3 Efecto antimicrobiano por técnica de difusión en agar**

Alícuotas de 100 µL fueron tomadas de la segunda dilución de cada cultivo bacteriano y se colocaron en sobre la superficie de Agar Métodos Estándar (AME) y se distribuyó en el agar por la técnica de extensión en superficie. Se colocaron discos de papel (Whatman No. 5, 6 mm de diámetro) sobre la superficie del agar inoculado. Alícuotas de 20 µL de cada extracto y los irrigantes intraconducto se colocaron en cada disco de papel (concentración fina en disco: 2 mg de extracto). Una vez que el líquido de los discos fue absorbido por agar, las placas se incubaron por 24 horas a  $35 \pm 2$  °C. La medición de las zonas de inhibición fue con ayuda de un vernier digital. Cada experimento se realizó por triplicado y se calcularon los valores promedio para cada extracto.<sup>89</sup>

#### **6.2.4 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB)**

El propósito de esta prueba fue determinar la sensibilidad de los microorganismos frente a cada compuesto con actividad antimicrobiana, para esto se utilizó el método de dilución en caldo. Este estudio, utilizó extractos de cálices *H. sabdariffa* utilizando 4 solventes (agua, etanol, acetona, acetato de etilo). Se prepararon tubos de Caldo de Soya de Trypticaseína (TSB) con diferentes concentraciones de los extractos. Se utilizó agua destilada estéril como control negativo.<sup>90</sup>

Los tubos se inocularon con una suspensión de microorganismos de  $1 \times 10^5$  UFC/mL. Todos los tubos inoculados se incubaron a  $35 \pm 2$  °C durante 24 h. La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue la última dilución del compuesto que inhibió el crecimiento bacteriano

sin observar turbidez en los tubos. Para determinar la concentración mínima bactericida (CMB), se inocularon tubos con TSB en Agar de Soya Trypticaseína (AST) usando la técnica de vertido en placa y se incubó a  $35 \pm 2$  °C durante 24-48 h. La CMB se definió como la concentración más baja de los extractos que no mostró crecimiento de colonias en AST.<sup>91</sup>

### 6.2.5 Curva de muerte

La curva de muerte o curva de letalidad es un método mediante el cual se determina la actividad *in vitro* de diferentes concentraciones de un antibiótico frente a un microorganismo durante un período de tiempo. Se trata, por tanto, de una técnica que mide la cinética de muerte bacteriana mediante el recuento de colonias que permanecen viables tras la exposición al antibiótico en relación al inóculo original. Este método se ha usado tradicionalmente para evaluar el comportamiento de nuevos antibióticos y además puede ayudar a comprender la causa del fallo de un determinado tratamiento en el que resulte crucial una actividad bactericida.<sup>92</sup>

Este método permite establecer la actividad de dos antibióticos (el análisis de la dinámica de tres antibióticos es sensiblemente más complejo, pero también es factible) en combinación. Al igual que las otras técnicas que permiten determinar sinergias *in vitro*, el método de curvas de muerte también está basado en recomendaciones metodológicas consensuadas, ya que no existen normas de estandarización para métodos que emplean combinaciones de antibióticos.<sup>93</sup>

Una vez determinadas las CMI y decididas las concentraciones a probar (múltiplos y submúltiplos de la CMI) se harán las curvas de muerte de cada extracto por separado y las de los compuestos que se haya decidido combinar. Para estas combinaciones se enfrentarán, en medio líquido, el inóculo bacteriano normalizado y las diferentes concentraciones elegidas de dos (eventualmente, tres) extractos. Se incluirá un tubo de control de crecimiento del microorganismo sin antibiótico que permitirá establecer los recuentos del inóculo frente a los cuales se harán, posteriormente, los cálculos para establecer el comportamiento de las diferentes concentraciones de la combinación a lo largo del tiempo. Las concentraciones que se estudian habitualmente corresponden a valores de 1xCMI, 2xCMI y 4xCMI. En ciertos trabajos se incluyen valores sub CMI, sin embargo, como el objetivo último de los ensayos

*in vitro* en el laboratorio de Microbiología es obtener resultados que tengan aplicación clínica, en muchos casos se eligen las concentraciones que son más probables de alcanzar en el foco de la infección. Si esto no es posible, se utiliza la concentración máxima que se alcance en el suero del paciente.<sup>94</sup>

Posteriormente, según los tiempos elegidos, se harán los recuentos de colonias, mediante diluciones del inóculo, incluyendo el tiempo inicial ( $t=0$ ) y, sucesivamente, a los 30, 60, 90, 120 minutos. En esos puntos se sembrará, en el medio sólido apropiado, una alícuota del inóculo, debidamente diluido, que permita realizar el recuento tras la incubación requerida. Las placas se incubaron durante 24 horas y posteriormente se realizó un recuento del número de unidades formadoras de colonias crecidas por mililitro (UFC/ mL) teniendo en cuenta el factor de corrección debido a las diluciones realizadas.<sup>95</sup>

#### **6.2.6 Adherencia bacteriana a las puntas de gutapercha**

En términos generales, para la adhesión bacteriana, influyen cuatro elementos: material, microorganismos, antimicrobianos y mecanismos de defensa. La influencia del material es más importante en los estadios iniciales de la adhesión, pudiendo influir el mismo material, su rugosidad o su energía superficial; si es que existe una influencia del material en la adhesión bacteriana, esta reside en las características de la película adquirida y en la especificidad de las proteínas adsorbidas salivares (receptores), que puedan ser condicionadas por la composición del material o por las características de superficie de este.<sup>96</sup> Para este experimento *in vitro* se realizó el siguiente procedimiento:

- 1.- Se activaron las cepas de *E. faecalis* y *S. sanguinis* en caldo de soya tripticaseína con un crecimiento de 24 horas.
- 2.- Se colocó el caldo en caja estéril y se expuso la punta de gutapercha durante 60 minutos.
- 3.- En una bolsa estéril con 9 mL de agua peptonada se frotó la punta de gutapercha durante 1 minuto.
- 4.- Se procedió a realizar diluciones y a sembrar por técnica de vertido en placa.
- 3.- Se incubaron las cajas a 37 °C por 24 horas y se procedió a realizar el conteo de UFC/mL.

#### **6.2.7 Desinfección de puntas de gutapercha con extractos de cálices de jamaica (*Hibiscus Sabdariffa*)**

- 1.- Se contaminó un grupo de 3 puntas de gutapercha por extracto (acuoso, etanólico, acetónico y acetato de etilo) así como de irrigantes (hipoclorito de sodio NaClO, EDTA® y clorhexidina con las cepas previamente activas durante 1 hora.
- 2.- Con pinza estéril se transportaron a cajas Petri estériles que contenían las soluciones desinfectantes y se expusieron durante 5 minutos a descontaminación.
- 3.- Se llevaron a una bolsa estéril que contenía 9 mL de agua peptonada se frotó manualmente por 1 minuto y se procedió a sembrar por técnica de vertido en placa con agar métodos estándar. Se incubaron a 37 °C por 24 horas y se procedió a contar las UFC/ mL.<sup>97</sup>

#### **6.2.7 Manejo de RPBI después de la experimentación.**

La Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente, define como residuos peligrosos a todos aquellos residuos que por sus características corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables y biológico-infecciosas, que representan un peligro para el equilibrio ecológico o el ambiente; mismos que serán manejados en términos de la propia ley, su reglamento y normas oficiales mexicanas que expida la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales previa opinión de diversas dependencias que tengan alguna injerencia en la materia, correspondiéndole a la citada Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) su regulación y control.<sup>98</sup>

En México está regulado a través de la norma oficial mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, protección ambiental - salud ambiental - residuos peligrosos biológico-infecciosos - clasificación y especificaciones de manejo.

La clasificación de estos residuos enmarca que los que utilizamos durante esta experimentación se encuentran en su clasificación. En los apartados numerados como siguen en esta norma:

4.2. Los cultivos y cepas de agentes biológico-infecciosos.

4.2.1 Los cultivos generados en los procedimientos de diagnóstico e investigación, así como los generados en la producción y control de agentes biológico-infecciosos.

4.2.2 Utensilios desechables usados para contener, transferir, inocular y mezclar cultivos de agentes biológico-infecciosos.

Se siguió el protocolo de fases de manejo para estos residuos. Para su envasado y posterior desecho como se muestra en la tabla 9:

- a) Identificación de los residuos.
- b) Envasado de los residuos generados.

**Tabla 9. Tipo de residuos estado físico, envasado y color.**

Tipo de residuo	Estado físico	Envasado	Color
Sangre	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo
Cultivos y cepas de agentes infecciosos	Patológicos Sólidos	Bolsa polietileno	Rojo
Sólidos			
Patológicos	Sólidos	Bolsa polietileno	Amarillo
Residuos no anatómicos	Sólidos/ líquidos	Bolsas de polietileno/ recipientes herméticos	Rojo
Objetos punzocortantes	Sólidos	Recipientes rígidos polipropileno	Rojo



Las bolsas se llenaron al 80 % de su capacidad, cerrándose antes de ser transportadas al sitio de almacenamiento temporal y no podrán ser abiertas o vaciadas. Estas bolsas tuvieron el siguiente manejo:

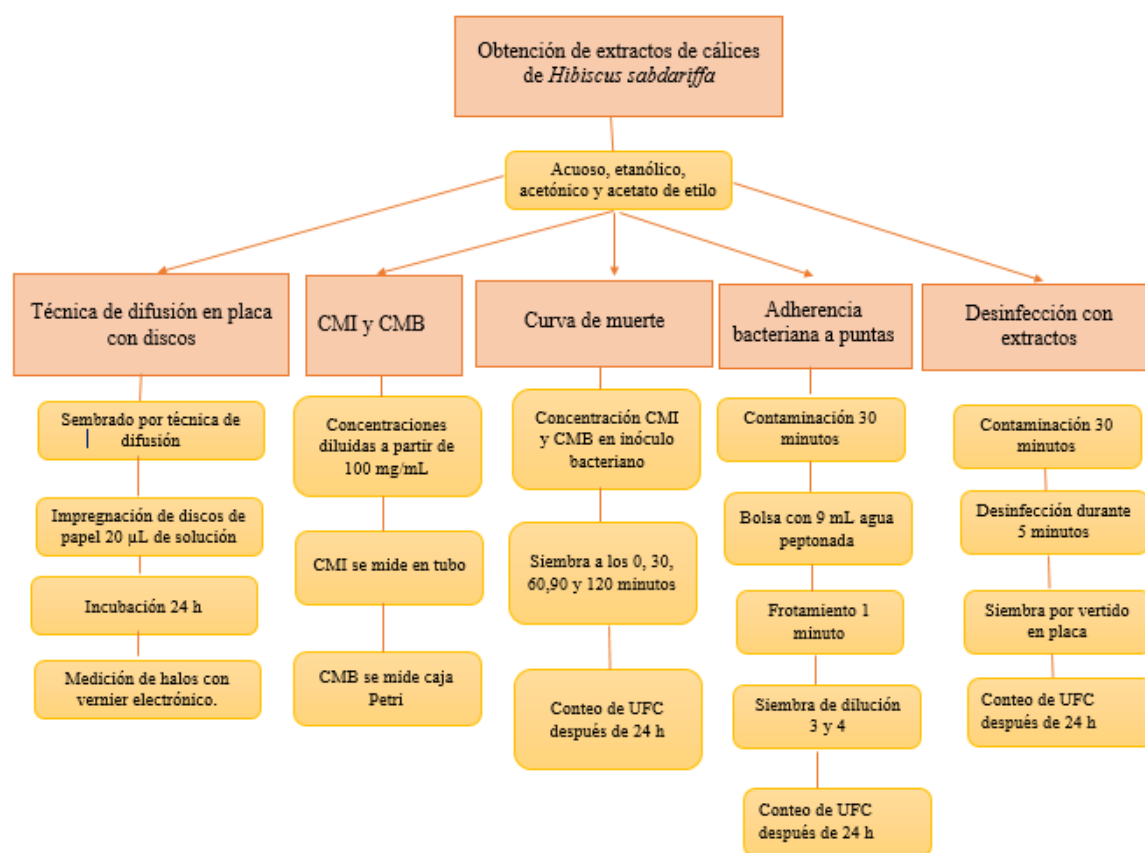
- c) Almacenamiento temporal.
- d) Recolección y transporte externo.
- e) Tratamiento.
- f) Disposición final

### **6.3 Contexto de la investigación**

Tipo y diseño de estudio: Experimental *in vitro*.

Este estudio se realizó en el Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería (ICBI) ubicado en ciudad del conocimiento Pachuca- Tulancingo km 4.5, Carboneras C.P. 42184 Pachuca de Soto, Hidalgo; en los laboratorios del Área de Química en Alimentos.

## 6.4 Diagrama de metodología general.



**Figura 1.** Esquema de metodología general.

Fuente: Elaboración propia

## 6.5 Definición de variables (dependientes, independientes)

**Tabla 10. Definición de variables**

Variable	Definición	Operacional	Tipo variable
Efecto antimicrobiano	Un antimicrobiano es una sustancia química que a bajas concentraciones actúa contra los microorganismos destruyéndolos o inhibiendo su crecimiento	Halos de inhibición en cajas Petri Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima bactericida	Cuantitativa Intercalar/ Escalar y de razón Variable dependiente
<i>Enterococcus faecalis</i>	Bacteria Gram positiva y anaerobia facultativa presente en las infecciones secundarias o persistentes después del tratamiento endodóntico	Unidades Formadoras de Colonia	Cuantitativa Razón Variable independiente
Extractos de cálices de jamaica	Soluciones preparadas con <i>Hibiscus sabdariffa</i> y solventes	En mililitros y concentración %	Cuantitativa Intercalar/ escalar Variable independiente
Hipoclorito de sodio	Compuesto químico NaClO utilizado como biosida o desinfectante	Mililitros y % concentración	Cuantitativa Intercalar/ escalar Variable independiente

EDTA®	Ácido etileno	Mililitros y %	Cuantitativa
	diaminotetraacetico), es un	concentración	Intercalar/ escalar
Zeyco®	agente quelante, posee		Variable
solucion al 17	radicales libres que se unen a		independiente
%	iones metálicos de un		
	determinado complejo		
	molecular fijándolos por		
	quelación. Utilizado como		
	irrigante en endodoncia		
Gluconato de	Sustancia antiséptica y de	Mililitros y %	Cuantitativa
clorhexidina al	acción bactericida y	concentración	Intercalar/ escalar
2 % zeyco®	fungicida.		Variable
			independiente

## 6.6 Análisis Estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado. Se realizó un análisis exploratorio de datos para comprobar los supuestos de igualdad de varianzas y distribución normal de errores de los resultados obtenidos de la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos de cálices de *H. sabdariffa* e irrigantes intraconducto.

Los resultados, se analizaron con el programa estadístico Statgraphics® para el análisis de varianza de una sola vía (ANOVA). Se realizó comparación de medias con la prueba de Tukey.

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Rendimiento de extracto según solvente utilizado

Según el solvente utilizado por 100 g de cálices secos, se obtuvieron rendimientos de entre 1.88 a 34.8 % de extractos de cálices de *H. sabdariffa*. El mayor rendimiento se obtuvo con agua (extracto acuoso) y el menor con el acetato de etilo (Tabla 11).

**Tabla 11. Rendimiento de los extractos de cálices de *H. sabdariffa* variedad Teconoapa de Guerrero por 100 g con diferentes solventes**

<i>Rendimiento del extracto</i>	
Jamaica Tecoanapa de Guerrero en agua	34.8 %
Jamaica Tecoanapa de Guerrero en acetona	4 %
Jamaica Tecoanapa de Guerrero en acetato de etilo	1.8 %
Jamaica Tecoanapa de Guerrero en etanol	18 %

### 7.2 Valores de pH de los extractos e irrigantes y desinfectantes utilizados en endodoncia

Con un potenciómetro se midió los diferentes pH de los extractos e irrigantes utilizados en endodoncia. Los valores de pH de todas las soluciones examinadas se reportan en la Tabla 12. Como se observa, el valor del pH más ácido lo presentó el extracto de acetona y el menos ácido el acuoso. Por otro lado, los irrigantes clorhexidina presento un pH cercano a la neutralidad. Mientras que hipoclorito y EDTA se pueden considerar alcalinos. Esta información coincide con la reportada con otros autores.

**Tabla 12. Valores de pH de los extractos de cálices de *H. sabdariffa* e irrigantes intraconducto**

	pH
Gluconato de clorhexidina 2 %	6.379
Hipoclorito 5,7 %	13.424
EDTA 17 %	9.366
Jamaica Tecoanapa de Guerrero en agua	2.596
Jamaica Tecoanapa de Guerrero en acetona	1.939
Jamaica Tecoanapa de Guerrero en acetato de etilo	2.081
Jamaica Tecoanapa de Guerrero en etanol	2.012

### 7.3 Efecto antimicrobiano por técnica de difusión en agar

Los extractos de cálices de *H. sabdariffa* de la variedad Teconoapa de Guerrero presentaron efecto antimicrobiano contra los microorganismos estudiados tabla 13. El extracto que mostro un comportamiento similar a la clorhexidina e hipoclorito para *E. faecalis* fue el extracto acetónico de cálices de *H. sabdariffa* donde EDTA fue el mas efectivo para esta cepa. Para *S. sanguinis* los extractos que tuvieron un efecto antimicrobiano parecido a la clorhexidina fueron el de acetona y acetato de etilo; siendo el hipoclorito de sodio el que más zona de inhibición tuvo. Existe poca informacion que describa el efecto antimicrobiano de *H. sabdariffa* uno de ellos fue realizado por Sulistyani quien muestra efecto bacteriostático contra ocho bacterias patógenas orales como *S. mutans* y *S. sanguinis*.<sup>70</sup>

**Tabla 13. Diámetros de halos de inhibición de extractos de cálices de *Hibiscus sabdariffa* variedad Tecoanapa de Guerrero e irrigantes comerciales contra dos cepas de bacterias patógenas orales.**

Cepa	Acuoso <sup>1</sup>	Acetona <sup>1</sup>	Acetato de etilo <sup>1</sup>	Etanol <sup>1</sup>	Clorhexidina <sup>1</sup>	EDTA <sup>1</sup>	Hipoclorito <sup>1</sup>
<i>E. faecalis</i>	7.39±0.57 <sup>a</sup>	10.44±0.45 <sup>bc</sup>	7.96±0.69 <sup>ab</sup>	7.73±0.88 <sup>a</sup>	12.52 ±1.09 <sup>c</sup>	20.12 ±3.19 <sup>d</sup>	12.45 ±1.09 <sup>c</sup>
<i>S. sanguinis</i>	7.03±0.52 <sup>bc</sup>	10.46±2.0 <sup>c</sup>	8.48±0.22 <sup>c</sup>	8.96±0.72 <sup>ab</sup>	9.92±0.72 <sup>bc</sup>	5.11 ±1.64 <sup>a</sup>	15.1± 1.81 <sup>d</sup>

<sup>1</sup> Media de 3 réplicas del diámetro de inhibición (mm) desviación estándar. Valores con letras diferentes en la misma fila por patógeno expresan diferencia significativa con un  $\alpha= 0.05$  prueba de Tukey. Valores con letras diferentes expresan diferencias significativas  $\alpha= 0,05$  mediante la prueba de Tukey para cada cepa.

### 7.4 Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida de extractos de cálices de *Hibiscus sabdariffa*

La CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) es la concentración más baja de un agente antimicrobiano que detiene el crecimiento de un microorganismo, mientras que la CMB

(Concentración Mínima Bactericida) es la concentración más baja de ese agente que mata el microorganismo, eliminando al menos el 99.9 % del inóculo inicial. Se obtuvieron las concentraciones de los extractos acetónico, etanólico, acetato de etilo y acuoso de cálices de *H. sabdariffa* variedad Tecoaapa de Guerrero como se muestra en la tabla 14. Estos valores oscilaron entre los 12.5 mg/mL y 50 mg/ mL, y podemos observar que estos extractos resultaron bactericidas para las cepas estudiadas.

**Tabla 14. Concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración mínima bactericida (CMB) y relación CMI/CMB de cálices de *Hibiscus sabdariffa* variedad Teconoapa de Guerrero contra dos cepas patógenas orales.**

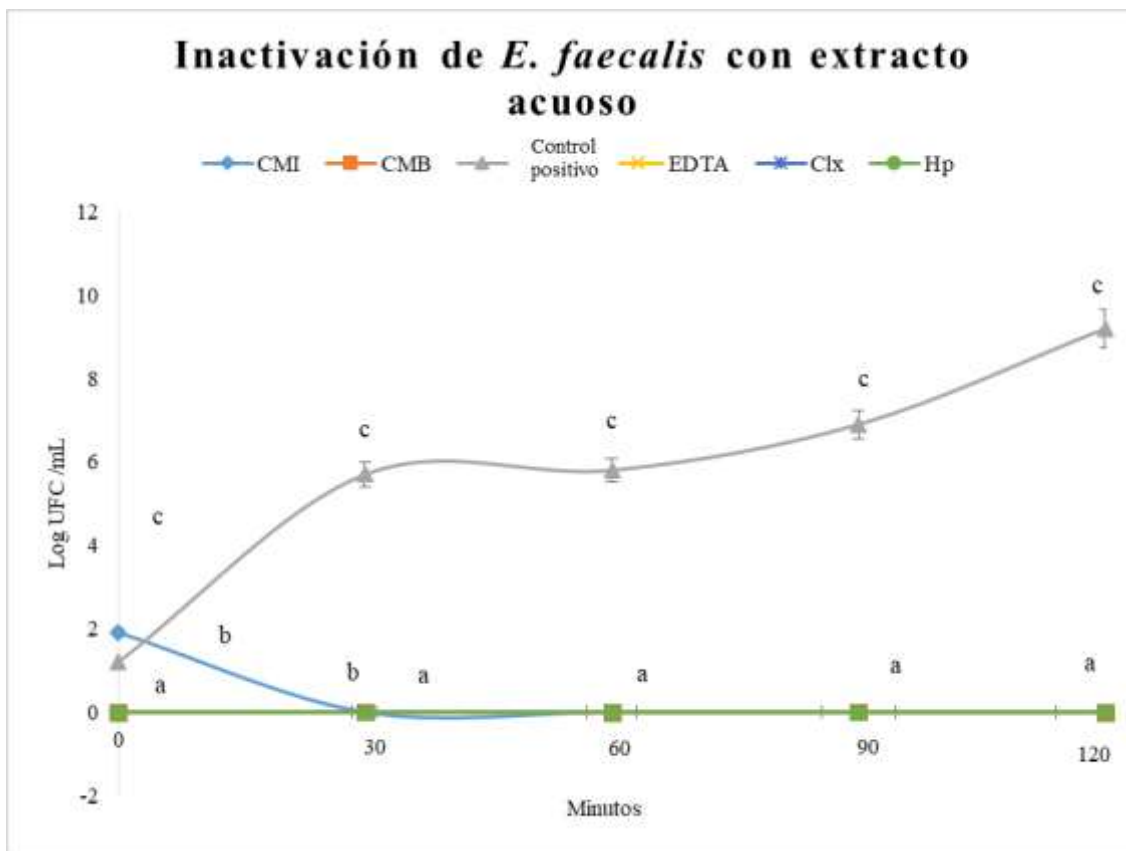
Cepa	Acuoso <sup>1</sup>			Etanol <sup>1</sup>			Acetato de etilo <sup>1</sup>			Acetona <sup>1</sup>		
	CMI*	CMB*	CMI/ CMB*	CMI*	CMB*	CMI/ CMB*	CMI*	CMB*	CMI/ CMB*	CMI*	CMB*	CMI/ CMB*
<i>S. sanguinis</i>	25	12.5	2	12.5	12.5	1	25	25	1	25	25	1
<i>E. faecalis</i>	50	25	2	50	25	2	25	25	1	25	25	1

<sup>1</sup> Medida de 3 réplicas \*mg/mL una sustancia se considera bactericida cuando su relación CMI/CMB es  $\leq 4$  y bacteriostático cuando esta relación es  $\geq 4$ .

### 7.5 Efecto de los extractos de cálices de *Hibiscus sabdariffa* en la sobrevivencia de *E. faecalis* y *S. sanguinis*.

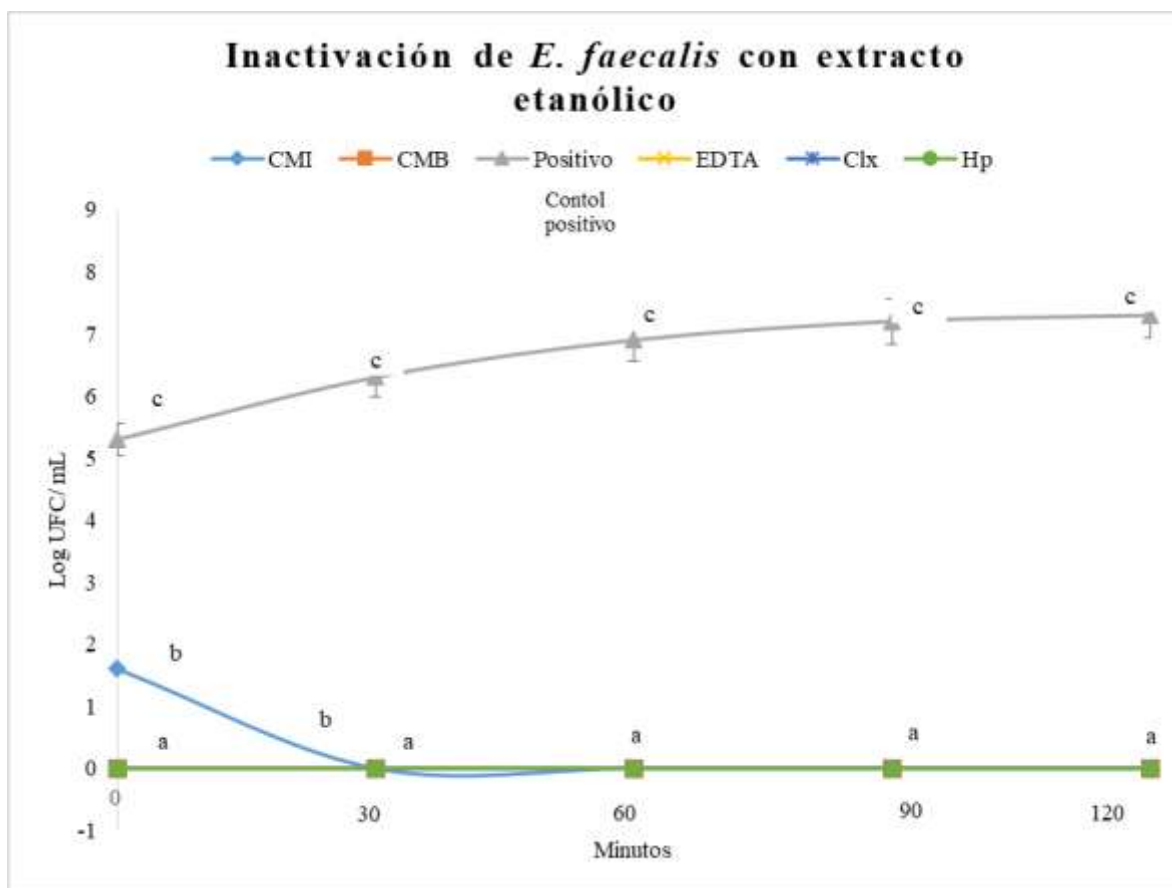
La cinética microbiana es el estudio cuantitativo del crecimiento, la actividad y la supervivencia de los microorganismos y de los mecanismos que los rigen. Se enfoca en las tasas de los procesos microbianos (como crecimiento, muerte, reproducción y metabolismo) y su relación con factores ambientales (nutrientes, temperatura). Las figuras 2 a 9 muestran el comportamiento de células viables al utilizar las concentraciones de CMI y CMB de los distintos extractos en las cepas *E. faecalis* y *S. sanguinis* a distintos tiempo T0= 0 minutos, T1= 30 minutos, T2= 60 minutos, T3= 90 minutos y T4= 120 minutos de incubación respectivamente y su posterior vertido en placa, incubación a 35 °C por 24 horas, los

resultados expresados en UFC por mL, la cual reduce drásticamente desde el T1= exposición del extracto a 30 minutos comparado con el control positivo y similar a los irrigantes y desinfectantes intraconducto.



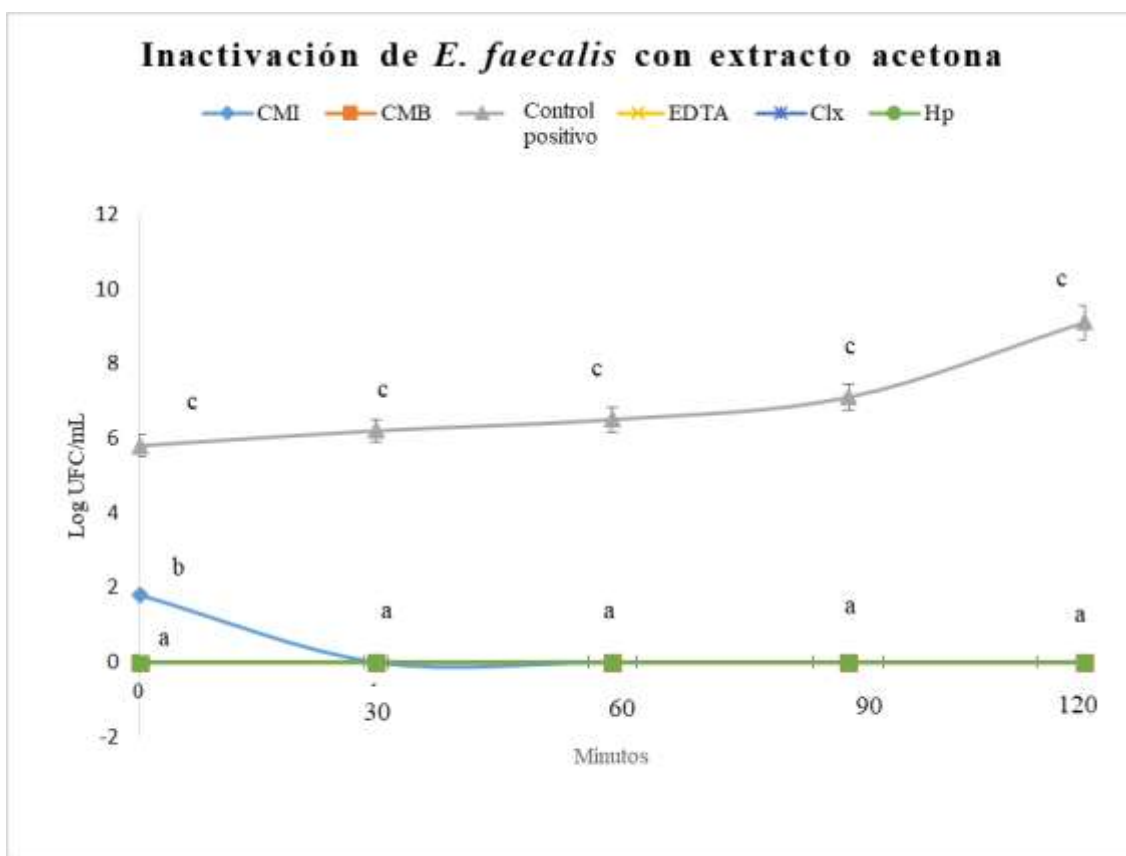
**Figura 2.** Efecto del **extracto acuoso** de cálices de *Hibiscus sabdariffa* variedad Tecoaapa de Guerrero sobre recuentos de células viables de *E. faecalis* en intervalos de tiempo. Los datos se presentan como media desviación estándar de tres experimentos independientes. Los resultados se expresan en UFC mg/mL en un promedio de medida de 3 réplicas. Clx= clorhexidina Hp= Hipoclorito CMI= Concentración Mínima Inhibitoria del extracto CMB=Concentración Mínima Bactericida del extracto



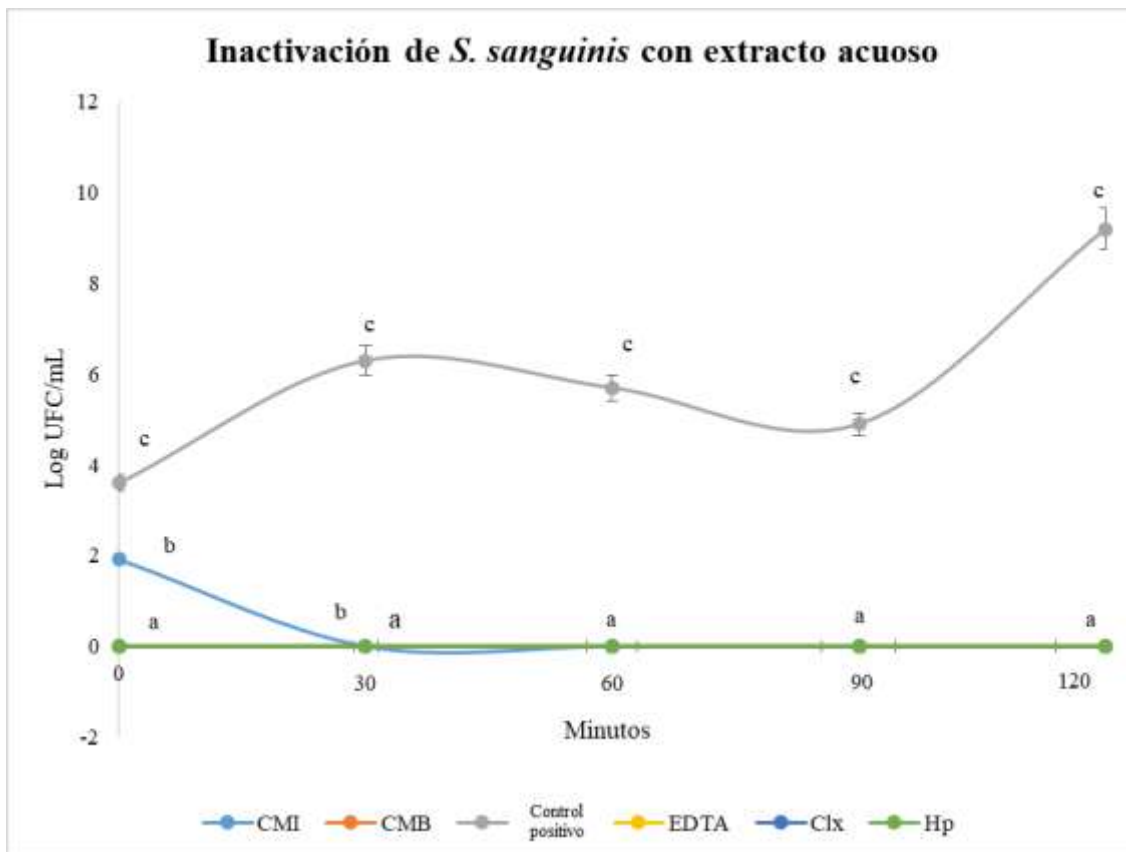


**Figura 3.** Efecto del **extracto etanólico** de *Hibiscus sabdariffa* variedad Tecoaapa de Guerrero sobre recuentos de células viables de *E. faecalis* en intervalos de tiempo. Los datos se presentan como media desviación estándar de tres experimentos independientes. Los resultados se expresan en UFC mg/mL en un promedio de medida de 3 réplicas. Clx= clorhexidina Hp= Hipoclorito CMI= Concentración Mininima Inhibitoria del extracto CMB=Concentración Minima Bactericida del extracto

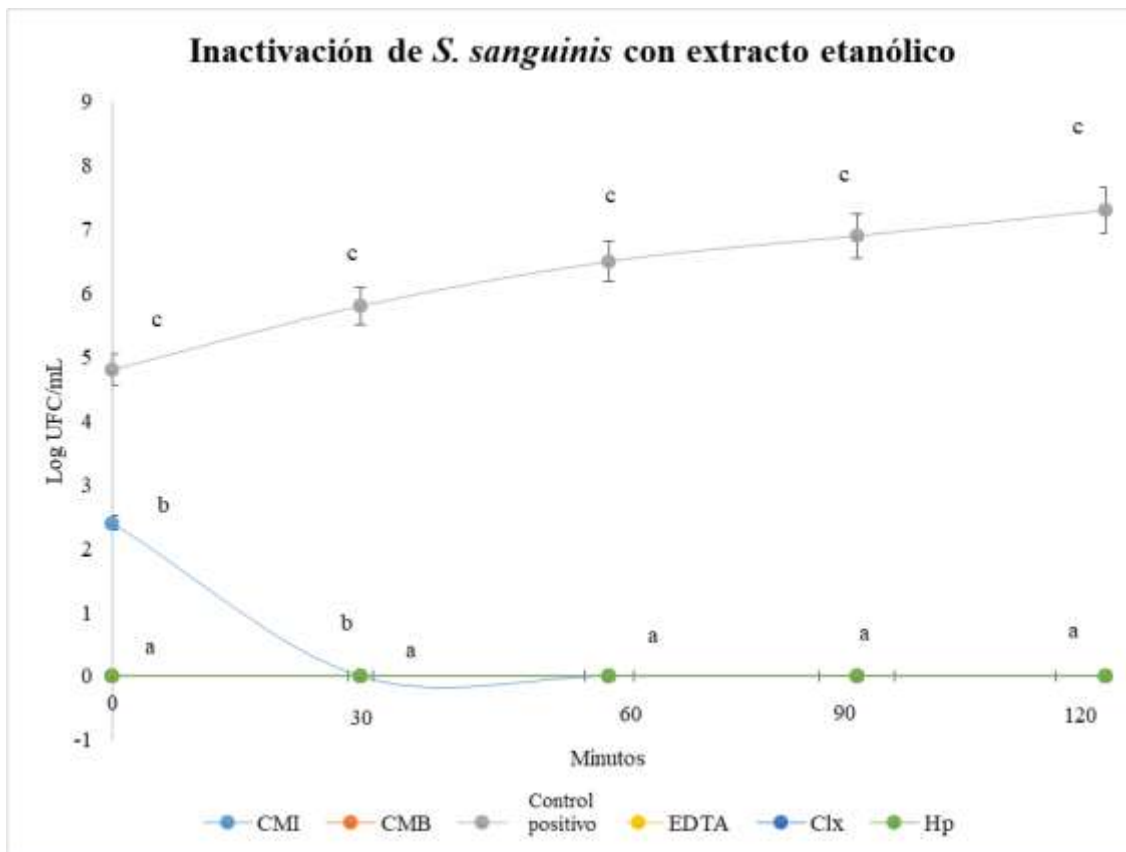
**Figura 4.** Efecto del **extracto de acetato de etilo** de cálices de *Hibiscus sabdariffa* variedad Tecoaapa de Guerrero sobre recuentos de células viables de *E. faecalis* en intervalos de tiempo. Los datos se presentan como media desviación estándar de tres experimentos independientes. T0= 0 minutos T2=30 minutos T3=60 minutos T3=60 minutos T4=90 minutos T5=120 minutos, los resultados se expresan en UFC mg/mL en un promedio de medida de 3 réplicas. Clx= clorhexidina Hp= Hipoclorito CMI= Concentración Mininima Inhibitoria del extracto CMB=Concentración Minima Bactericida del extracto



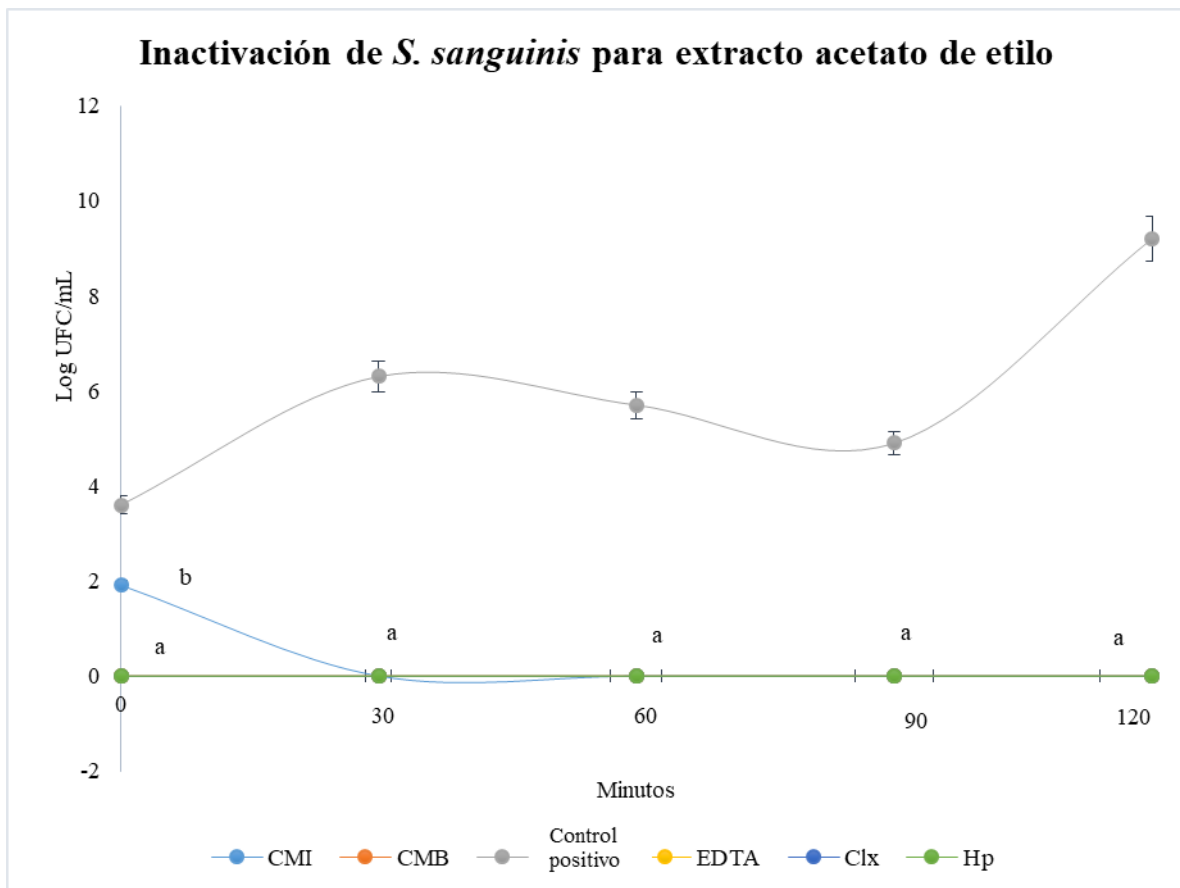
**Figura 5.** Efecto del **extracto de acetona** de cálices de *Hibiscus sabdariffa* variedad Tecanapa de Guerrero sobre recuentos de células viables de *E. faecalis* en intervalos de tiempo. Los datos se presentan como media desviación estándar de tres experimentos independientes. Los resultados se expresan en UFC mg/mL en un promedio de medida de 3 réplicas. Clx= clorhexidina Hp= Hipoclorito CMI= Concentración Mininima Inhibitoria del extracto CMB=Concentración Minima Bactericida del extracto



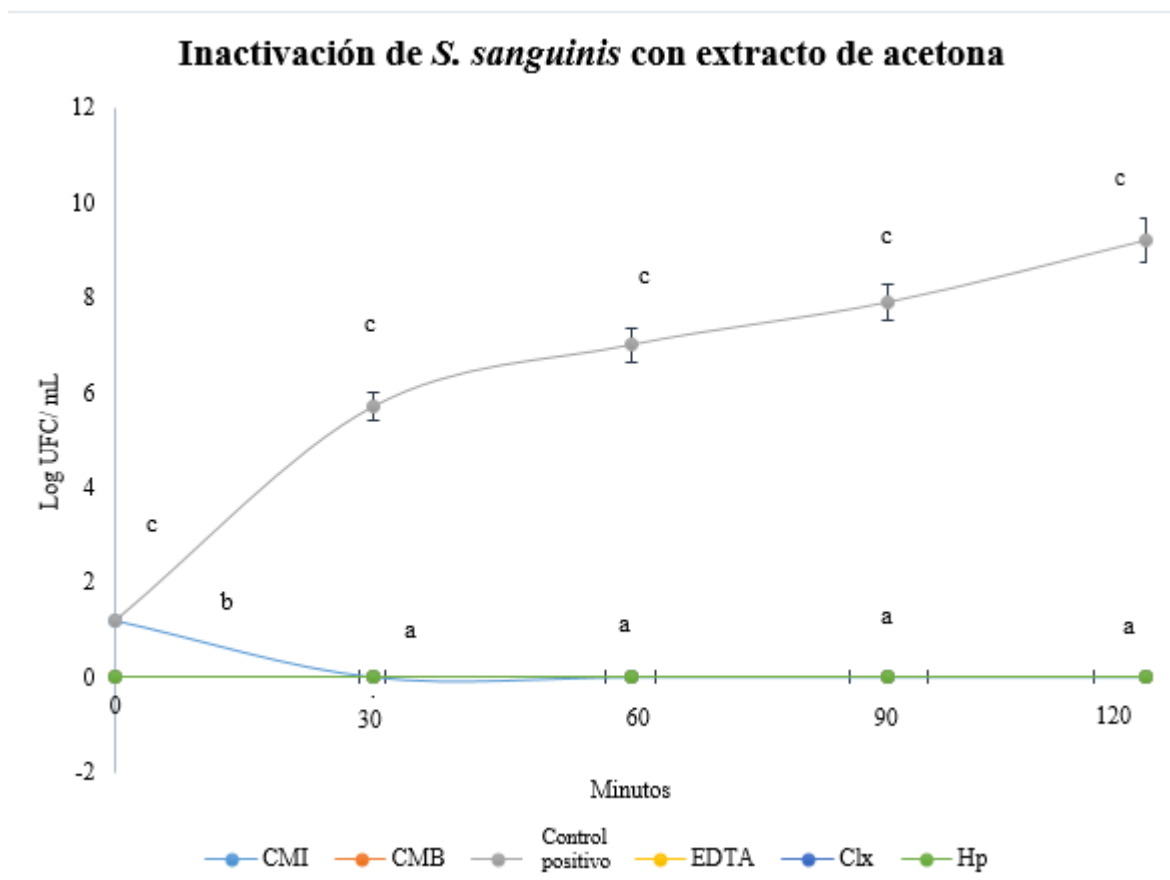
**Figura 6.** Efecto del extracto acuoso de cálices de *Hibiscus sabdariffa* variedad Tecuanapa de Guerrero sobre recuentos de células viables de *S. sanguinis* en intervalos de tiempo. Los datos se presentan como media desviación estándar de tres experimentos independientes. Los resultados se expresan en UFC mg/mL en un promedio de medida de 3 réplicas. Clx= clorhexidina Hp= Hipoclorito CMI= Concentración Mininima Inhibitoria del extracto CMB=Concentración Minima Bactericida del extracto



**Figura 7.** Efecto del extracto etanólico de cálices de *Hibiscus sabdariffa* variedad Tecuanapa de Guerrero sobre recuentos de células viables de *S. sanguinis* en intervalos de tiempo. Los datos se presentan como media desviación estándar de tres experimentos independientes. Los resultados se expresan en UFC mg/mL en un promedio de medida de 3 réplicas. Clx= clorhexidina Hp= Hipoclorito CMI= Concentración Mininima Inhibitoria del extracto CMB=Concentración Minima Bactericida del extracto



**Figura 8.** Efecto del extracto de acetato de etilo de cálices de *Hibiscus sabdariffa* variedad Tecoaapa de Guerrero sobre recuentos de células viables de *S. sanguinis* en intervalos de tiempo. Los datos se presentan como media desviación estándar de tres experimentos independientes. Los resultados se expresan en UFC mg/ml en un promedio de medida de 3 réplicas. Clx= clorhexidina Hp= Hipoclorito CMI= Concentración Mininima Inhibitoria del extracto CMB=Concentración Minima Bactericida del extracto



**Figura 9.** Efecto del extracto acuoso de acetona de cálices de *Hibiscus sabdariffa* variedad Tecoanapa de Guerrero sobre recuentos de células viables de *S. sanguinis* en intervalos de tiempo. Los datos se presentan como media desviación estándar de tres experimentos independientes. Los resultados se expresan en UFC mg/mL en un promedio de medida de 3 réplicas. Clx= clorhexidina Hp= Hipoclorito CMI= Concentración Mininima Inhibitoria del extracto CMB=Concentración Minima Bactericida del extracto.

## 7.6 Adherencia bacteriana a puntas de gutapercha

Es importante conocer el numero aproximado de microorganismos que se adhieren a una punta de gutapercha contaminada intensionalmente con cepa activa de *E. faecalis*, la tabla 15 muestra un promedio del número de bacterias que se adhieren al cono de gutapercha cuando se expone a una contaminación de 30 minutos.

**Tabla 15. Adherencia bacteriana de *E. faecalis* a los conos de gutapercha**

a) *E. faecalis*

Conteo	
Promedio por punta de gutapercha	3.16X10 <sup>3</sup> UFC/mL

\*Medida de 3 réplicas por punta de gutapercha

Asimismo, para *S. sanguinis* se realizó contaminación intencional de 3 puntas para hacer un conteo promedio del numero de UFC que se adherian a estos conos, la tabla 16 muestra un promedio del número de bacterias que se adhieren al cono de gutapercha cuando se expone a una contaminación de 30 minutos.

**Tabla 16. Adherencia bacteriana de *S. sanguinis* a los conos de gutapercha**

b) *S. sanguinis*

Conteo	
Promedio por punta de gutapercha	7.2x10 <sup>4</sup> UFC/mL

\*Medida de 3 réplicas por punta de gutapercha

## 7.7 Desinfección de puntas de gutapercha

Los conos de gutapercha se crean en circunstancias asépticas y tienen propiedades antibacterianas, en particular debido al componente de óxido de zinc, pero pueden contaminarse por aerosoles, almacenamiento inadecuado y manipulación física. Por lo tanto, antes de utilizar las puntas de gutapercha como material de relleno, se requiere un protocolo rápido de desinfección en la consulta, la tabla 17 expresa en porcentaje de efectividad en reducción de *E. faecalis* una vez aplicado el tratamiento con los controles positivo, negativo y extractos de cálices de *H. sabdariffa* en una descontaminación rápida por 5 minutos.

**Tabla 17. Desinfección de puntas utilizando los extractos de cálices de *H. sabdariffa* para *E. faecalis***

a) *E. faecalis*

Acetona	Acetato de etilo	Etanol	Acuoso	Clorhexidina	EDTA	Hipoclorito	Agua (+)
99 %	99 %	99 %	99 %	99 %	99 %	99 %	0 %

\*Medida de 3 réplicas por punta de gutapercha

En esto entendido, la tabla 18 expresa en porcentaje de efectividad en reducción de *S. sanguinis* una vez aplicado el tratamiento con los controles positivo, negativo y extractos de *H. sabdariffa* en una descontaminación rápida por 5 minutos.

**Tabla 18. Desinfección de puntas utilizando los extractos de cálices de *H. sabdariffa* para *S. sanguinis***

c) *S. sanguinis*

Acetona	Acetato de etilo	Etanol	Acuoso	Clorhexidina	EDTA	Hipoclorito	Agua (+)
100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	99 %	100 %	0 %

\*Medida de 3 réplicas por punta de gutapercha.



## VIII DISCUSIÓN

Es importante contemplar la naturaleza de las puntas de gutapercha que al ser un material termoplástico se encuentra en envases pre esterilizados, existen estudios que han mostrado que una vez abiertos en la temporalidad de un año de uso muestran un grado de contaminación. Por lo que, la detección de estos microorganismos plantea la preocupación por una posible contaminación al momento de obturar el diente, y este riesgo no puede considerarse insignificante. Debido a esto, suelen desinfectarse utilizando productos químicos que producen efectos adversos, en los pacientes y en la estructura del mismo material. Es por ello que la ciencia se encuentra en búsqueda de productos naturales que como distintos autores mencionan tienen efectividad antimicrobiana similar a estos desinfectantes químicos. El éxito de la terapia endodóntica depende de mantener una continuidad aséptica desde el momento de la preparación del diente de acceso hasta la restauración.<sup>88</sup>

En la medicina convencional, *Hibiscus sabdariffa* se ha utilizado durante mucho tiempo principalmente para tratar enfermedades inflamatorias e infecciosas. Se ha demostrado en numerosos estudios que los extractos de *H. sabdariffa* tienen propiedades antimicrobianas contra una variedad de patógenos como virus, hongos y bacterias.<sup>89</sup>

Nuestro objetivo fue evaluar el efecto antimicrobiano de extractos de cálices de *H. sabdariffa* variedad Tecuanapa de Guerrero en un modelo *in vitro* en puntas de gutapercha. Al tener evidencia científica de que dichos extractos tienen efecto sobre algunas otras cepas bucales, tomando en cuenta que existe poca evidencia científica del comportamiento de estos extractos en la microbiota oral; la mayoría de estudios están enfocados en bacterias de tipo gastrointestinal.<sup>90</sup> Los extractos obtenidos con solventes de diferentes polaridades tuvieron distinto rendimiento en extracto seco siendo el de mayor rendimiento el acuoso con 34.8 %, el de etanol con 18 %, de acetona 4 % y el de menor rendimiento el de acetato de etilo con 1.8 % a partir de 100 g de cálices secos de *H. sabdariffa*; estos fueron similares a los rendimientos obtenidos por otros autores y se utilizaron para realizar pruebas antimicrobianas en comparación con los irrigantes intraconducto.<sup>99</sup>

El pH de nuestros extractos en solución fue mayormente ácido entre 1.9 y 2.5, esto debido a los componentes de los cálices (ácido hibiscus, ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico)

reportados por otros autores mientras los irrigantes intraconducto tuvieron clorhexidina pH de 6.3, hipoclorito 13.4 y EDTA® 9.3.<sup>100</sup>

La bibliografía cuenta con múltiples estudios que demuestran la efectiva descontaminación de conos de gutapercha con soluciones como el hipoclorito de sodio desde concentraciones al 2.5 % en un tiempo estimado de 1 a 5 minutos. Para la clorhexidina al 2% en los mismos tiempos. Resultados que coinciden con los descritos en este trabajo.<sup>101</sup>

Sin embargo, para soluciones como el EDTA®, se han descartado bibliográficamente sus propiedades antimicrobianas ya que es utilizado, en mayor proporción para remover barrillo de los túbulos dentinarios, y su uso se alterna con alguna otra solución por lo cual no se considera antimicrobiano; esta propiedad ha sido poco explorada científicamente, sin embargo, en este estudio demostró efectos antimicrobianos contra las cepas estudiadas.<sup>102</sup>

Asímismo, se han utilizado otros extractos para la descontaminación efectiva de conos de gutapercha obteniendo una media de UFC para extractos de nemeen 131.81, pancha tulsi 2.12, fibras de curcumina 17.47, jugo de amla 65.59 y aloe vera 99.71 para *E. faecalis* respectivamente. Por lo que nos aventuramos a decir, que, las alternativas con extractos naturales pueden alcanzar un grado antibacteriano similar a las soluciones químicos sintéticos utilizados actualmente por lo menos para materiales de tipo termoplástico como la gutapercha.<sup>94</sup> Sin embargo, los estudios encontrados y el presente tienen ciertas limitaciones que pueden ser de relevancia como pudieran ser el análisis de la topografía de estas puntas de gutapercha expuestas a estos extractos en diferentes tiempos y analizadas por microscopia, ya que esta se puede ver dañada en su estructura por el pH de estos extractos. Como ya ha sido demostrado, para desinfectantes como el hipoclorito de sodio, que sugiere no exponer estas puntas por mas de 5 minutos debido a que presentan deterioro en su estructura.<sup>103</sup>

### 8.1 Efecto antimicrobiano por técnica de difusión en agar

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto antibacteriano de los extractos de cálices de *H. sabdariffa* por técnica de difusión en placa para *E. faecalis* y *S. sanguinis*. Este estudio nos sirvió para determinar la medida de halos de inhibición de nuestros extractos e irrigantes intraconducto.<sup>104</sup>

Los extractos de cálices de *H. sabdariffa* a una concentración del 10 % tuvieron efecto antimicrobiano contra los microorganismos estudiados; el análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) mostró diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ), mostrando inhibición similar de nuestros extractos con los desinfectantes de uso actual obteniendo halos para *E. faecalis* desde 7.39 mm y 10.46 mm comparado con el efecto de las soluciones desinfectantes intraconducto esta actividad asemeja a nuestro extracto de acetato de etilo y acetona con las mediciones obtenidas por hipoclorito y clorhexidina. Para *S. sanguinis* las mediciones oscilaron entre 7.03 milímetros (mm) hasta 10.46 mm asemejando nuestros 4 extractos a las mediciones obtenidas para clorhexidina.

Específicamente, las zonas de inhibición mayores se lograron con los extractos de acetato de etilo y acetona. En general, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el efecto antimicrobiano de los extractos y desinfectantes intraconducto frente a las especies patógenas estudiadas.

Baena Santillán y colaboradores en el 2021, mostraron diámetros de inhibición mayores con extractos en distintos solventes hasta de 13.5 mm de diámetro con dos distintas variedades de *H. sabdariffa* sobre *S. sanguinis*. Reportando específicamente para *S. sanguinis*, con el extracto de acetato de etilo de *H. sabdariffa* variedad Tecoanapa de Guerrero (13.8 mm).<sup>67</sup>

Es importante recalcar que, las diferencias observadas en el efecto antimicrobiano de los extractos de cálices de *H. sabdariffa* se pueden atribuir a la presencia de diferentes tipos de moléculas antimicrobianas en cada tipo de extracto ya que cada extracto se obtuvo con un solvente de diferente polaridad.<sup>97</sup>

Por tanto, los resultados sugieren la presencia de antimicrobianos diferentes (en tipo y concentración) y con una polaridad específica en cada tipo de extracto. De hecho,

recientemente se ha informado que algunas de las moléculas responsables del efecto antimicrobiano de los cálices de *H. sabdariffa* son el ácido hibiscus y el ácido protocatéquico, que son moléculas con diferente polaridad, y se extraen de los cálices de *H. sabdariffa* con disolventes de diferente polaridad. Además, es posible que en cada uno de los extractos de *H. sabdariffa* existan otros compuestos antimicrobianos, además del ácido hibiscus y el ácido protocatéquico, que aún no han sido reportados y que también están participando en el efecto antimicrobiano de los extractos.<sup>97</sup>

## **8.2 Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida de los extractos de cálices de *Hibiscus sabdariffa*.**

Para determinar el potencial uso de los extractos de cálices de *H. sabdariffa* como antimicrobianos en la industria farmacéutica, se han establecido las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) y las Concentraciones Mínimas Bactericidas (CMB), en este entendido, se realizaron dichas pruebas para los extractos acuoso, etanólico, acetónico y de acetato de etilo sobre *E. faecalis* y *S. sanguinis*.

Para *S. sanguinis*, el extracto acuoso tuvo CMI de 25 mg/mL y CMB de 12.5 mg/mL en cuanto a los extractos etanólico CMI y CMB de 12.5 mg/mL de acetato de etilo y acetona la CMI y CMB fueron de 25 mg/mL, estas fueron mayores a los reportados por otros autores como Baena Santillan, por 5 mg/mL reportando para el extracto acuoso una CMI y CMB de 20 mg/mL; para el extracto etanólico una CMI de 10 mg/mL y CMB de 20 mg/mL y para extractos de acetato de etilo y acetona una CMI y CMB de 20 mg/mL, esto debido probablemente a que nuestra técnica de dilución doble seriada fue disminuyendo de una concentracion inicial, decreciendo por mitad de 100 a 50, 25 y 12,5 mg/mL en cada tubo de ensayo lo que nos acerco a las mediciones de la autora ya mencionada.<sup>67</sup>

Para *E. faecalis*, se reporta mediciones con extracto acuso 50 mg/mL de CMI y CMB de 25 mg/mL; extracto de etanol 50 mg/mL de CMI y CMB de 25 mg/mL; para extractos de acetato de etilo y acetona reportan una CMI y CMB de 25 mg/mL; esta información no pudo ser comparada con otros autores ya que no existen pruebas de estos extractos con esta cepa; probablemente el aumento de la concentracion se deba a que es una cepa anaerobia facultativa que resiste un poco mas a los cambios de pH y temperatura.

Finalmente, el efecto antimicrobiano de los extractos de cálices de *H. sabdariffa*, se determinó como bactericida ya que todos tuvieron un promedio entre 1 y 2. Un compuesto se considera bactericida cuando la proporción de CMB / CMI es  $\leq 4$  y bacteriostático cuando es  $>4$ .<sup>67</sup>

### **8.2.1 Determinación del efecto bactericida/bacteriostático de las soluciones de ensayo.**

Todos los extractos de cálices de *H. sabdariffa*, exhibieron actividad bactericida contra las cepas patógenas en este estudio. Para *S. sanguinis* el extracto etanólico, acetato de etilo y acetona tuvieron valor de 1, mientras que el acuoso tuvo un valor de 2 lo que es coincidente con el estudio de Baena Santillan en el 2020. Para *E. faecalis* el extracto acuoso y etanólico tuvieron un cociente de 2 y para extracto de acetato de etilo y acetona de 1 es importante recordar que cuando el cociente se encuentra entre 1 y 4, relación CMI/CMB, se considera una solución bactericida. Sin embargo algunos otros autores los consideran bacteriostáticos comparado con otras especies de tipo gastrointestinal resistentes a antibióticos.<sup>67</sup>

### **8.3 Efecto de los extractos de cálices de *Hibiscus sabdariffa* en la sobrevivencia de *E. faecalis* y *Streptococcus sanguinis*.**

El objetivo de este estudio fue determinar la curva de muerte para *E. faecalis* y *S. sanguinis*, en estas pruebas se obtuvieron resultados del conteo de células viables UFC expuestas a las concentraciones de CMI y CMB para cada extracto comparado con los irrigantes comerciales pudiendo observar que el conteo de células disminuye a cero a partir del tiempo 0 minutos en el caso de los tres irrigantes, para nuestros extractos se tuvo el mismo comportamiento en las concentraciones bactericidas, y para las concentraciones inhibitorias se necesitó 30 minutos de exposición para lograr reducir a cero la tasa de viabilidad para ambas cepas. Esta información no pudo ser comparada con otros autores, ya que como hemos mencionado anteriormente, existen pocos estudios de cepas bucales expuestas a extractos naturales.<sup>67</sup>

### **8.4 Adherencia bacteriana y desinfección de puntas de gutapercha.**

Debido a que los conos gutapercha son lábiles al calor, tanto la esterilización con calor húmedo como con calor seco son ineficaces ya que modifican la estructura de la gutapercha. Como resultado, los desinfectantes químicos como el hipoclorito de sodio se emplean comúnmente para la esterilización en frío, que demora entre 1 y 25 minutos.

Se ha demostrado que la inmersión de las puntas en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 5,25 % durante 1 minuto es el método más eficaz para desinfectarlas sin causar alteraciones topográficas. Sin embargo, se ha documentado la deposición de cristales en la superficie de los conos o puntas de gutapercha en todas las concentraciones, lo que obstruye la unión de los selladores con los conos y provoca microfiltraciones.<sup>104</sup>

Existen pocos estudios que comprueban la eficacia de extractos naturales en la descontaminación de puntas de gutapercha. Vanaplatá y colaboradores realizaron un estudio utilizando puntas de gutapercha y extractos naturales comparando las medias de unidades formadoras de colonias (UFC) en todos los grupos, y se observó una diferencia estadísticamente significativa entre ellos ( $p < 0,01$ ). El hipoclorito de sodio (NaOCl), como grupo control, mostró un promedio de 5 UFC. La cúrcuma presentó el promedio más bajo, 55 UFC, y fue la más eficaz de los grupos experimentales. El neem y el calotropis presentaron los promedios más altos, 130 UFC y 200 UFC, respectivamente, lo que las convierte en las soluciones menos eficaces de las analizadas.<sup>74</sup>

Existe evidencia sólida que demuestra la contaminación de conos o puntas de gutapercha en el ambiente clínico, el número de microorganismos que se adhieren a estos en una experimentación *in vitro* es mayor al ser intencional para *E. faecalis* se obtuvo un promedio de  $3.16 \times 10^3$  UFC/mL en cada punta y para *S. sanguinis* de  $7.2 \times 10^4$ . Teniendo mayor contaminación con esta última cepa esto expuesto a una contaminación intencionada de 30 minutos, ya que con tiempos menores no se lograban adherir a ellas por las condiciones que presentan las mismas puntas (materiales antimicrobianos en su composición, superficie pulidas para evitar adherencia). En cuanto a su desinfección, todos los extractos e irrigantes mostraron una eficiencia de entre 99 y 100 % de eficacia para su descontaminación en 5 minutos, esto nos permite pensar en no saltar nunca la descontaminación de este material de obturación, ya que a pesar de sus características, corren el riesgo de contaminación; asimismo, que los extractos de cálices de *H. sabdariffa* tienen características antibacterianas similares al EDTA, clorhexidina e hipoclorito, lo que abre una oportunidad para estas soluciones naturales en el área de desinfección intraconducto.

Los tratamientos herbales han ganado popularidad a medida que las personas buscan opciones más económicas, accesibles y naturales. Sin embargo, la información sobre su aplicación en endodoncia y desinfección de conos de gingivitis aún es insuficiente.<sup>74</sup>

## IX CONCLUSIONES

- Para las pruebas de halo de inhibición, los extractos con mayor efecto fueron acetona y acetato de etilo. Sin embargo, todos mostraron una actividad similar a los desinfectantes intraconducto especialmente a clorhexidina e hipoclorito.
- Todos los extractos tuvieron una actividad bactericida en las cepas patógenas estudiadas.
- La prueba de viabilidad celular mostro que las cepas necesitan un mínimo de entre 0 a 30 minutos para lograr esta actividad bactericida.
- La adherencia bacteriana de *E. faecalis* en un cono de gutapercha es de aproximadamente  $3.16 \times 10^3$  UFC/mL.
- La adherencia bacteriana de *S. sanguinis* en un cono de gutapercha es de aproximadamente  $7.2 \times 10^4$  UFC/ mL.
- La desinfección de conos de gutapecha mostró una efectividad de entre el 99% y 100% de reducción del número de unidades formadoras que se adhieren a estos conos o puntas de gutapercha.



## **X RECOMENDACIONES**

Derivado del siguiente estudio surgen las siguientes recomendaciones:

- Las infecciones polimicrobianas son comunes en los conductos radiculares. Este estudio, por otro lado, analiza la eficacia de los tratamientos herbales contra *E. faecalis* para desinfectar los conos de gutapercha antes de la obturación. Se necesita más investigación para evaluar la eficacia del desinfectante contra otras bacterias y organismos como hongos, virus y levaduras.
- Al clínico en práctica de tratamiento de endodoncia se recomienda siempre realizar desinfección de las puntas de gutapercha ya que a pesar de las características conferidas a las puntas de gutapercha estas son susceptibles a la contaminación durante su manipulación.
- Se sugiere estudios que impliquen conocer si dichos extractos además de conferir descontaminación muestren si hay efectos en la topografía de estas puntas.
- Se sugieren estudios que muestren interacción en desinfección de otros microorganismos o cepas.
- Posibles pruebas de descontaminación intraconducto en algún modelo *in vivo* para uso como alternativa irrigante.

## **XI REFERENCIAS**

1. - Siqueira JF Jr, Rôças IN. Present status and future directions: Microbiology of endodontic infections. *Int Endod J.* 2022; Suppl 3:512-530.
2. - Fransson H, Dawson V. Tooth survival after endodontic treatment. *Int Endod J.* 2023; 56 Suppl 2:140-153.
- 3.- Khandelwal A, Janani K, Teja K, Jose J, Battineni G, Riccitiello F, Valletta A, Palanivelu A, Spagnuolo G. Periapical Healing following Root Canal Treatment Using Different Endodontic Sealers: A Systematic Review. *Biomed Res Int.* 2022; 2022:3569281.
4. - Gulabivala K, Ng YL. Factors that affect the outcomes of root canal treatment and retreatment-A reframing of the principles. *Int Endod J.* 2023 Mar;56 Suppl 2:82-115.
5. - Escapa IF, Chen T, Huang Y, Gajare P, Dewhirst FE, Lemon KP. New Insights into Human Nostril Microbiome from the Expanded Human Oral Microbiome Database (eHOMD): a Resource for the Microbiome of the Human Aerodigestive Tract. *Systems.* 2018; 3(6):e00187-18.
6. - Baker JL, Mark Welch JL, Kauffman KM, McLean JS, He X. The oral microbiome: diversity, biogeography and human health. *Nat Rev Microbiol.* 2024; 22(2):89-104.
- 7.- Adler CJ , Dobney K , Weyrich LS , *et al.* La secuenciación de la placa dental calcificada antigua muestra cambios en la microbiota oral con los cambios en la dieta de las revoluciones neolítica e industrial . *Nat Genet.* 2013; 45(4): 450 - 455.
- 8.- Gil-Chavarría Ivett, Aguirre Ariza Patricia, Buceta Martínez Leilee, Cruz Oliva Mariana, Damián Maldonado Ximena, Delgado Benitez Andrea, Godínez Crisostomo Rebeca, et al. Los tejidos de los órganos dentales: aspectos esenciales para la comprensión de la odontología difusión/divulgación. *Rev Dig C For.* 2024; 3(1): 61-69 pp.
8. - Karamifar K, Tondari A, Saghiri MA. Endodontic Periapical Lesion: An Overview on the Etiology, Diagnosis and Current Treatment Modalities. *Eur Endod J.* 2020; 5(2):54-67.
- 9.- Márquez K, Zúñiga CM, Torres R, Argueta L. Prevalencia reportada de caries dental en niños y adolescentes mexicanos. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2023; 61(5):653-660.

- 10.- Jakovljevic A, Nikolic N, Jaćimović J, Pavlovic O, Milicic B, Beljic-Ivanovic, *et al.* J. Prevalencia de periodontitis apical y tratamiento de conducto radicular no quirúrgico convencional en la población adulta general: una revisión sistemática actualizada y un metaanálisis de estudios transversales publicados entre 2012 y 2020. J. Endod. 2020; 46 (1):1371–1386.e8.
- 11.- Tibúrcio-Machado CS, Michelon C, Zanatta FB, Gomes MS, Marin, JA, Bier, CA. La prevalencia global de periodontitis apical: una revisión sistemática y metanálisis. Int. Endod. J. 2020; 54(1), 712–735.
12. - Goldberg M, Njeh A, Uzunoglu E. Is Pulp Inflammation a Prerequisite for Pulp Healing and Regeneration. Mediators Inflamm. 2015; 2015:347649.
13. - Su Y, Wang C, Ye L. Tasa de curación y dolor posobtusión en tratamientos endodóncicos de una sola visita versus de varias visitas para conductos radiculares infectados: una revisión sistemática. J. Endod. 2011; 37(1): 125–132.
14. - Bascones A, Manso F. Infecciones orofaciales. Diagnóstico y tratamiento. 1 Edición. Madrid: Avances médicos-dentales; 1994: 30-44.
15. - Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposure of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1965 ; 20: 340-9.
16. - Seltzer S, Bender IB, Nazimov H. Differential diagnosis of pulp conditions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1965; 19: 383-91.
- 17.- Simon J, Walton R, Pashley D, Dowden W y Bakland L. Endodoncia. 1º Edición. Madrid: Ed. McGraw-Hill Interamericana; 1996: Cap. 7.
- 18.- Siqueira JF Jr, Rôças IN, Hernández SR, Brisson-Suárez K, Baasch AC, Pérez AR, Alves FRF. Dens Invaginatus: Clinical Implications and Antimicrobial Endodontic Treatment Considerations. J Endod. 2022; 48(2):161-170.
19. - Shah D, Varahan S. *Enterococcus faecalis*. Trends Microbiol. 2024; 32(9):925-926.

- 20.- Hassan PA, Hameed Saeed C, Rashid SA, Sorchee SM, Shareef SH. Identification of *Streptococcus sanguinis* genes producing biofilm from gingivitis. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2022 Aug 31; 68(8):34-40.
21. - Karamifar K, Tondari A, Saghiri MA. Endodontic Periapical Lesion: An Overview on the Etiology, Diagnosis and Current Treatment Modalities. Eur Endod J. 2020; 5(2):54-67.
- 22.- Ruksakiet K, Hanák L, Farkas N, Hegyi P, Sadaeng W, Czumbel LM, Sang-Ngoen T, Garami A, Mikó A, Varga G, Lohinai Z. Antimicrobial Efficacy of Chlorhexidine and Sodium Hypochlorite in Root Canal Disinfection: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. J Endod. 2020; 46(8):1032-1041.e7.
23. - Rôças IN, Provenzano JC, Neves MA, Siqueira JF Jr. Disinfecting Effects of Rotary Instrumentation with Either 2.5% Sodium Hypochlorite or 2% Chlorhexidine as the Main Irrigant: A Randomized Clinical Study. J Endod. 2016; 42(6):943-7.
- 24.- Siqueira JF Jr, Rôças IN, Paiva SS, Guimarães-Pinto T, Magalhães KM, Lima KC. Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007; 104(1):122-30.
- 25.- Zandi H, Rodrigues RC, Kristoffersen AK, Enersen M, Mdala I, Ørstavik D, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Antibacterial Effectiveness of 2 Root Canal Irrigants in Root-filled Teeth with Infection: A Randomized Clinical Trial. J Endod. 2016; 42(9):1307-13.
26. - Fiorillo L, D'Amico C, Meto A, Mehta V, Lo Giudice G, Cervino G. Sodium Hypochlorite Accidents in Endodontic Practice: Clinical Evidence and State of the Art. J Craniofac Surg. 2024; 35(7):e636-e645.
- 27.- Cai C, Chen X, Li Y, Jiang Q. Advances in the Role of Sodium Hypochlorite Irrigant in Chemical Preparation of Root Canal Treatment. Biomed Res Int. 2023; 2023:8858283.
28. - Drews DJ, Nguyen AD, Diederich A, Gernhardt CR. The Interaction of Two Widely Used Endodontic Irrigants, Chlorhexidine and Sodium Hypochlorite, and Its Impact on the Disinfection Protocol during Root Canal Treatment. Antibiotics (Basel). 2023; 12(3):589.
29. - Arslan H, Uygun AD, Keskin A, Karatas E, Seçkin F, Yıldırım A. Evaluation of orange-brown precipitate formed in root canals after irrigation with chlorhexidine and QMix and

spectroscopic analysis of precipitates produced by a mixture of chlorhexidine/NaOCl and QMix/NaOCl. *Int Endod J.* 2015; 48(12):1199-203.

30.- Basrani B.R., Manek S., Sodhi R.N., Fillery E., Manzur A. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *J. Endod.* 2007; 33:966–969.

31.- Mortenson D., Sadilek M., Flake N.M., Paranjpe A., Heling I., Johnson J.D., Cohenca N. The effect of using an alternative irrigant between sodium hypochlorite and chlorhexidine to prevent the formation of para-chloroaniline within the root canal system. *Int. Endod. J.* 2012; 45:878–882. doi: 10.1111/j.1365-2591.2012.02048.

32. - Siddique R., Sureshbabu N.M., Somasundaram J., Jacob B., Selvam D. Qualitative and quantitative analysis of precipitate formation following interaction of chlorhexidine with sodium hypochlorite, neem, and tulsi. *J. Conserv. Dent.* 2019; 22:40–47.

33.- Meeprasert N, Jantarat J, Wichai W, Surarit R, Hargreaves KM. Effects of EDTA and saline as the final irrigation in regenerative endodontic procedures on the migration, proliferation, and differentiation of human stem cells from the apical papilla. *Clin Oral Investig.* 2023; 27(5):1973-1980.

34.- Farhad A, Saatchi M, Bagherieh S. Effect of Citric Acid Versus EDTA on Radiographic Root Development in Regenerative Endodontic Treatment: An Animal Study. *J Endod.* 2022; 48(4):535-541.

35. - Kalantar Motamedi MR, Mortaheb A, Zare Jahromi M, Gilbert BE. Micro-CT Evaluation of Four Root Canal Obturation Techniques. *Scanning.* 2021; 2021:6632822.

36. - Coşar M, Kandemir Demirci G, Çalışkan MK. The effect of two different root canal sealers on treatment outcome and post-obturation pain in single-visit root canal treatment: A prospective randomized clinical trial. *Int Endod J.* 2023; 56(3):318-330.

37.- Bhandi S, Mashyakh M, Abumelha AS, Alkahtany MF, Jamal M, Chohan H, Raj AT, Testarelli L, Reda R, Patil S. Complete Obturation-Cold Lateral Condensation vs. Thermoplastic Techniques: A Systematic Review of Micro-CT Studies. *Materials (Basel).* 2021; 14(14):4013.

38.- Aguilar-Hernández J, Torres-Méndez F, Méndez-González MV, Davila-Perez CE, Kolosovas-Machuca ES, Gutierrez-Sánchez M. Investigation of the thermal and

physicochemical behavior of two types of gutta-percha cones for back-filling the root canal. J Clin Exp Dent. 2023; 15(5):e382-e389.

39.- Da Costa RP, Alves Dos Santos GN, Petean IBF, Silva-Sousa AC, Camargo RV, Lopes-Olhê FC, Silva-Sousa YTC, Mazzi-Chaves JF, Sousa-Neto MD. Impact of low-fusion gutta-percha cones used in variations of the continuous wave condensation technique with filling sealers based on bioceramic compounds on the quality of root canal filling. Odontology. 2024; 112(4):1167-1177.

40.- Barakat R, Almohareb R, Hebbal M, Alaskar G, Alghufaily L, AlFarraj N, Albaz A. Efficiency of Using Different Greater Taper Gutta-Percha Cones in Continuous Warm Vertical Condensation: An *Ex Vivo* Study. J Contemp Dent Pract. 2021; 22(1):56-61.

41.- Miccoli G, Seracchiani M, Zanza A, Giudice AD, Testarelli L. Possible Complications of Endodontic Treatments. J Contemp Dent Pract. 2020; 21(5):473-474.

42.- Afkhami F, Rostami G, Batebi S, Bahador A. Residual antibacterial effects of a mixture of silver nanoparticles/calcium hydroxide and other root canal medicaments against *Enterococcus faecalis*. J Dent Sci. 2022; 17(3):1260-1265.

43.- Huang D, Wang X, Liang J, Ling J, Bian Z, Yu Q, et al. Expert consensus on difficulty assessment of endodontic therapy. Int J Oral Sci. 2024; 16(1):22.

44. - Buonavoglia A, et al. Endodontic microbial communities in apical periodontitis. J. Endod. 2023; 49:178–189. doi: 10.1016/j.joen.2022.

45.- Muthukrishnan A, Owens J, Bryant S, Dummer PM. Evaluation of a system for grading the complexity of root canal treatment. Br. Dent. J. 2007; 202:E26.

46. - Zhang Q, Chen H, Fan B, Fan W, Gutmann JL. Root and root canal morphology in maxillary second molar with fused root from a native Chinese population. J. Endod. 2014; 40:871–875.

47.-Varghese RM, Aravind Kumar S, Rajeshkumar S. Antibacterial activity of herbal formulation against common oral pathogens. Bioinformation. 2023; 19(5):663-669.

48. - Abullais Saquib S, Abdullah AlQahtani N, Ahmad I, Arora S, Mohammed Asif S, Ahmed Javali M, Nisar N. Synergistic antibacterial activity of herbal extracts with antibiotics on bacteria responsible for periodontitis. J Infect Dev Ctries. 2021; 15(11):1685-1693.
49. - Erb M, Kliebenstein DJ. Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy. Plant Physiol. 2020; 184(1):39-52.
- 50.- Liu W, Feng Y, Yu S, Fan Z, Li X, Li J, Yin H. The Flavonoid Biosynthesis Network in Plants. Int J Mol Sci. 2021 Nov 26; 22(23):12824.
- 51.- Shen N, Wang T, Gan Q, Liu S, Wang L, Jin B. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. Food Chem. 2022; 383:132531.
- 52.- Soto ER, Rus F, Mirza Z, Ostroff GR. Yeast Particles for Encapsulation of Terpenes and Essential Oils. Molecules. 2023; 28(5):2273.
53. - Bhambhani S, Kondhare KR, Giri AP. Diversity in Chemical Structures and Biological Properties of Plant Alkaloids. Molecules. 2021; 26(11):3374.
54. - Ponce G, Espillco M. Efecto antiinflamatorio de el gel a base de el extracto hidroalcohólico de la flor de *Hibiscus sabdariffa* L. (flor de jamaica) en ratas albinas. Huancayo: 2019.
55. - Gamboa F. Identificación y caracterización microbiológica, fenotípica y genotípica del *Streptococcus mutans*: experiencias de investigación. Univ Odontol. 2014; 33(71): 65-73.
56. - Larsen T, Fiehn N. Dental biofilm infections - an update. APMIS. 2017; 125(4):376-384.
57. - Scharnow A, Solinski A, Wuest W. Targeting *S. mutans* biofilms: a perspective on preventing dental caries. MedChemComm. 2019; 10(7):1057-1067.
58. - Riaz G, Chopra R. Biomedicine & pharmacotherapy a review on phytochemistry and therapeutic uses of *hibiscus sabdariffa* L. Biomed Pharmacother.2018; 102:575-586.
- 59.- Singh E, Srivastava S, Singh A. Pharmacological property of *hibiscus sabdariffa* a review. IJPT.2016; 7(3):140-145.

- 60- Olaleye, M.T. Cytotoxicity and Antibacterial Activity of Methanolic Extract of *Hibiscus sabdariffa*. J Med Plan Res. 2007; 1: 9-13.
61. - Kusumanegara K, Rachmawati E, Setiawan A. The difference of inhibitory zone between katuk (*Sauropus androgynous* L. Merr.) leaf infusion and roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) petals towards oral candida albicans. Padjadjaran J Dent. 2017; 29(2):118-122.
62. - Sri T. The difference of the salivary volume before and after drinking the rosella tea (*Hibiscus sabdariffa*). Padjadjaran J Dent. 2010; 22(3):171–174.
63. - Machmud E. Effectiveness of Roselle Effervescent Tablets as Traditional Medicinal Plants in preventing Growth of *Candida albicans* Colonies and *Streptococcus mutans*. J Contemp Dent Pract. 2018; 19(8):925-928.
64. - Febriyanti I, Dewi I, Indriyani R, Christiono S. The effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) petals extract as alternative disclosing solution for dental plaque identification. Jurnal kedokteran gigi.2018; 3(2).
- 65.- Indriani L, Dharmautama M. Antimicrobial test of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) ethanol extract againts Porphyromonas gingivalis and Streptococcus sanguis using agar curmethod (*In vitro* study). J Dentomaxillofac Sci.2016; 2(1): 287-293.
66. - Coello S, Garcia J. Desarrollo de una bebida refrescante a base de la flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) níspero (*Eriobotrya japonica*) y evaluación de la actividad antioxidantes. Guayaquil.2021.
- 67.- Baena-Santillán ES, Piloni-Martini J, Santos-López EM, Gómez-Aldapa CA, Rangel-Vargas E, Castro-Rosas J. Comparison of the Antimicrobial Activity of *Hibiscus sabdariffa* Calyx Extracts, Six Commercial Types of Mouthwashes, and Chlorhexidine on Oral Pathogenic Bacteria, and the Effect of Hibiscus sabdariffa Extracts and Chlorhexidine on Permeability of the Bacterial Membrane. J Med Food. 2021 Jan;24(1):67-76.
- 68 Padilla L, Neyta K. Efecto antibacterial *in vitro* del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa* en *Streptococcus mutans*. (Tesis Doctoral). Repositorio Alicia. 2022.
- 69 Unita L, Signarimbun E. Efek antibakteri ekstrak kelopak bunga rosella terhadap jumlah kilo ni *Streptococcus sp*. Laporan penelitian. 2018; 1(2): 112-34.



- 70.- Sulistyani H, Fujita M, Miyakawa H, Nakazawa F. Effect of roselle calyx extract on *in vitro* viability and biofilm formation ability of oral pathogenic bacteria. JMBFS.2016; 9(2):119-124.
- 71.- Abdallah EM. Antibacterial efficiency of the Sudanese Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), a famous beverage from Sudanese folk medicine. J Intercult Ethnopharmacol. 2016 Mar 24; 5(2):186-90.
72. - Aucinaite, R., Nedzinskiene, E., Peciuliene, V., & Dumbryte, I. The Antimicrobial Efficacy of Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine in Gutta-Percha Cone Decontamination: A Systematic Review. Materials. 2020; 18(7), 1539.
73. - Jagyasi DR, Chandwani ND, Gunwal MK, Ranka AS. Antimicrobial efficacy of acacia Nilotica (Babul) extract and its effectiveness in disinfecting gutta percha cones - An *in vitro* study. Indian J Dent Res. 2021; 32(2):221-225.
- 74.- Vanapatla A, Nanda N, Satyarth S, Kawle S, Gawande HP, Gupte JM. Antibacterial Efficacy of Herbal Solutions in Disinfecting Gutta Percha Cones against *Enterococcus Faecalis*. J Pharm Bioallied Sci. 2022; 14(Suppl 1):S748-S752.
- 75.- Jain A, Lavania A, Sharma N, Goenka S, Mankeliya S, Bansal S, Makkad RS. Effectiveness of photosensitized curcumin fibers, aloe vera, amla juice and panchatuli in disinfecting guttapercha cones. Bioinformation. 2024 Jun; 20(6):620-624.
- 76- Pauletto G, Guerim PHF, Barbosa AB, Lopes LQS, Bier CAS, Markezan PK. Efficacy of calcium hypochlorite in disinfection of gutta-percha cones contaminated with *Candida albicans*. Braz J Microbiol. 2024; 55(1):403-410.
- 77.- Hassan S, Berchová K, Šudomová M. Antimicrobial, antiparasitic and anticancer properties of *Hibiscus sabdariffa* (L.) and its phytochemicals: *in vitro* and *in vivo* studies. Ceska Slov Farm. 2016; 65(1):10-14.
- 78.-Mohamed E. Antibacterial efficiency of the Sudanese Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), a famous beverage from Sudanese folk medicine. J Intercult Ethnopharmacol. 2016; 5(2):186-190.
79. - Chandra B, Nagarajappa R, Suma S, Thakur R. Herbal extracts in oral health care - A review of the current scenario and its future needs. Pharmacogn Rev. 2015; 9(18):87-92.

80. - Riwandy A, Aspriyanto D, Budiarti L. Aktivitas ekstrak air kelopak bunga rosella (*Hibiscus 518 sabdariffa* L.) terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans in vitro*. Dentino Jur Ked Gigi.2014; 2(1):60-64.
81. - Chandrashekar B, Nagarajappa R, Singh R, Thakur R. An *in vitro* study on the antimicrobial efficacy of ten herbal extracts on primary plaque colonizers. J Young Pharm.2014; 6(4)
82. - Naa Agowa P. Antimicrobial activity of *Hibiscus sabdariffa* against clinical isolates of bacteria. Acra-Ghana. 2014.
- 83.- Morales M, Hernandez J, Leiva G, Salinas Y, Soto L y Elencoro J. Influence of variety and extraction solvent on antibacterial activity of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyces. J. Med Plantas Res. 2013; 7 (31): 2319-2322.
79. - Maciel M, Pinto M, Chaves H, Wiest J. Avaliação do extrato alcoólico de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) como fator de proteção antibacteriana e antioxidante. Rev Inst Adolfo Lutz. 2012; 71(3):462-470.
80. - Afolabi O, Ogunsola F, Coker A. Suceptibility of cariogenic *Streptococcus mutans* to extracts of *Garcinia kola*, *Hibiscus sabdariffa* and *Solanum Americanum*. West Afr J Med.2008; 27(4):230-233.
- 84.- Abranches J, Zeng L, Kajfasz JK, Palmer SR, Chakraborty B, Wen ZT, et al. Biology of Oral Streptococci. Microbiol Spectr. 2018; 6(5):1–12.
- 85.-Clark T. *Streptococcus mutans* and dental caries. Br Med J. 1975; 4: 647.
86. - Paizaraman J, Rios T. *In vitro* inhibitory effect of *Stevia Rebaudiana* ethanolic extract on the cariogenic virulence factors of *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Agroind. Sci.2020; 10(1):95-102.
87. - Ojeda J, Oviedo E, Salas E. *Streptococcus mutans* y caries dental. Rev. CES Odont. 2013; 26(1):44-56.
89. - Bowen W, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. Caries Res. 2011; 45(1):69-86.

90. - Matsumoto-Nakano M. Role of *Streptococcus mutans* surface proteins for biofilm formation. Jpn Dent Sci Rev.2018; 54(1):22–29.
- 87.-Basso ML. Conceptos actualizados en cariólogía. Rev Asoc Odontol Argent.2019; 107:25-32.
- 88.- Teles AM, Pina C, Cardoso IL, Tramontana A, Cardoso M, Duarte AS, Bartolomeu M, Noites R. Degree of Contamination of Gutta-Percha Points by *Staphylococcus aureus* (MRSA/MSSA) Strains. Int J Mol Sci. 2024 Aug 6; 25(16):8566.
- 89 Hernandez R, Fernandez C, Baptista M. Metodología de la investigación. 6ta ed. Mexico: McGraw-Hill/Interamericana; 2014.
- 90 Veiga J, Fuente E, Zimmermann M. Modelos de estudios en investigación aplicada: conceptos y criterios para el diseño. Med Segur Trab. 2008; 54(210):81–88.
91. Benoit MR, Conant CG, Ionescu-Zanetti C, Schwartz M, Martin A. New device for high-throughput viability screening of flow biofilms. Appl Environ Microbiol. 2010; 76:4136-4142.
92. Bou-Abdallah, F. Microcalorimetry in the BioSciences - Principles and applications. Biochim Biophys Acta. 2016; 1860: 859-860.
93. Braissant O, Theron G, Barnard, M, Friedrich SO, Diacon A., Bonkat G. Comparison of isothermal microcalorimetry and BACTEC MGIT960 for detection of the metabolic activity of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples. J Appl Microbiol. 2020; 128:1497-1502.
94. Brennan-Krohn T, Kirby J.E. Antimicrobial Synergy Testing by the inkjet printer-assisted automated checkerboard array and the manual time-kill method. J Vis Exp. 2019; 176:139-148.
95. Brennan-Krohn T, Truelson, KA, Smith KP, Kirby JE. Screening for synergistic activity of antimicrobial combinations against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* using inkjet printer-based technology. J Antimicrob Chemother. 2017; 72:2775-2781.
96. Cai Y, Fan Y, Wang R, An MM, Liang BB. Synergistic effects of aminoglycosides and fosfomicin on *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and biofilm infections in a rat model. J Antimicrob Chemother. 2009; 64:563-566.

97. Chiaraviglio L, Kirby JE. High-throughput intracellular antimicrobial susceptibility testing of *Legionella pneumophila*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59:7517-7529.
98. Díez-Aguilar M, Morosini M I, Köksal E, Oliver A, Ekkelenkamp M, Cantón R. Use of Calgary and microfluidic BioFlux systems to test the activity of fosfomycin and tobramycin alone and in combination against cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018; 62(1):e01650-17.
99. Foucquier J, Guedj M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacol Res Perspect*. 2015; 3:e00149.
- 100 Coello S, Garcia J. Desarrollo de una bebida refrescante a base de la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) níspero (*Eriobotrya japonica*) y evaluación de la actividad antioxidantes. Guayaquil.2021.
- 101 Nidhal Salem, Sarra Kefi, Olfa Tabben, Ameni Ayed, Slim Jallouli, Nedra Feres, *et al*. Variation in chemical composition of *Eucalyptus globulus* essential oil under phenological stages and evidence synergism with antimicrobial standards. *Ind Crops Prod*. 2018; 124:115–25.
- 102 Ojulari O, Lee S, Nam J. Beneficial Effects of Natural Bioactive Compounds from *Hibiscus sabdariffa* L. On obesity. *Molecules*. 2019; 24(1):1–14.
- 103 Silva E, Santana R, Silva N, Abreu L, Melo A, Sabino M, *et al*. Evidências do uso de fitoterápicos na odontologia: Uma revisão de literatura. *Res Soc Dev*. 2021; 10(10).
- 104 Pimentel E, Castillo D, Quintana M, Maurtua D, Villegas L, Díaz C. Efecto antibacteriano de extractos etanólicos de plantas utilizadas en la tradiciones culinarias andinas sobre microorganismos de la cavidad bucal. *Rev Estomatológica Hered*. 2016; 25(4):268.

## XII ANEXOS

### 12.1 Dictamen comité de ética



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
Instituto de Ciencias de la Salud  
*School of Medical Sciences*  
Coordinación de Investigación  
*Area of Research*

San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo a 6 de febrero de 2024

Oficio Comitéci.icsa /CSa n°237n / 2024

Asunto: DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA E INVESTIGACIÓN.

Cano Silva Olga Lidia  
Investigador Principal  
Correo: olcanosilva@gmail.com

#### PRESENTE

**Título del Proyecto:** Efecto antibacteriano de los extractos de cálices de Hibiscus sabdariffa en Enterococcus faecalis y Streptococcus sanguinis en un modelo in vitro en puntas de gutapercha.

Le informamos que su proyecto de referencia ha sido evaluado por el Comité de Ética e Investigación del Instituto de Ciencias de la Salud y las opiniones acerca de los documentos presentados se encuentran a continuación:

Decisión
«Aprobado»

Este protocolo tiene vigencia del 6 de febrero de 2024 al 6 de febrero de 2025.

En caso de requerir una ampliación, le rogamos tenga en cuenta que deberá enviar al Comité un reporte de progreso de avance de su proyecto al menos 60 días antes de la fecha de término de su vigencia.

Le rogamos atender las indicaciones realizadas por el revisor, y enviar nuevamente una versión corregida de su protocolo para una nueva evaluación.

Atentamente

Dra. Itzia María Cazares Palacios  
Presidenta del Comité



Para la validación de este documento informe el siguiente código en la sección  
Validador de Documentos del sitio web oficial del Comité: «[EIA/gwEV](#)»



## LISTA DE COTEJO

### Instrucciones:

A continuación, encontrará un listado de los diferentes elementos a evaluar en un protocolo de investigación. Para cada ítem, identifique y seleccione si el elemento se encuentra presente o no. Si tiene alguna observación final, al término de este documento encontrará un espacio donde colocarlo.

- - - - -

Fecha de evaluación: martes, 30 de enero de 2024

Identificación del proyecto	
Título	Efecto antibacteriano de los extractos de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i> en <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Streptococcus sanguinis</i> en un modelo <i>in vitro</i> en purtas de quitarricha.

Elementos metodológicos				
		Si	No	N/A
1	La justificación de la investigación está basada en la revisión actualizada y establece la pertinencia del proyecto.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2	El objetivo de la investigación es claro y factible.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3	La pregunta de investigación es relevante desde el punto de vista científico.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4	Hay una coherencia entre la pregunta de investigación y el diseño de la investigación.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5	Los métodos y técnicas planteados son adecuados para conseguir el objetivo de la investigación.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6	Las técnicas de análisis propuestas son adecuadas para el manejo de los datos.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Participación de seres humanos en el estudio				
		Si	No	N/A
7	En el caso de que se requiera el reclutamiento de participantes, existe una descripción clara del procedimiento para reclutarlos.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
8	Se incluye la ponderación de beneficios y riesgos para los intereses individuales o de la comunidad.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
9	Se incluye el compromiso de respetar la integridad, la	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>



Circuito ex-Hacienda La Concepción s/n  
 Carretera Pachuca Actopan, San Agustín  
 Tlaxiaca, Hidalgo, México. C.P. 42160  
 Teléfono: 52 (777) 71 720 00 Ext. 4306  
 investigacion\_icsha@uaeh.edu.mx

[www.uaeh.edu.mx](http://www.uaeh.edu.mx)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
 Instituto de Ciencias de la Salud  
 School of Medical Sciences  
 Coordinación de Investigación  
 Area of Research

dignidad y la autonomía de los participantes.				
10	Se incluye una presentación adecuada del consentimiento informado.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
11	Se incluye un procedimiento adecuado de protección de datos.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
12	Se incluye un procedimiento apropiado para el reporte de eventos adversos.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
13	Se incluyen los posibles riesgos o daños a los participantes.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
<b>Manejo de animales de experimentación</b>				
		<b>Si</b>	<b>No</b>	<b>N/A</b>
14	Se describen las condiciones para el alojamiento de los animales.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
15	Se describen las condiciones para la alimentación y provisión de agua.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
16	Se describen las técnicas de analgesia y anestesia que se llevarán a cabo en los animales cuando sean sometidos a procedimientos que puedan causar dolor o molestia a los mismos.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
17	Se describen las técnicas de eutanasia que serán empleadas en la investigación.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

<b>Comentarios adicionales</b>
Es una investigación interesante, que puede contribuir en la búsqueda de sustancias lrigantes y desinfectantes a partir de cálices de Jamaica y cumple con los elementos para que se pueda llevar a cabo. Sólo se sugiere incluir información del manejo de los residuos peligrosos biológico-infecciosos (RPBI) al final de los experimentos, de acuerdo con normas oficiales.

<b>Dictamen recomendado</b>		
<input checked="" type="checkbox"/> Aprobado	<input type="checkbox"/> Aprobado con modificaciones	<input type="checkbox"/> Rechazado



Circuito ex-Hacienda La Concepción s/n  
 Carretera Pachuca Actopan, San Agustín  
 Tlaxiaca, Hidalgo, México. C.P. 42160  
 Teléfono: 52 (777) 71 720 00 Ext. 4306  
 investigacion\_icss@uaeh.edu.mx

[www.uaeh.edu.mx](http://www.uaeh.edu.mx)