

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

E. A. P DE ODONTOLOGÍA

Efectividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Minthostachys mollis* griseb (muña) sobre bacterias prevalentes en patologías periapicales crónicas de origen endodóntico

TESIS

para obtener el título de Cirujano Dentista

AUTOR

Isaac Lito Azaña Espinoza

Lima- Perú

2010

JURADO DE SUSTENTACION

Presidente : Mg. C.D. Doris Elizabeth Salcedo Moncada
Miembro : Felipe Enrique Lozano Castro
Miembro Asesor : Blg^a. Elba Estefanía Martínez Cadillo

Dedicatoria

*A Dios, por regalarme el milagro de la vida y
ser mi maestro ante cualquier circunstancia.*

*A mi querida familia: Guillermo, Martha,
Dany y Karina por todo su amor, esfuerzo y
apoyarme en cada momento de mi vida.*

*A mis queridas sobrinas: Daniela y
Alexandra que a pesar de la distancia las
tengo presente en mi corazón*

*A Verónica por su amistad, su paciencia, su
confianza y apoyo incondicional*

AGRADECIMIENTOS

- Al Vicerrectorado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y al Instituto de Investigación Estomatológica por financiar la ejecución de este proyecto de investigación.
- A mi asesora, la Blga. Elba Martínez Cadillo, docente del Dpto. de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por sus conocimientos, apoyo, gran colaboración y sobre todo su amistad; sin los cuales no se hubiera podido realizar este trabajo.
- Al Mg. Fritz Choquesillo Peña y al Dr. Américo Castro Luna, docentes de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Mayor de San Marcos, por su desinteresada colaboración en la obtención del aceite esencial de la planta medicinal.
- A la Mg. Hilda Moromi Nakata, docente del Dpto. de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por su valiosa colaboración y orientación durante la ejecución del proyecto.
- Al Mg. Manuel Mattos, docente del Dpto. de Odontología Biosocial de la Facultad de Odontología de la UNMSM por su colaboración y su apoyo en la elaboración de la parte metodológica y estadística.
- Al personal del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la UNMSM, por su colaboración y paciencia durante la ejecución del proyecto.
- A cada uno de mis amigos, por andar juntos los años de estudios universitarios y estar conmigo.

INDICE DEL CONTENIDO

I.	INTRODUCCION.....	1
II.	MARCO TEORICO	
	2.1 ANTECEDENTES.....	3
	2.2 BASES TEÓRICAS	
	2.2.1 Características generales de las lesiones periapicales.....	7
	2.2.2 Microbiología endodóntica de las lesiones periapicales.....	15
	2.2.3 Microorganismos prevalentes en patologías periapicales.....	22
	2.2.4 Medicación intraconductos.....	32
	2.2.5 Plantas medicinales.....	38
	2.2.6 <i>Minthostachys mollis</i>	45
	2.2.7 Pruebas de susceptibilidad microbiana.....	53
	2.2.8 Evaluación de la susceptibilidad microbiana.....	57
	2.3 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS.....	58
	2.4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	59
	2.4.1 Delimitación del problema.....	60
	2.4.2 Formulación del problema.....	61
	2.5 JUSTIFICACIÓN.....	61
	2.6 OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN.....	63
	2.7 HIPÓTESIS.....	64

III. MATERIALES Y METODOS	
3.1 TIPO DE ESTUDIO.....	65
3.2 POBLACION Y MUESTRA.....	66
3.3 OPERACIONALIZACION DE VARIABLES.....	68
3.4 MATERIALES.....	70
3.5 METODOS.....	72
3.5.1 Procedimientos y Técnicas.....	72
3.5.2 Recolección de Datos.....	81
IV. RESULTADOS.....	83
V. DISCUSION.....	122
VI. CONCLUSIONES.....	127
VII. RECOMENDACIONES.....	129
RESUMEN.....	130
SUMMARY.....	131
REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....	132
ANEXOS	
Lista de cuadros y gráficos.....	147
ANEXOS 2	
Ficha de recolección de datos.....	150
ANEXOS 3	
Certificación taxonômica de <i>M. mollis</i>.....	151
FOTOGRAFIAS.....	152

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue determinar la efectividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb “Muña” tanto cuantitativamente como cualitativamente, mediante el método de difusión en agar con disco, frente a tres cepas de bacterias prevalentes de patogénesis periapical crónica: *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, *Prevotella melaninogénica* ATCC 25845, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y muestras de conducto radicular con Periodontitis Apical Crónica. Se obtuvo el aceite esencial de principios activos totales de las hojas secas, talluelos y flores de la planta mediante arrastre por vapor de agua. Posteriormente, el aceite se diluyó en alcohol etílico al 70° en las concentraciones de 25% y 50%. Estas diluciones, junto a la dilución pura, fueron comparadas con Paramonoclorofenol alcanforado como control positivo y con alcohol etílico al 70°, como control negativo. Al realizar las pruebas de sensibilidad *in vitro* se obtuvieron los siguientes resultados: el aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” puro y en sus diluciones presentó efectividad antibacteriana tanto cuantitativamente como cualitativamente mayor al alcohol etílico al 70° y menor al Paramonoclorofenol alcanforado frente a las muestras bacterianas en estudio

SUMMARY

The aim of this investigation was to determine the effectiveness in vitro antibacterial essential oil of *Minthostachys mollis* Griseb "Muña" both quantitatively and qualitatively by agar diffusion method with hard, against three strains of bacteria prevalent chronic periapical pathogenesis: *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, *Prevotella melaninogénica* ATCC 25845, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and root canal samples with chronic apical periodontitis. Essential oil was obtained from total active dry leaves, damping off and flowers of the plant by water vapor drag. Subsequently, the oil was diluted in ethyl alcohol at 70 ° in concentrations of 25% and 50%. These dilutions, along with pure dilution were compared with camphorated paramonochlorophenol as positive control and ethyl alcohol 70 °, as negative control. In conducting in vitro susceptibility testing yielded the following results: *Minthostachys mollis* essential oil "muña" pure and their dilutions presented antibacterial effectiveness both quantitatively and qualitatively greater than ethyl alcohol 70° and less than off camphorated paramonochlorophenol against samples study bacterial

I. INTRODUCCION

En nuestros días, gran parte de tratamientos que se realizan en la práctica odontológica son casos relacionados a patologías que afectan a la pulpa y a la región periapical. Conforme avanza la inflamación pulpar va aumentando la destrucción de la pulpa hasta que finalmente se necrosa. Las sustancias irritantes salen del conducto radicular hacia los tejidos perirradiculares iniciando lesiones diversas.

Los avances técnicos y científicos han hecho de la terapia de conductos radiculares un procedimiento confiable y con pronósticos favorables. El objetivo es la remoción completa de estos agentes biológicos y sus subproductos, esto es logrado por medio del uso de distintas técnicas (instrumentación, irrigantes endodónticos, medicación intracanal y obturación). Sin embargo, a pesar del avance de las técnicas del tratamiento, existen ciertas ocasiones en que se experimentan agudizaciones entre citas o reagudizaciones en tratamientos endodónticos finalizados.

La dinámica de las infecciones del sistema de conductos radiculares han sido bien estudiadas a lo largo del tiempo. A mediados del siglo XX, los estudios realizados demostraban una mayor presencia de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos, pues para ese entonces no existían medios adecuados para la identificación de microorganismos anaerobios. Recientemente, el desarrollo de nuevas técnicas de cultivo e identificación de microorganismos, han realizado considerables progresos con respecto a la etiopatogénesis de las infecciones endodónticas, demostrando la naturaleza polimicrobiana de ésta, así como la prevalencia de microorganismos

anaerobios estrictos, entre los que destacan los géneros *Porphyromona*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, entre otros. Actualmente las investigaciones concerniente al sistema de conductos radiculares refieren la prevalencia, junto a los microorganismos anaerobios estrictos, de un microorganismo facultativo, *E. faecalis*, responsable de la sintomatología persistente.

En la actualidad se está investigando ampliamente el uso de nuevas alternativas a los antibióticos convencionales. Actualmente se encuentra en boga el uso de plantas medicinales, a manera de medicina alternativa para tratar diversas dolencias, claro está que este tipo de tratamiento se remonta a la época precolombina puesto que nuestros antepasados hacían uso de éstas para aliviar sus dolencias, motivo por el cual se hace necesario rescatar estos recursos en beneficio de nuestra población.

La "Muña" es una planta que en la sierra del Perú tiene múltiples usos: como condimento, para repeler insectos de los cultivos, proteger las cosechas de la putrefacción, aliviar malestares gastrointestinales, en tratamiento de tumores, inflamaciones, asma, halitosis, entre otros.

En el presente estudio se investiga la efectividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* "muña" en distintas diluciones frente a bacterias relacionadas con la etiología y desarrollo de patologías periapicales crónicas de origen endodóntico; siendo éste un estudio pionero, para lo cual las ciencias básicas colaboran con el odontólogo para obtener conocimientos de las propiedades curativas de las plantas en la especialidad endodóntica.

II. MARCO TEORICO

2.1 ANTECEDENTES

- **Contreras (1983)** estudió la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis*, demostrando cualitativamente su efecto antimicrobiano frente a *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi* y *E. coli*, resultando *Shigella dysenteriae* la mas sensible al aceite esencial de “Muña”.¹
- **Munares (1983)** demostró que el aceite esencial de *M. mollis* (muña), aplicado bajo su forma volátil al 0.50 % de emulsión posee efecto inhibitorio sobre hongos (*Phithoptatora intenstans*, *Fusarium solani*) y bacterias (*Pseudomans solanacéarum* y *rwira caratovora* var. *caretorava*) patógenas de la papa, a diferencia de los testigos que si mostraron desarrollo normal.²
- **Salmón (1994)** estudió los aspectos fitoquímicos, toxicológicos, antimicrobianos y bromatológicos de *Minthostachys mollis*. No obtuvo halos de inhibición a ninguna concentración y en ninguna cepa. (*Candida albicans* ATCC 10231, *Eschenchia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) por lo que no pudo determinar fehacientemente su actividad antimicrobiana. Ni fungicida.³
- **Poblete (1998)** demostró que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” tiene efecto contra *Phytophthora infestans*, *Fusarium solanaceum* y *Erwinea carotovora* que son patógenos de la papa.⁴

- **Inga y Guerra (2000)** demostraron mediante un estudio las propiedades bactericidas / bacterostáticas del aceite esencial de *Minthostachys mollis* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *B. cereus* MC, *Salmonella typhi*, *S. sonnei* MC, *Escherichia coli* ATCC. 25922 y *K. pneumoniae* ATCC 10031. Además de la acción fungistático / fungicida para *Fusarium moniliforme* y *Aspergillus Níger*.⁵
- **Fuertes y Munguía (2001)** realizaron un estudio comparativo del aceite esencial de *M. mollis* (Kunth) Griseb “muña” de tres regiones peruanas: Tarma, Huaraz y Huancavelica (utilizando ensayos físicos, espectro ultravioleta, espectro infrarrojo y composición química), concluyendo que el aceite esencial proveniente de Tarma contenía en su composición 1-Tetradeceno, 2s-Transmetona, Pulegona como componentes principales y un porcentaje importante de Timol, demostrando así que el aceite extraído de ese lugar tiene mejores condiciones que el aceite de los otros dos lugares.⁶
- **Primo y col. (2001)** estudiaron a *Minthostachys verticillata* "Peperina", observándose buena actividad antibacteriana contra *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli*, *P. Mirabillis* y *antiviral* contra el virus Herpes Simplex Tipo 1 y el virus de la Pseudorrabia, aunque con escasa actividad contra *P. aeruginosa*.⁷
- **Bravo y col (2004)** realizaron una investigación para estudiar la presencia de Flavonoides en *Minthostachys mollis* “muña” y *Lepechinia millerii* (Walp) Epling y la actividad antimicrobiana de sus

extractos frente a cepas de *E. coli* y *S. aureus*. Concluyendo que *Minthostachys mollis* si contiene flavonoides y que presenta actividad antibacteriana como consecuencia de la presencia de aquellos.⁸

- **Palacios y col (2004)** evaluaron la capacidad bactericida in vitro de preparados a base de *Minthostachys mollis* y agua destilada a varias concentraciones (2, 4, 6 y 8 gr.), frente a Streptococos bucales. Encontrando muy poca efectividad antibacteriana.⁹
- **Días (2005)** determinó la efectividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña”, frente a cepas estándares ATCC de *S. mutans*, *Lactobacillus sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actinimicetencomitans* y *Actinomices sp.*; teniendo a la Amoxicilina y agua como controles positivo y negativo, respectivamente. Concluyendo que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” tiene actividad antibacteriana con un promedio de 16.75 mm. de diámetro de halo.¹⁰
- **Chica y col (2006)** estudiaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” en diferentes concentraciones (3.5 a 100 ug/ml. y puro), frente a un grupo de bacterias patógenas propias de la papa (*Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae*, *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides* y *Alternaria alternate*), utilizando oxitetraciclina y Acrobat® como controles. Se encontró sensibilidad de todas las bacterias frente al

aceite esencial y se halló una relación directamente proporcional entre la concentración y el tamaño de la inhibición. También se determinó la composición química del aceite esencial mediante Cromatografía de gases detallando la presencia de carvacril acetato, carvacrol, pulegona y mentona. Se atribuyó su actividad antimicrobiana a su modo de acción en la célula. ¹¹

- **Cano (2007)** realizó un estudio para demostrar la actividad antimicótica *in vitro* del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña”, proveniente del distrito de Huacrapuquio, provincia de Tarma. Se observó un alto efecto antimicótico frente a cepas de *Cándida albicans* a las concentraciones de 50 y 100 por ciento y dermatofitos *Trichophytun tonsurans*, *Trichophytun mentagophytus*, *Microsporun canis* sensibles en los volúmenes de 5 y 50mL; encontrándose en el aceite esencial los siguientes componentes químicos: Pulegona, mentona y limoneno. ¹²
- **Guiza y Rincón (2007)** evaluaron el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” en combinación con inactivación térmica sobre cepas de *Bacillus cereus* y *Listenia monocytogenes*. No encontrando efecto antibacteriano sobre dichas cepas, atribuyendo esto último a la ausencia de ciertos componentes en la estructura química del aceite. ¹³

- **Mora y col. (2009)** examinaron y analizaron los componentes químicos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb var Vaught. recogidos en enero de 2008 en la localidad de Tuñame, estado de Trujillo, Venezuela, fueron separados e identificados por el análisis de cromatografía de gases y espectrometría de masas. El aceite esencial se obtiene por hidrodestilación y trece componentes (98,5% de la muestra) fueron identificados por comparación. Los dos componentes principales son pulegona (55,2%) y trans-mentona (31,5%). El aceite esencial mostró un efecto inhibitorio significativo contra bacterias Gram (+) y Gram (-), especialmente *Bacillus subtilis* y *Salmonella typhi* (4 µg/ml).¹⁴

2.2 BASES TEORICAS

2.2.1 Características Generales de las Lesiones Periapicales

2.2.1.1 Espacio Periapical

La región periapical tiene una casi ilimitada fuente de células indiferenciadas que pueden participar en el proceso inflamatorio, así como también en el proceso reparativo.¹⁵⁻¹⁷

Los tejidos periapicales son también ricos en suplemento sanguíneo colateral y drenaje linfático, esto lo diferencia de los tejidos pulpares. También estas características le permiten, a los tejidos periapicales, contrarrestar los elementos destructivos relacionados con los irritantes de los conductos y de la inflamación resultante.¹⁵⁻¹⁷

2.2.1.2 Patogénesis de las lesiones periapicales

Las lesiones periapicales pueden ser consideradas lesiones infecciosas endógenas multifactoriales, con el huésped que juega un rol significativo en el proceso inflamatorio. El egreso de microorganismos, sus derivados, y los tejidos alterados de los canales radiculares hacia los tejidos periradiculares pueden iniciar la formación y/o perpetuación de estas lesiones.¹⁸⁻²¹

Dependiendo de la fase de desarrollo, una evaluación de estas lesiones revela numerosas células inflamatorias como neutrófilos polimorfonucleares (PMN), macrófagos, linfocitos, células plasmáticas, células mastoides, basófilos, y eosinófilos.²² Una interacción entre los irritantes exógenos y estas células defensivas del hospedador, pueden producir una expulsión de varios mediadores químicos endógenos como neuropéptidos, péptidos fibrinolíticos, péptidos, quininas, fragmentos del complemento, aminas vasoactivas, enzimas lisosomales, citoquinas y mediadores de reacciones inmunológicas.^{21,23}

Una de las características más relevantes del desarrollo de las lesiones periapicales es la resorción ósea, aunque el proceso patogénico aún no ha sido muy bien establecido.^{21,24} Sin embargo, se conoce que dicha resorción está relacionada estrechamente a células inflamatorias tales como PMN, linfocitos B y T, macrófagos y células plasmáticas. Esto se evidencia toda vez que estas células producen citoquinas implicadas en el desarrollo de estas lesiones, como IL-1 α , IL-1 β y factores de necrosis tumoral (FNT).

La IL-1 β es reconocida como la citoquina más potente, la IL-1 α extiende las lesiones y el FNT- α también participa en la resorción ósea. Este último,

junto con la IL-1 β , estimula la IL-6, que posee características similares. Se sabe, además, que las células que rodean al hueso reabsorvido no son del tipo óseo, sino histológica e inmunohistoquímicamente similares a los macrófagos.²⁵

Los macrófagos han atraído gran atención en estudios recientes debido a su capacidad para producir citoquinas como IL-1 β y FNT, que son estimuladores potentes de la resorción ósea y porque los estudios determinan que estas son las células más predominantes en las lesiones periapicales.^{24,26} Además se ha encontrado que los macrófagos refuerzan la proliferación de los fibroblastos, pero cuando estos son estimulados por el LPS de las bacterias gramnegativas, se vuelven supresores de los fibroblastos, y esto puede retrasar los procesos regenerativos de la lesión por largos periodos de tiempo, incluso mantenerse luego que los agentes infecciosos han sido eliminados con el tratamiento de conductos.²⁶ Se han encontrado que los neutrófilos PMN producen IL-1, lo cual podría ser muy importante, ya que estas son una de las células más prevalentes en las lesiones.¹⁸ Otro rasgo importante es que los osteoblastos poseen receptores para estas citoquinas resorptivas y pueden regular su inactivación y/o su función.²⁷

Las prostaglandinas (PGE2 y PGI2), que son metabolitos del ácido araquidónico vía la ciclooxigenasa, están también involucradas en la periodontitis apical aguda, y su fuente principal son los macrófagos que están estrechamente relacionados con la resorción ósea.^{23,27} El papel de las prostaglandinas producidas por fibroblastos aún no se ha determinado, pero parecen estar relacionadas al desarrollo de las lesiones periapicales.^{19,28}

La presencia de diferentes clases de inmunoglobulinas y de varios tipos de células inmunocompetentes en las lesiones periapicales también han sido reportados.^{21,23} Existe además la evidencia que el colágeno de tipos I, III, IV, y V están presentes en las lesiones periapicales caracterizadas por la proliferación de fibroblastos.²⁹ Se encontró además que el colágeno es la proteína más destruida durante el curso de la periodontitis apical debido a las enzimas colagenolíticas provenientes de microorganismos y colagenasas humanas.³⁰ Radiográficamente estas lesiones aparecen como imágenes radiolúcidas que rodean el foramen apical y/o los conductos laterales.

2.2.1.3 Clasificación de las Lesiones Periapicales

Las lesiones periapicales de origen pulpar son clasificadas sobre la base de descubrimientos clínicos e histopatológicos. Esta selección comprende periodontitis apical aguda, periodontitis apical crónica, absceso apical agudo y absceso apical crónico.^{31,32}

Las lesiones agudas son aquellas que presentan dolor y los signos más serios, y las lesiones crónicas son aquellas que no tienen sintomatología relevante. Es evidente que en el tratamiento de estas lesiones, el factor más importante es la medicación antibacteriana.

Periodontitis Apical Aguda (Sintomática)

Es una inflamación circunscrita del ligamento periodontal en la región apical. Las principales causas son irritantes que se difunden desde una pulpa inflamada o necrótica, la salida de irritantes como bacterias, toxinas

bacterianas, medicamentos desinfectantes, residuos empujados hacia los tejidos periapicales o irritación física de los tejidos periodontales puede ocasionar periodontitis apical sintomática. ^{31,33}

La sensibilidad a la percusión es la principal característica clínica, el dolor varía desde la hipersensibilidad leve hasta el dolor intenso. La liberación de los mediadores de la inflamación ocasiona degradación del ligamento periodontal y resorción del hueso alveolar. ³¹

Periodontitis Apical Crónica (Asintomática)

Puede ir precedida de Periodontitis apical sintomática o Absceso apical. Sin embargo, la lesión a menudo se desarrolla y crece sin signos y síntomas subjetivos. El tratamiento inadecuado de conductos radiculares también origina el desarrollo de estas lesiones. En general, una pulpa necrótica gradualmente libera agentes nocivos de escasa patogenicidad o en concentraciones bajas que dan origen al desarrollo de una Periodontitis apical asintomática (PAC). Por lo general se acompaña de una resorción ósea perirradicular que es visible en las radiografías. ³¹

El paciente por lo general no refiere dolor importante, y las pruebas revelan dolor mínimo o nulo a la percusión. No obstante, si la Periodontitis apical asintomática perfora la lámina cortical del hueso, la palpación de los tejidos superpuestos ocasionará malestar. El diente asociado tiene una pulpa necrótica y por tanto no responderá estímulos eléctricos o térmicos. ^{32,33}

A la periodontitis apical crónica se le asocia a:

- Granuloma perirradicular: Desde el punto de vista histológica consta predominantemente de tejido inflamatorio de granulación con capilares pequeños, fibroblastos, múltiples fibras de tejido conectivo. Este tejido reemplaza al ligamento periodontal.³¹
- Quiste perirradicular: Histológicamente es una cavidad central, revestida de epitelio escamoso estratificado. La luz del quiste contiene un líquido pálido eosinófilo y en ocasiones algunos residuos celulares.³¹

Absceso Apical

Es una concentración circunscrita de pus en una cavidad formada por la desintegración de los tejidos. Según el grado de formación y excreción de exudado, la intensidad del dolor y la presencia o ausencia de signos y síntomas generales, los abscesos pueden dividirse en:^{31,32}

- Absceso apical sintomático: Es un proceso inflamatorio en los tejidos perirradiculares de los dientes, que se acompaña de la formación de exudado dentro de la lesión. Una causa frecuente es una afluencia rápida de microorganismos, o sus productos, desde el sistema de conductos radiculares. El paciente puede o no mostrar tumefacción que puede ser localizada o difusa. Al examen clínico el diente revela diversos grados de sensibilidad a la percusión y a la palpación. No existe reacción al frío, el calor o los estímulos eléctricos, ya que la pulpa del diente afectado está necrosada.^{31,32}

La diseminación de la respuesta inflamatoria hacia el hueso esponjoso ocasiona resorción ósea apical. Debido a la presión causada por la

acumulación de exudado dentro de los tejidos limitantes, el dolor es intenso. Con mayor frecuencia la tumefacción permanece localizada, aunque puede tornarse difusa y diseminarse de forma amplia (celulitis).

33

El lugar del área de la tumefacción es determinado por la relación del ápice del diente afectado con las inserciones musculares. El proceso de supuración busca líneas de menor resistencia, y con el tiempo perfora la placa cortical. Cuando llega a los tejidos blandos, la presión sobre el periostio se libera, y por lo general se reducen los síntomas.^{31,32}

- Absceso apical asintomático: Está relacionado con la salida gradual de irritantes del sistema de conductos radiculares hacia los tejidos perirradiculares, y la formación de un exudado. Se asocia con un trayecto fistuloso que drena en forma continua o intermitente. Esto se manifiesta como un estoma sobre la mucosa bucal o, en ocasiones, sobre la piel de la cara. El exudado también puede drenar a través del surco gingival del diente afectado, imitando una lesión periodontal con “bolsa”.^{31,33} Si se obstruye el trayecto de la fístula, se producirá diversos grados de dolor. Al examen clínico se presentará sensibilidad a la percusión y a la palpación, dependiendo si la fístula está abierta y drenando o cerrada.^{31,33} Las pruebas de vitalidad son negativas, debido a que las pulpas están necrosadas. Al examen radiográfico revelará pérdida ósea a nivel del ápice del diente afectado. Estos trayectos fistulosos, tengan o no revestimiento, se resuelven tras el tratamiento del conducto radicular, con el que se elimina la causa.^{31,32}

CUADRO 1. CLASIFICACIÓN DE LAS LESIONES PERIAPICALES ³¹⁻³³

	PERIODONTITIS APICAL AGUDA (PAA)	PERIODONTITIS APICAL CRÓNICA (PAC)	ABSCESO APICAL AGUDO (AAA)	ABSCESO APICAL CRÓNICO (AAC)
ETIOLOGÍA	Causado por la primera extensión de la infl. en los tejidos periapicales. Pulpitis irreversible o necrosis pulpar.	Consecuencia de necrosis pulpar y generalmente se presenta como una continuación de la PAA.	Resulta cuando egresa un número grande de bacteria a través del ápice y provoca una respuesta infl. severa.	Generalmente asociado una PAC. Este absceso ha perforado a través de la mucosa o incluso la piel como una fístula.
SIGNOS Y SÍNTOMAS	Dolor de leve a severo a diversos estímulos como: frío, caliente, masticación. Existe una respuesta positiva a pruebas de la palpación. Radiográficamente existe un ligero ensanchamiento del espacio periodontal. Generalmente normal.	Generalmente asintomático o con una molestia mínima. Respuesta negativa a estímulos provocados. Un ligero dolor a la prueba de percusión. Radiográficamente es imposible diagnosticar un quiste.	Dolor moderado a severo. Existen manifestaciones sistémicas: temperatura, tumefacción, leucocitosis. Siempre responde a la percusión y palpación. Radiográficamente hay un ensanchamiento del espacio periodontal. Generalmente IRL grande.	Generalmente asintomática, debido a la liberación de la presión establecida por la fístula. El resto de las características clínicas y radiográficas son similares a los de PAC.
CARACT. HISTOLOG.	Presencia de PMN y macrófagos. Existen áreas pequeñas de necrosis de licuefacción y resorción ósea radicular.	Clasificado en quistes y granulomas. El granuloma consiste en tejido granulomatoso infiltrado por células inflamatorias.	Tejidos con necrosis por licuefacción. Exudado purulento. Se observa tejido granulomatoso que rodea la lesión.	Características histopatológicas similares a las de PAC. A veces existen células epiteliales que rodean el tracto fistuloso.
TRATAM.	La remoción de los irritantes locales, el alivio de la oclusión o cualquier terapéutica convencional es conveniente.	La remoción de los irritantes locales y la terapéutica convencional son útiles. El uso de CaOH ₂ también.	La remoción de irritantes, el drenaje, la terapia rutinaria y la medicación antibiótica, son útiles en estos casos.	Un tratamiento endodóntico apropiado siempre alivia los síntomas.

2.2.2 Microbiología Endodóntica de las Lesiones Periapicales

2.2.2.1 Flora Microbiana involucrada en las Lesiones Periapicales

Es necesario tener un conocimiento preciso de la nomenclatura bacteriana, de las especies que tienen un rol importante en el desarrollo de las infecciones radiculares y periapicales. Esto es necesario también para una correcta antibioticoterapia.^{22,34} El siguiente cuadro nos da una visión actual de estos aspectos.

CUADRO 2. BACTERIAS FRECUENTEMENTE AISLADAS EN LESIONES PERIAPICALES CRÓNICAS³⁵

Morfología	Tinción Gram	Anaerobiosis	Género	Especie
Coco	Positiva	Facultativa	<i>Streptococcus</i>	<i>Milleri</i> <i>sanguis</i>
Coco	Positiva	Facultativa	<i>Staphylococcus</i>	<i>Epidermis</i>
Coco	Positiva	Facultativa	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>
Bacilo	Positiva	Facultativa	<i>Actinomyces</i>	<i>israelii</i> <i>naeslundii</i> <i>viscosus</i>
Bacilo	Positiva	Facultativa	<i>Propionibacterium</i>	<i>acnes</i>
Bacilo	Negativa	Facultativa	<i>Pseudomona</i>	<i>aeruginosa</i>
Coco	Positiva	Estricta	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Micros</i>
Coco	Negativa	Estricta	<i>Veillonella</i>	<i>Párvula</i>
Bacilo	Negativa	Estricta	<i>Porphyromonas</i>	<i>Endodontalis</i> <i>gingivalis</i>
Bacilo	Negativa	Estricta	<i>Prevotella</i>	<i>Intermedia</i> <i>melaninogénica</i> <i>oris</i> <i>buccae</i>
Bacilo	Negativa	Estricta	<i>Fusobacterium</i>	<i>nuclatum</i>

Desde un punto de vista teórico, cualquiera de las 300 especies bacterianas que habitan en la cavidad oral, pueden invadir los canales radiculares y participar en el desarrollo de la infección. Sin embargo, el número de aislamientos bacterianos de casos individuales varía de 1 a 12 especies.^{22,36-38} Estas restricciones, posiblemente son debidas a algunos factores ecológicos: influencia del oxígeno, disponibilidad de nutrientes e interacciones bacterianas.^{22,36-39}

Para que un microorganismo pueda establecerse en el sistema de conductos radiculares y consecuentemente participar en la etiopatogenia de las lesiones perirradiculares requiere de ciertas características:⁴⁰

- a. El microorganismo debe presentarse en un número suficiente para iniciar y mantener la lesión perirradicular.
- b. El microorganismo debe poseer una matriz de factores de virulencia, la cual debe expresarse durante la infección del conducto radicular.
- c. El microorganismo debe estar localizado espacialmente en el sistema de conductos radiculares de tal manera que sus factores de virulencia puedan ganar acceso a los tejidos perirradiculares.
- d. El ambiente del sistema de conductos radiculares debe permitir la supervivencia y crecimiento del microorganismo, y proveer señales que estimulen la expresión de virulencia.
- e. Los microorganismos inhibidores deben estar presentes en bajo número o ausentes en el microambiente del sistema de conductos radiculares.

f. El hospedero debe desarrollar una estrategia de defensa a nivel de los tejidos perirradiculares, con la finalidad de inhibir la diseminación de la infección. Este proceso dará como resultado un daño tisular.

En los estadios tempranos de la infección, la cantidad de oxígeno en los canales radiculares es amplia debido a que proviene de la microcirculación de la sangre y de la cavidad expuesta, esto podría explicar la prevalencia de las bacterias facultativas.^{22,36-39} A medida que el tiempo pasa, el potencial de oxidoreducción baja en los canales, debido a la necrosis de los tejidos y el consumo del oxígeno por las bacterias facultativas. Este ambiente es ideal para los anaerobios estrictos.^{22,36-39}

Hay dinámicas especiales relacionadas al consumo de nutrientes que pueden afectar la flora microbiana de los canales radiculares.^{22,36-38,41} En estadios tempranos de la inflamación, existe una baja concentración de carbohidratos provenientes de los fluidos tisulares, estos son rápidamente consumidos por bacterias sacarolíticas que predominan en la flora. En una fase intermedia, los carbohidratos son extraídos de las glucoproteínas y es donde comienza la hidrólisis de las proteínas y la fermentación de los aminoácidos. Hay una transición de la flora de sacarolítica a proteolítica. Luego, las proteínas son el nutriente que más abundan y especies tales como: *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella* y *Porphyromonas* predominan en la flora microbiana. Esta es la razón por la que son aisladas frecuentemente en lesiones de larga duración y lesiones periapicales.^{22,36-39}

2.2.2.2 Presencia y rol de las bacterias en el desarrollo de las lesiones periapicales

En nuestros días, ha sido ampliamente demostrado que las bacterias y sus productos patogénicos, juegan un rol importantísimo en el desarrollo y el mantenimiento de las lesiones pulpares y periapicales. También se sabe que las infecciones de los canales radiculares y los tejidos periapicales son polimicrobianas y que tienen una predominancia de microorganismos anaerobios.^{36,37,42-47}

Invasión bacteriana a la cámara pulpar y los canales radiculares

Los principales caminos por los cuales las bacterias pueden llegar a invadir la cámara pulpar y los canales radiculares son: túbulos dentinarios expuestos, cámara pulpar expuesta, anacoresis periodontal y hematogénica.^{36,48,49}

Las bacterias pueden llegar a los túbulos dentinarios por tres vías: contaminación por saliva de un área expuesta de dentina, adhesión bacteriana sobre un área de dentina expuesta y por un proceso carioso. El diámetro de los túbulos dentinarios es compatible con la mayoría de las especies bacterianas invasoras.³⁶

A pesar de que el proceso de invasión es retardado por la presencia de prolongaciones odontoblásticas, fluido intratubular y fibras colágenas;^{36,50} la desmineralización por una microflora acidogénica y la degradación de la matriz orgánica por bacterias proteolíticas, es casi

inevitable una vez que se ha producido la adhesión y ha sido mantenida por varios días.³⁶ La flora microbiana de lesiones cariosas profundas está compuesta principalmente por bacterias anaerobias.^{36,51} Estas son en su mayoría no móviles, así que la invasión está dada principalmente por la división celular a través de los túbulos. Las fuerzas de masticación también están relacionadas a dar un “empujo” a las bacterias dentro de los túbulos.⁴⁹

Aún antes que las bacterias lleguen a la pulpa dental, sus productos como toxinas, enzimas, ácidos grasos, etc.; vía el fluido dentinal puede llegar a los tejidos e iniciar una respuesta inflamatoria aguda.⁵² Este proceso parece ser que el agente etiológico de la mayoría de los síntomas iniciales agudos.^{36,52}

Una vez que existe una cámara pulpar abierta, miles de especies bacterianas, dentro de las siguientes 48 horas, colonizan la superficie pulpar expuesta.³⁶ El proceso por el cual los tejidos pulpares se tornan necróticos depende de: el número y virulencia de las bacterias invasoras, la resistencia del hospedador y del estado de la microcirculación pulpar para evacuar a los invasores.^{36,50,53}

En una lesión periodontal extensa, las bacterias pueden tener acceso al sistema de canales radiculares vía los canales accesorios, los túbulos dentinarios expuestos, el cemento y el foramen apical.^{36,54}

El proceso de anacoresis hematogénica puede estar definido como el de una "atracción" por los tejidos pulpares necróticos de las bacterias presentes en el torrente sanguíneo durante una bacteremia desde cualquier otra parte del cuerpo.^{17,36}

Una vez que las bacterias se establecen en los canales radiculares, estas no pueden ser alcanzadas fácilmente por los mecanismos de defensa del hospedador.^{17,36}

Patogenicidad de la flora microbiana de canales radiculares y tejidos periapicales infectados

La sola presencia de bacterias en los canales radiculares o en los tejidos periapicales, no implica que se vaya a producir una infección y sus consecuencias sintomatológicas.^{36,55} Esto dependerá de la interacción de los siguientes factores: número de células bacterianas, virulencia de las bacterias, duración de la agresión y la resistencia del hospedador.
^{36,41,48,55-57}

Los componentes estructurales que son considerados como factores de virulencia son: lipopolisacáridos (LPS), cápsula, peptidoglicano, fimbrias, lipoproteínas y ácidos lipoproteicos.^{36,55} Las bacterias Gramnegativas contienen LPS en su estructura y son causantes de actividades biológicas tales como: inducción febril, reacción de Shwartzman, actividad adyuvante y citotoxicidad.^{46,52,55,56,58-60}

Las enzimas que son consideradas como factores de virulencia y que provienen de bacterias aisladas de conducto radiculares y tejidos periapicales infectados son: colagenasa, hialuronidasa, condroitinsulfatasa, ácido fosfatasa, fibrinolisisina, hemolisina, coagulasa y otras proteasas.^{55,61,62} Existen muchos productos del metabolismo de las especies bacterianas que están involucradas en su patogenicidad. Ácidos grasos de cadena corta, amoniaco, compuestos sulfurados, indol, poliaminas, etc.^{36,37,39,59} Las bacterias tienen que atravesar muchas fases para producir una infección. Estos son: adherencia, colonización, invasión, sobrevivencia y daño tisular.^{36,55}

Diseminación de bacterias a través de los canales radiculares hacia los tejidos periapicales y otros tejidos

Una infección endodóntica de larga duración puede permitir que las bacterias se propaguen por todo el sistema de los canales radiculares, incluyendo canales accesorios, deltas apicales e istmos. Esto provoca que el tratamiento de estas infecciones sea difícil.^{36,55} La acumulación de las bacterias en los túbulos dentinales, a veces no permite el ingreso de células de defensa al sitio de la infección.³⁶

En algunos casos las alteraciones periapicales agudas y la instrumentación de los canales radiculares infectados, pueden hacer llegar bacterias al torrente sanguíneo y provocar una bacteremia.^{36,63-65} Los microorganismos que ingresan y circulan en el torrente sanguíneo son usualmente eliminados por el sistema retículo endotelial en pocos

minutos (bacteremia transitoria), y como regla general estos no conllevan a síntomas clínicos mayores sino solo a pequeñas elevaciones de temperatura.⁶³ Si las bacterias encuentran condiciones favorables, puede ser que produzcan una infección secundaria.^{36,63}

La propagación más común de las infecciones de los canales radiculares son los tejidos periapicales, algunas veces llegan a propagarse y complican la vida del paciente: celulitis, osteomielitis, sepsis, angina de Ludwig, meningitis y abscesos intracraneales.^{36,55,63-65}

2.2.3 Microorganismos Prevalentes en Patologías Periapicales Crónicas

2.2.3.1 Fusobacterium nucleatum

- *Taxonomía y características generales del Fusobacterium nucleatum*

El *Fusobacterium nucleatum* es una especie del género *Fusobacterium*, que pertenece a la familia *Bacteroidaceae*. Se describe que la procedencia del nombre *Fusobacterium* deriva de *fusos*, fusiforme o ahusado; y *bacterion*, bacilo pequeño. El término *nucleatum* se origina de la apariencia nucleada frecuentemente vista en microscopios de luz y electrónicos.⁶⁶ Es una bacteria gramnegativa, no formadora de esporas, no mótil, y casi todas sus células miden aproximadamente 5-10 um de largo, que terminan en puntas afiladas.⁶⁶⁻⁷² La diferencia más resaltante con otras especies de *Fusobacterium*, aparte de su forma característica, es que el ácido butírico es su mayor producto a partir de la fermentación de glucosa y peptona; La cual también permite diferenciar *Fusobacterium* de *Prevotella* y *Porphyromonas*.^{73,74} Pese a que es un

anaerobio estricto puede vivir con la presencia de hasta 6% de oxígeno.⁶⁶

- *Factores de patogenicidad*

Su poder patógeno está asociado a la presencia de fimbrias, lipopolisacáridos, a la producción de factores solubles inhibidores de la quimiotaxis de los polimorfonucleares y a la elaboración de metabolitos que se comportan como compuestos tóxicos titulares.⁷⁵

Una característica patogénica importante del *F.nucleatum* es la producción de metabolitos tóxicos.^{36,55,57,66,76} El mayor producto proveniente del metabolismo de peptonas y/o carbohidratos es el ácido butírico acompañado frecuentemente de ácidos láctico y acético.

Se resalta la acción de los ácidos butíricos, propiónico y iones amoniacales, de tener la habilidad de penetrar en el epitelio gingival.⁷⁶ Esta característica patogénica puede jugar un papel muy importante en el desarrollo de las lesiones periapicales.^{36,57,76}

Es sabido la característica de adherencia del *F. nucleatum* a la estructura dentaria y su rol patogénico en la patología periapical. Diversas investigaciones concluyeron que existe una interacción directa entre el *F.nucleatum* y los PMN que es la que induce a la adherencia,⁶⁶ ya que el *F.nucleatum* es una de las bacterias más comunes encontradas en los canales radiculares infectados y los PMN componen el porcentaje más grande de células inflamatorias que se ubican en los tejidos periapicales dañados.^{18,66}

Otro factor de patogenicidad es el fenómeno sinergista con otras bacterias. Algunos estudios han determinado correlaciones positivas entre *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella melaninogénica*, *Peptostreptococcus micros* y *Porphyromonas gingivalis* en la producción de enfermedad endodóntica y periodontal. Ha sido demostrado que el *F.nucleatum* ejerce un efecto en la colonización de *Prevotella intermedia*. Desde un punto de vista nutricional, la organización de diferentes especies bacterianas de una manera simbiótica en los canales radiculares infectados puede ser ilustrada por la coexistencia en colonias de *F.nucleatum* y *P.gingivalis* en íntimo contacto. ⁶⁶

2.2.3.2 Porphyromonas gingivalis

- *Taxonomía y características generales del Porphyromonas gingivalis*

Porphyromonas gingivalis es una especie de bacilos Gramnegativo pequeño (cocobacilos), no móvil, anaerobio estricto, asacarolítico, que forma colonias uniformes de coloración verdosas, pardas o negras. Dicha pigmentación se debe a la presencia de hemina y protoporfirina. *Porphyromonas gingivalis* tiene un requerimiento obligado de hierro para crecer.

La hemina, producto de la descomposición de la hemoglobina es un factor relevante para el crecimiento de esta bacteria tanto *in vivo* como *in vitro*.^{74,77,78} Células de *Porphyromonas gingivalis* tienen un diámetro de 0.5-0.8µm por 1.0-3.5µm de largo. ⁷⁹

El género *Porphyromonas*, específicamente la especie *Porphyromonas gingivalis*, fue definido a partir del grupo *Bacteroides melanigogenicus*,⁸⁰ dada la heterogenicidad genética de este grupo, demostrada por Shah y Hardie,⁸¹ y Coykendall et al.⁸² por medio de la técnica de hibridación DNA-DNA, se propuso una nueva especie, *Bacteroides gingivalis* para estas bacterias de origen bucal.⁸³ Luego, por la secuencia de rRNA de 16S, *Porphyromonas* se alejó genealógicamente de *Bacteroides* y *Prevotella*.⁸⁰

Porphyromonas gingivalis es una especie proteolítica, sacarolítica, anaerobia estricta, por lo que coloniza sitios en donde la tensión de oxígeno es baja, pero en los cuales hay substratos abundantes en nitrógeno.

- *Factores de patogenicidad*

Diversos estudios concluyen que *P. gingivalis* es el microorganismo más patógeno dentro del grupo de bacilos anaerobios Gramnegativos. Ellos señalan que el poder patógeno de esta bacteria en la colonización, destrucción del tejido adyacente y evasión de las defensas del hospedero, tiene relación con un gran número de factores de virulencia.^{75,78,84} Bogen y Slots determinaron la frecuencia de *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Prevotella nigrescens* en 20 casos de lesiones periapicales cerrados asociado con lesiones sintomáticas y asintomáticas de

endodoncia refractaria. *P. gingivalis* se produjo en una lesión periapical que se asoció con dolor moderado.⁸⁵

Porphyromonas gingivalis produce un gran número de enzimas, proteinasas y productos finales de su metabolismo que son activos contra un amplio espectro de proteínas del hospedero, y está provista de mecanismos para evadir las defensas de éste. La mayoría de las actividades enzimáticas de *Porphyromonas gingivalis* son asociadas a la proteínasa cisteína, la cual le proporciona ventajas metabólicas, ya que le otorga la capacidad de utilizar largas proteínas del hospedero para su crecimiento y desarrollo.⁷⁹ Las evidencias indican que LPS de *Porphyromonas gingivalis*, especialmente su lípidoA, es capaz de estimular la respuesta inflamatoria del hospedero indirectamente a través de la producción de citokinas.⁷⁹ Siqueira et al evaluaron la incidencia bacteriana en abscesos periapicales agudos de origen endodóntico revelando la prevalencia de *Porphyromonas gingivalis* en 40%, La alta prevalencia de *P. Endodontalis* y *P. gingivalis* sugiere que pueden desempeñar un papel importante en la etiología de la enfermedad periapical de origen endodóntico.⁸⁶

Una de las características de virulencia significativas de *Porphyromonas gingivalis* es este gran número de enzimas hidrolíticas, proteolíticas y lipolíticas, que son producidas esencialmente por todos los tipos de *P.gingivalis* conocidos. Otro tipo de proteinasas que produce *Porphyromonas gingivalis* para protegerse de los mecanismos de

defensa del hospedero son las proteinasas inmunoglobulinas como IgA1, IgA2 e IgG.⁷⁹

Existen unas proteínas bacterianas que actúan como factor de virulencia llamadas hemaglutininas. *Porphyromonas gingivalis* produce a lo menos cinco de ellas. Cuando se expresan en la superficie bacteriana, pueden promover la colonización mediante la unión de bacterias a receptores.⁸⁷

2.2.3.3 *Prevotella melaninogénica*

- *Taxonomía y características generales de Prevotella melaninogénica*

Las especies que conforman el género *Prevotella*, anteriormente clasificadas dentro del género *Bacteroides*; son bacilos cortos, pleomórficos, generalmente de 0,4µm por 0,6 a 1µm de longitud, inmóviles, no esporulados. Capaces de producir pigmentos, moderadamente fermentativos, sensibles a la bilis y resistentes a la vancomicina. Al igual que *Porphyromonas*, son exigentes en cuanto a Vitamina K, hemina y sangre para su crecimiento.^{88,89}

Debido a la característica de pigmentación en presencia de hemina se le clasifica dentro de las bacterias negro – pigmentadas (junto a otras especies de *Prevotella*: *P. intermedia*, *P. loescheii*, *P. corporis*, *P. nigrescens*, *P. pallens*).^{38,90}

Cabe mencionar que dentro de sus características bioquímicas se tiene que son productoras de indol (+), fermentan carbohidratos como glucosa (+), sacarosa (+), lactosa (-) y también son catalasa (-).^{74,91}

- *Factores de patogenicidad*

La *Prevotella melaninogénica* tiene en su estructura antigénica una cápsula polisacárida, que constituye un factor de virulencia al proteger a esta bacteria anaerobia contra la fagocitosis y la destrucción por parte de los leucocitos PMN.^{90,92}

Las enzimas protectoras contra el oxígeno (superóxido dismutasa, la peroxidasa) pueden considerarse factores de virulencia porque aumentan la supervivencia de los anaerobios en los tejidos antes del establecimiento de una tensión de oxígeno y un potencial de óxidoreducción bajos.^{90,92}

Se sabe que la *Prevotella melaninogénica* es una de las bacterias más aisladas en lesiones de carácter pulpar y periapical.^{85,93-99} Siqueira et al evaluaron la incidencia bacteriana en abscesos periapicales agudos de origen endodóntico revelando la prevalencia de *Prevotella melaninogénica* en 10%, sugiere que puede desempeñar un papel importante en compañía de otras bacterias en la etiología de la enfermedad periapical de origen endodóntico.⁸⁶

Se han descrito fimbrias, como adhesinas, que intervienen en la adhesión y coagregación bacteriana. También se ha comprobado su

capacidad para degradar inmunoglobulinas, su acción tóxica sobre fibroblastos, su actividad fibrinolítica. Igualmente, se ha demostrado *in vitro* que *P. melaninogénica* junto *P. loescheii* y *P. intermedia* tienen efecto inmunosupresor por inhibir la proliferación de linfocitos B e inmunoglobulinas.^{74,89} Berkiten et al determinaron *in vitro* la penetración de *Prevotella melaninogénica* en túbulos dentinarios en microscopía electrónica de barrido, *P. melaninogénica* podría penetrar en 25,9 micras,¹⁰⁰ lo que sugiere que penetra en forma moderada en los túbulos dentinarios haciendo resistente al tratamiento endodóntico.

2.2.3.4 Enterococcus faecalis

- *Taxonomía y características generales de Enterococcus faecalis*

La especie *Enterococcus* engloba un conjunto de especies semejantes al estreptococos y cuyo hábitat suele ser el intestino. La más aislada en clínica son *E. faecalis* (80-90%) y *E. faecium* (5%), fue introducida en la taxonomía a mediados de los años 80's. Con anterioridad, los enterococos pertenecían a la especie *Streptococcus*. Según la clasificación de Lancefield, los enterococos se engloban en el grupo serológico D. Los enterococos son cocos grampositivos, anaerobios facultativos, inmóviles y catalasa (-).^{101,102}

E. faecalis normalmente coloniza el sistema digestivo (intestino), formando una gran parte de la flora aerobia. Son oportunistas clásicos, con frecuencia, se cultivan enterococos en infecciones nosocomiales. Según indicaciones del estudio NIDEP (Nosokomiale Infektionen in

Deutschland–Erfassung und Prävention), los enterococos son responsables de aproximadamente el 15% de las infecciones nosocomiales.¹⁰³ Entre las infecciones causadas frecuentemente por *E. faecalis*, destacan las infecciones urinarias e infecciones de heridas abdominales. Es especialmente grave la endocarditis por enterococos. También han sido implicados en infecciones en endodoncia.³⁸

Una característica importante de *E. faecalis*, que permite diferenciarlo de los estreptococos, es, por ejemplo, la capacidad de crecer a 45° C en presencia de NaCl al 6,5% o bilis al 40%, así como a un pH de 9. Aparte del desdoblamiento de diversos azúcares, son características bioquímicas la formación de NH₄⁺ a partir de la arginina, así como el desdoblamiento de la esculina, un derivado cumarínico.¹⁰¹

A menudo, *E. faecalis* es resistente a numerosos antibióticos. Las isoxazolilpenicilinas, así como las cefalosporinas, carecen de utilidad. La penicilina G a dosis estándar tampoco es suficientemente eficaz. En general, es sensible a aminopenicilinas, aclureidopenicilinas, piperacilina y carbapenems.¹⁰¹

- *Factores de patogenicidad*

Enterococcus faecalis puede ser encontrado en el tejido pulpar dentario necrótico y está directamente relacionado al fracaso en endodoncia. Presenta resistencia a sustancias irrigadoras y medicamentos intracanales.¹⁰⁴ Bastante relacionado a infecciones persistentes, es

decir, está más relacionado a casos asintomáticos que en casos de sintomatología clínica.^{105,106} Autores como Pinheiro et al. y Siqueira y Rocas^{107,108} investigaron la identificación de microorganismos existentes en los canales de tratamiento endodóntico fallidos, *E. faecalis* fue la especie más aislada (45% y 77% respectivamente). Pero también hay estudios que demuestran lo contrario, que *E. Faecalis* también se pueden encontrar en infecciones endodónticas primarias. Ferrari y Bombana¹⁰⁹ investigaron la presencia de microorganismos: el género *Enterococcus*, *Enterobacterias* y levaduras en infecciones endodónticas primarias. Entre los diversos microorganismos encontrados, *E. faecalis* estuvo presente en todas las etapas de evaluación que demuestra su resistencia a la preparación de la raíz y a la medicación intracanal.

La capacidad de adhesión, el crecimiento y el poder de invasión en los tejidos son características pertinentes para *E. faecalis*.¹¹⁰ Estudios *in vitro* han demostrado la capacidad de invasión de los túbulos dentinarios por *E. faecalis* y su resistencia a los antibióticos, el efecto antimicrobianos de hidróxido de calcio y los cambios de pH.¹¹¹⁻¹¹⁴ Love¹¹⁵ evaluó la capacidad de crecimiento y penetración intratubular de tres microorganismos: *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mutans* y *E. faecalis*. Para evaluar la penetración de intratubular de esos microorganismos se utilizó seis dientes unirradiculares humanos que se escindió en dirección longitudinal produciendo dos muestras con cemento intacto. Suero humano y el colágeno tipo I se insertaron en los medios durante el experimento. El autor consideró que la invasión

intratubular fue significativa para los tres microorganismos. La inserción de colágeno en el medio inhibe completamente la penetración de *S. mutans* y *S. Gordoni* descendió, pero no impidió la penetración de *E. faecalis*. Evans et al.^{116, 117} encontraron que el mecanismo de la bomba de protones que se encuentran en la membrana citoplasmática de *E. faecalis* sería la razón de su resistencia a los cambios en el pH. Para ello, usaron un inhibidor de este mecanismo, el carbonilo cianídrico m-clorofenilhidrazona (CCCC) y puso las bacterias en contacto con hidróxido de calcio con pH 11,1. Hubo una disminución de células viables después de estos períodos.

La capacidad de sobrevivir al sistema de defensa innata del hospedero y competir con otras bacterias constituye importantes factores de virulencia de esta bacteria.¹¹⁰ También son estudiados: sexo feromonas, ácido lipoteico, producción de superóxido extracelular, gelatinasa, hialuronidasa, y citolisina (hemolisina). Aunque no estrictamente en calidad de factores de virulencia, AS-48 y otras bacteriocinas se mencionan debido a su posible contribución a la predominio de *E. faecalis* en infecciones persistentes endodancia.¹¹⁰

2.2.4 Medicación Intraconductos

La medicación intraconducto se caracteriza por la colocación de un fármaco o solución en el interior de la cavidad pulpar entre las sesiones necesarias para la conclusión del tratamiento endodóntico.³³

La elección de una medicación intraconducto entre sesiones requiere de las mismas consideraciones que la aplicación de cualquier fármaco en otra región del organismo humano, por lo tanto es necesario considerar:³³

1. Cantidad: Se debe precisar la cantidad y concentración del fármaco, para ejercer el efecto deseado sin lesionar los tejidos circundantes
2. Localización: Se debe tener en cuenta el mecanismo de acción de la sustancia para determinar la forma apropiada de su colocación.
3. Tiempo de aplicación: Es preciso conocer el tiempo que la sustancia permanece activa. Cada uno tiene un tiempo de vida útil, después del cual su efecto se reduce o desaparece. Algunos medicamentos pierden sus propiedades en presencia de material orgánico como sangre, exudado o pus.

Algunos autores han enumerado algunas posibles ventajas de la medicación temporal en el tratamiento de dientes infectados:³²

- Eliminación de las bacterias que pueden persistir en los conductos después de su preparación.
- Neutralización de los residuos tóxicos y antigénicos remanentes.
- Reducción de la inflamación de los tejidos periapicales.
- Disminución de los exudados persistentes en la zona apical
- Constitución de una barrera mecánica ante la posible filtración de la obturación temporal.

La medicación intraconductos con materiales poco irritantes puede estar indicada en el tratamiento de dientes infectados por algunos motivos:^{32,117}

- A. La anatomía de los conductos radiculares es bastante compleja, existiendo zonas inaccesibles a la instrumentación y, posiblemente, a la irrigación.
- B. En la periodontitis se producen reabsorciones apicales, formándose cráteres en los que anidad bacterias que pueden permanecer inaccesibles al tratamiento. Lomca y col. en 1996 observaron al microscopio electrónico de barrido (MEB) la presencia de una placa bacteriana recubriendo el ápice en dientes con periodontitis apical.
- C. Las bacterias más prevalentes, no siempre son las mismas. En los dientes infectados sin tratar, las bacterias más frecuentes son las anaerobias estrictas. En cambio en dientes con tratamiento endodóntico que ha fracasado, según Molander y col. había mayor prevalencia de anaerobias facultativas.
- D. La falta de medicación intraconducto disminuye el porcentaje de éxito en los dientes con conductos infectados. Sjogren y col. instrumentaron e irrigaron los conductos radiculares de dientes con periodontitis apical, antes de obturar tomaron muestras de los mismos, pudiendo cultivar bacterias en aproximadamente la mitad de ellos. Y solo un 68% de los cultivos positivos tuvieron éxito clínico. Como el clínico no tiene la certeza de haber conseguido unos conductos libres de bacterias, en los casos de periodontitis creemos aconsejable una medicación intraconducto.

E. Aunque durante mucho tiempo se utilizaron antisépticos demasiado irritantes en el interior de los conductos. El hidroxido de calcio es el más tolerante con los tejidos vitales.

2.2.4.1 Sustancias utilizadas como medicamentos intraconductos³²

Se han utilizado gran diversidad de antisépticos y sustancias con acción antimicrobiana en el interior de los conductos radiculares. Los antisépticos son medicamentos inespecíficos que actúan sobre todas las especies bacterianas por desnaturalización de las proteínas celulares. Todos ellos poseen, al mismo tiempo, una acción tóxica inespecífica sobre las células vitales y una posible acción inmunógena.

Compuestos Fenólicos³²

Son las más utilizadas en la medicación intraconductos. Poseen una acción antibacteriana variable en función de su composición química, ya que contiene fenol y algunos anillos de benceno, y otras sustancias. Son antisépticos potentes en contacto directo con las bacterias. Entre ellos tenemos a los siguientes:

- Eugenol: presenta una actividad antiséptica ligera y según se cree sedativa. Además, posee una acción tóxica celular, ocasiona necrosis hística y puede retardar la reparación apical por inhibir la adhesión de los macrófagos.

- Paramonoclorofenol alcanforado: es el antiséptico intraconducto más utilizado. Su acción antibacteriana deriva de los dos radicales libres que lo componen, el fenol y el cloro. El alcanfor disminuye su efecto irritante hístico, presenta un notable efecto antibacteriano, con una toxicidad sobre los tejidos vitales, puede retardar la reparación apical. Su efecto desaparece en las primeras 24 horas cuando se coloca impregnado con un algodón en la cámara pulpar. Cuando se deposita en el interior de los conductos radiculares, su efecto no se limita a ellos sino que, a través del ápice, se ha demostrado su distribución sistémica, detectándose en sangre y orina, aunque no se conoce bien la repercusión de estos hallazgos. Su baja tensión superficial puede facilitar su penetración y difusión en el interior de los túbulos dentinarios y conductos secundarios.³² Su acción es básicamente por contacto y la neutralización de su efecto en presencia de materia orgánica.³³

Aldehidos

El formaldehido, el paraformaldehido o trioximetileno, el formocresol y el glutaraldehido son potentes antibacterianos, pero pueden causar una necrosis de los tejidos periapicales sin ocasionar algún alivio del dolor. Se utiliza en dientes temporales con pulpa expuesta.³³

Compuestos halogenados

Los más usados son los que liberan cloro, un potente agente antibacteriano. El compuesto más universalmente utilizado en el interior de los conductos es el hipoclorito sódico, en soluciones de 1 a 5% como irrigante. La solución a usar se indica según la patología presente.^{32,33}

La solución yodurada de yodo-potasio posee un potente efecto antibacteriano, pudiéndose utilizar en casos de tratamientos refractarios. Sin embargo, es muy irritante y se debe utilizar con precaución en dientes anteriores con el peligro de causar tinciones.

Antibióticos

A mediados del siglo XX se a propuesto numerosas combinaciones de antibióticos para ser usadas como medicamento temporal en los conductos radiculares: penicilina, bacitracina, estreptomicina, nistatina. Recientemente se han propuesto combinaciones con ciprofloxacino, metronidazol y amoxicilina, todos ellos eficaces en estudios *in vitro*. A pesar de su eficacia estos antibióticos pueden tener efectos adversos: posibilidad de provocar reacciones alérgicas en pacientes sensibilizados, facilitar la aparición de cepas bacterianas resistentes y de permitir la aparición de hongos.³²

Para conseguir un post-operatorio sin dolor se está utilizando la combinación de antibióticos con corticoides, ya que es posible que pueda causar retardo en la reparación apical, por eso solo se usaría por un breve tiempo.³²

*Hidróxido de Calcio*³³

Es un polvo de color blanco, con un pH alrededor de 12.5, insoluble en alcohol y escasamente soluble en agua. Cuando se pone en contacto con los tejidos del organismo, se solubiliza en ellos de forma lenta. Sus principales efectos son su actividad antibacteriana y la capacidad para favorecer la

aposition de tejidos calcificados. Para usarlo como medicación temporal, se mezcla con un vehículo, preferentemente acuoso o hidrofílico (agua estéril, solución fisiológica, propilenglicol, polietilenglicol, entre otros).

Al llegar al interior de los túbulos dentinarios, los iones hidroxilos modifican el pH de la dentina, lo que provoca la destrucción de la membrana celular de las bacterias y de sus estructuras proteicas.^{32,33}

En estudios recientes se demostró que el hidróxido de calcio actúa sobre las endotoxinas bacterianas; hidroliza la porción lipídica del liposacárido bacteriano (LPS), presente en la pared celular de las bacterias anaerobias gramnegativas, y neutraliza su acción estimulante sobre el proceso de reabsorción del tejido óseo.³³

2.2.5 Plantas Medicinales

2.2.5.1 Principio activo de las plantas Medicinales

Thompson¹¹⁹ refiere que el valor medicinal de las plantas curativas, se debe a la presencia de una sustancia química – principio activo – que produce un efecto fisiológico. Mucho de los principios activos son sumamente complejos, desconociéndose aún su naturaleza química; otros han sido purificados, sintetizados o imitados. Por lo general pertenecen a una de estas categorías: aceites esenciales, alcaloides, glúcidos, taninos, sapogeninas, fenoles, quinonas, terpenos, carotenoides, cumarinas, flavonoides, resinas

2.2.5.2 Generalidades del aceite esencial

Definición

Los aceites esenciales son mezclas de sustancias volátiles con propiedades aromáticas, extraídos de plantas, en su mayoría por destilación; son generalmente líquidos y rara vez sólidos.^{120,121,122} Son el producto final del metabolismo secundario de muchas células vegetales, por lo que no se reintegran al metabolismo celular.¹²³

Augusto¹²⁴ define a los aceites esenciales como aquellas sustancias caracterizadas por su volatilidad, formadas por agrupaciones de un gran número de compuestos químicos aromáticos. Existen en las diferentes partes de las plantas, siendo estas sustancias no miscibles en agua. Morales¹²⁵ reporta que la mayoría de las esencias están constituidas por un compuesto predominante; pero que no siempre las características de olor y sabor están dadas por el compuesto principal. Otros componentes en menor trasa son importantes y en algunos casos la calidad comercial de ciertas esencias depende de dichos constituyentes.

Composición

Se considera que los aceites esenciales son químicamente una mezcla compleja y muy variables de hidrocarburos alicíclicos, denominados terpenos y sus derivados oxigenados llamados alcanfores.¹²⁶ La composición de los aceites esenciales es diversa. Están principalmente constituidos por hidrocarburos de fórmula $C_{10}H_{16}$. En la actualidad se refieren a un gran

número de hidrocarburos que aparecen en la naturaleza con fórmula (C_5H_8), sus derivados y compuestos aromáticos.^{120,121,122}

Los terpenos por su composición, pueden derivar de la condensación de dos moléculas de Isopreno C_5H_8 . En los mismos aceites esenciales, y en otros productos naturales, aparecen compuestos derivados, análogamente, del Isopreno, de modo que la calificación de terpeno se extiende a todos aquellos, dividiéndolos en hemiterpenos C_5H_8 , terpenos propiamente dichos, sesquiterpenos $C_{15}H_{24}$, diterpenos $C_{20}H_{32}$ y politerpenos $(C_5H_8)_n$, siendo n un número elevado.^{121,122}

Los productos derivados de los terpenos que tienen oxígeno reciben el nombre de alcanfores, como ejemplo: en los hidrocarburos terpénicos figuran los limonenos, el mirceno, el pineno. Entre los alcoholes terpénicos más importantes, el geraniol (de las esencias de las rosas), citronelo, etc.^{121,122}

*Propiedades Físicas*¹²⁷

- Líquidos a temperatura ambiente (a diferencia de los aceites “fijos”).
- Muy raramente son coloreados.
- En general, su densidad es inferior a la del agua.
- Poseen un índice de refracción elevado.
- Desvían la luz polarizada.
- Son liposolubles y solubles en los disolventes orgánicos habituales.
- Arrastrables en vapor de agua (muy poco solubles en ella).
- Punto de ebullición es superior a los 100°C.

Composición Química

Están constituidos por muchas clases de compuestos químicos, algunos por un solo componente en un alto porcentaje y otros por mezclas complejas de compuestos cíclicos aromáticos, acíclicos, heterocíclicos y derivados oxigenados.

Los constituyentes principales de los aceites esenciales son: ¹²⁸

- Hidrocarburos: Mirceno, cinemo, pineno, canfeno, felandreno, bineno, limoneno, cariofileno, geranioleno, santaleno
- Alcoholes: Isoamílico, geraniol, linalol, citronelol, nerodinol, farsenol, terpinol, mentol, borneol, bencílico, fenil-etílico
- Fenoles: Timol, carbacrol, eugenol, vainillina
- Aldehidos: Citral, citronelal, anisaldehido, benzaldehido, cinamadehido
- Cetonas: Alcanfor, carvona, mentona, piperitona, acetato fenona
- Eteres: Anetol, metil chavicol, eucaliptol, ascarodol
- Esteres: Salicilato de amilo, benzoato de metilo, acetato de terpinilo, acetato de geranilo

Localización de los aceites esenciales en las plantas

Según Miller¹²⁹ 2000 especies de plantas producen aceites esenciales. Las especies que proporcionan mayor cantidad de aceites esenciales pertenecen a las Familias Labiadas, Umbelíferas, Compuestas, Mirtáceas, Laureáceas, Rutáceas y Pináceas. Los aceites esenciales se hallan en regiones circunscritas a la planta; son segregadas por estructuras especializadas como los pelos glandulares, cavidades esquizógenas, etc.

Función de los aceites esenciales en la planta

Meyer¹³⁰ informa que no se conoce exactamente la importancia bioquímica que desempeñan los aceites esenciales en las plantas. Probablemente deben considerarse como productos accesorios del metabolismo, es probable que tengan un papel ecológico. Sin embargo; otros estudios han demostrado que los aceites esenciales regulan la transpiración, especialmente al alterar o modificar la actividad calorífica y la presión osmótica, manifiesta que los aceites esenciales son secreciones patológicas como la resina, el bálsamo, etc., sirviendo a la planta como sustancias protectoras contra las enfermedades de los órganos dañados.¹³¹

Influencia de los factores externos en la producción de aceites esenciales

Diversas investigaciones estudiaron el tipo de influencia de los factores externos y su relación con los aceites esenciales, concluyendo que la luz, el suelo, el clima, la velocidad del viento, etc. determinan su producción.^{119, 132, 133}

Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

Los aceites esenciales, compuestos extraídos de varios tipos de plantas y usados para preservar alimentos y bebidas, tienen un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de microorganismos. En su estudio Walton y col. demostró que el extracto destilado del ajo tiene efectos bactericidas y bacteriostáticos.¹²⁷ Se conoce de la actividad antimicrobiana de varias especies vegetales en forma de extractos o hierbas aromáticas en los alimentos, inhiben la formación vegetativa de esporas, detienen el crecimiento de alimentos patógenos y levaduras.¹²⁷

Mecanismo de acción del aceite esencial sobre los microorganismos

Este mecanismo de acción hacia los microorganismos es complejo y aún no ha sido del todo entendido y explicado. El modo de acción de los aceites esenciales también dependerá del tipo de microorganismos y esta principalmente relacionado con la estructura de la pared celular y la membrana externa de los mismos.¹² Kakrani y col. Establecieron, *in vitro*, la actividad antimicrobiana, antiparasitaria y antimicótica de los aceites esenciales de *Agria odoratissima*. Las investigaciones plantean que los aceites esenciales interferirían la fase del metabolismo intermedio de los microorganismos inactivando enzimas de reacción.¹³⁴

Extracción del aceite esencial

Para obtener la fracción cromática del material vegetal, a lo largo de los años, se usaron diferentes procesos. Motle¹³⁵ en su estudio consideraba los siguientes métodos:

- a) Extracción por expresión
- b) Extracción por solución
 - Con grasas sólidas y frías
 - Con grasas líquidas y calientes
 - Con solventes volátiles
- c) Extracción por destilación
 - Extracción por destilación con agua caliente
 - Extracción por arrastre de vapor

Extracción por destilación por arrastre de vapor

Esta técnica resulta una de las más simples y económicas para obtener el aceite esencial de este tipo de planta y en general para cualquier otro. Las ventajas de este método son su simplicidad, bajo costo y el hecho de poder maniobrar grandes volúmenes de materia prima.

Este método se fundamenta en que los aceites esenciales son arrastrados por la corriente de vapor de agua que se genera en la fuente de vapor, luego esta mezcla (vapor de agua y aceite) es condensada mediante su paso por un refrigerante de vidrio, para luego separar el aceite del agua por simple diferencia de densidades. La destilación es una operación farmacéutica que tiene por finalidad separar los principios volátiles (contenidos en una mezcla compleja) de los que no lo son. El equipo de destilación está compuesto por un sistema de destilación de doble balón, en el cual solo uno de los balones que contiene agua, es sometido al calor directo; mientras que el segundo balón que contiene la planta licuada recibe los vapores de agua, para luego liberar el vapor mixto (agua-aceite esencial) hacia el condensador.

El método involucra los siguientes pasos: ¹³⁶

- a. Selección de las hojas, talluelos y flores en buen estado.
- b. Las hojas se pesan y licúan, para lo cual se utiliza una pequeña cantidad de agua destilada, este luego se deposita en el segundo balón de destilación.

- c. Se activo el sistema al someter a calor directo (mechero de bunsen) el balón de agua destilada.
- d. El destilado se recibió en un depósito estéril y cerrado, aquí se observa un estado difásico entre agua y aceite esencial, debido a la diferencia de densidades. Esto permitió separar el aceite esencial mediante el uso de pipeta Pasteur a viales estériles.
- e. Los aceites esenciales obtenidos luego son esterilizados por filtración con membrana de Millipore de 0.22 u; almacenado a temperatura ambiente y en oscuridad hasta su utilización.

2.2.6 *Minthostachys Mollis*

2.2.6.1 Descripción general

Se denomina en la lengua Quechua “muña”, y en la Aymara tiene 2 nombres: “Coa” y “Huaycha”. Debido a sus características semejantes al pólleo y orégano, los españoles la denominaban poleo silvestre. Otros nombres vulgares con los que se le conoce a esta planta son: "Muña negra", "Polco silvestre", "coz", "muña-muña", "arash muña", "kon" "Orcco-muña".^{137,138}

La muña, es un recurso natural que tiene un plano altitudinal de crecimiento entre los 2500 – 3500 m.s.n.m.¹³⁹ Habita entre los diferentes pisos ecológicos de nuestra serranía, comportándose como tal; existe en gran abundancia. Así como es una planta hemicriptófila que durante la época más fría del invierno y seco desaparecen sus órganos aéreos para brotar nuevamente con las primeras lluvias de la primavera.¹⁴⁰ Alcanza una altura de

0.80 a 1.50 m., desarrollándose en forma difusa y muy ramificada, crece en lugares cercanos a acequias, manantiales sin tener grandes requerimientos de agua.¹²⁵ Se desarrolla en suelos arenosos, ricos en materia orgánica, bien drenados, con buena retención de humedad, con un pH entre 5-8 y un clima con elevada luminosidad, florece en época de lluvia, se multiplica por semilla y por codo.¹²⁵

2.2.6.2 Clasificación sistemática

Reino	: Vegetal
Sub reino	: Embryophyta
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Sub clase	: Methachlamydeae
Orden	: Tubiflorae
Familia	: Lamiaceae (Labiatae)
Género	: Minthostachys
Especie	: M. mollis (Spach) Griseb
Nombre vulgar	: “Muña”
Fórmula floral	: K(5) C(2-3) A(2-2) G(2)

2.2.6.3 Características Botánicas

Es una planta arbustiva, leñosa, frondosa en la parte superior, de aspecto general glauco, erecta y pubescente, su tallo es ramificado desde la base. La hoja es el elemento vegetativo simple ligeramente aserrado, carece de estípulas, cortamente pedunculares de filotaxia opuesta. Su peciolo mide entre 4 y 6 mm. de largo, pubescente acanalada en la parte superior y convexo

en la parte inferior, es aquí donde se deposita la mayor cantidad de aceite, que al estrujarlos dejan sentir su aroma característico. Las flores son hermafroditas. El limbo es aovadote 1.7 a 2.5 cm. En su mayor ancho, y de 2 a 4 cm. de largo; su base es atenuada de bordes aservados, ápice agudo de nerviación penninervia. El limbo es pubescente tanto en el haz como en el envez, debido a lo cual la hoja presenta una coloración verde pálida; sus nervaduras secundarias son muy desarrolladas y ligeramente reticuladas.

El cáliz soldado con 13 venaciones terminado en 5 lóbulos dentados casi iguales entre si con pelos cerellosos en la base, la corola raramente es de 6mm. De largo, dividida en 2 labios: 2 lóbulos o labio superior y 3 lóbulos o labio inferior. Los pelos de las partes aéreas, o sea de las hojas y tallos, parece que forman una especie de manto protector contra los cambios bruscos de temperatura y al mismo tiempo son los lugares en donde se deposita el aceite esencial, de aquí que al estrujarlos dejen sentir su aroma o el sabor picante que da una impresión de frío que es característico. Las flores son pequeñas, reunidas en verticilos falsos, situados en la parte superior de las ramas con pedúnculos cortos, 2 en cada axila.

2.2.6.4 Tipos de muña

Se indica un total de 12 especies, cuya distribución abarca desde Argentina hasta Venezuela;¹³⁹ y en el Perú encontraron 6 especies distribuidas desde el norte (Cajamarca) hasta el sur (Cuzco), con una mayor distribución en la región central, cuyas especies son:^{139,141}

- *M. glabrescens*
- *M. salicifolia*

- *M. cetosa*
- *M. spicata*
- *M. tomentosa*
- *M. mollis* (HKB) griseb

2.2.6.5 Características físico-químicas del aceite esencial de *M. mollis*

(HKB) griseb “muña”^{124,125}

- Aspecto	: Líquida, clara, transparente
- Color	: Incoloro
- Olor	: Característico en menta
- Sabor	: Picante
- Densidad relativa	: 0.92
- Índice de refracción	: 1.4699
- Solubilidad en alcohol al 70%	: 5
- Índice de mentona	: 33.88%
- Índice de menta	: 22%
- Índice de acidez	: 1.683
- Índice de esteres	: 5.819
- Rotación específica	: -2 ^a 45'
- Índice de éter	: 16.80 %
- Contenido de mentol total	: 4.042 %
- Solubilidad en etanol	: 95 %

2.2.6.6 Composición Química

Con respecto a la composición química del aceite esencial de *M. mollis* (muña) existen pocos trabajos de investigación por lo que se tiene poca información; el aceite esencial de *M. mollis* (muña), al igual que otros aceites esenciales, presenta una estructura aldehídica, cetónica, alcohólica (mentol y mentona), ésteres, éteres y terpenos en mayor porcentaje.

Gibaja¹⁴² realizó la desterpenación del aceite esencial de *M. mollis* (muña) determinando el 10.20% para la parte desterpenada (compuestos oxigenados) y 89.80 % para la fracción terpénica. Chica¹² determinó la presencia de carvacril acetato, carvacrol, pulegona y mentona.

2.2.6.7 Moléculas presentes en *Minthostachys mollis*

Pulegona

Uno de los componentes más importantes de muchos aceites *Minthostachys*, pero es mejor conocido por *pulegium poleo* (*Mentha*). Es altamente tóxico en grandes cantidades, daña el hígado y puede provocar el aborto. Su toxicidad probablemente explica algunos de los efectos del aceite de *Minthostachys* contra las plagas y parásitos. La sustancia también se usa en perfumería y saborizantes.

Mentona

Otro componente muy importante, junto con *Pulegona* a menudo representan más del 75% de la composición del aceite entero. El más conocido de la menta (*Mentha x piperita*). Tiene un aroma muy agradable sabor a menta y se usa en perfumería, pero también tiene propiedades digestivas.

Carvacrol

Se han encontrado para ser componentes dominantes en una menor proporción de los estudios de los aceites de *Minthostachys mollis*. Carvacrol también se encuentra en varias hierbas conocidos como el orégano *Origanum vulgare*, la ajedrea de verano *Satureja hortensis* o tomillo *Thymus serpyllum*.

Carvona

Como su nombre lo sugiere, esta sustancia es conocida como un producto de semillas de alcaravea *Carum carvi*, un Apiaceae. Tiene propiedades digestivas y se utiliza para dar sabor.

Mentol

Por lo general, mucho menos importante en *Minthostachys mollis*, pero a veces se encuentra como componente menor de la mezcla de aceite. Se está enfriando y adormece el dolor, y se utiliza contra throatsore.

Linalol

Empleado como condimento y como insecticida, linalol es más conocido de cilantro *Coriandrum sativum* de la familia Apiaceae. A menudo es uno de los componentes menores del aceite de *Minthostachys mollis*.

Timol

Como su nombre lo sugiere, esta sustancia es bien conocida de los aceites de distintas especies de tomillo. Actúa como antiséptico y contra el dolor de

garganta y tos. A veces se encuentra como un componente menor en el aceite de *Minthostachys mollis*.

2.2.6.8 Composición nutritiva de *Minthostachys mollis* (muña)

En 100 gr. De parte comestible

Componentes mayores:

Agua	16	ug. %
Proteínas	3.20	ug. %
Grasas	2.80	ug. %
Carbohidratos	66.30	ug. %
Fibras	9.40	ug. %
Cenizas	11.70	ug. %

Minerales:

Calcio	2.24	ug. %
Fósforo	269	ug. %
Hierro	22.40	ug. %

Vitaminas

Retinol	306	ug. %
Tiamina	0.35	ug. %
Riboflavina	1.81	ug. %
Niacina	6.85	ug. %
Ac. Ascórbico	21.10	ug. %

Otros componentes

Acidos débiles	2.54	ug. %
----------------	------	-------

Esteres	14.02 ug. %
Taninos	Positivo
Resinas	Positivo
Fenoles	Positivo
Alcoholes	Positivo
Aldehidos	Positivo
Cetonas	Positivo
Carbonilo	22.06 ug. %
Mentol	40.42 ug. %

2.2.6.9. Propiedades y usos

La muña es reconocida tradicionalmente por sus propiedades digestivas contra cólicos, flatulencia (carminativo), vómitos, diarreas; antitusígenas, antiasmático,^{6,138} expectorante,⁴ antiespasmódicas, antiséptica, analgésico, antiinflamatorio, febrífugas, en tratamiento de tumores y mezclándola con chilca se empleaba en fracturas.¹³ Es excelente contra la halitosis¹⁴³ y para combatir jaquecas y soroche. Además es utilizada como condimento para preparar platos típicos.⁶

En el campo agrícola se emplea para la preservación de algunos productos como la papa, del ataque de insectos.^{137,138,143} A manera de fumigante orgánico vegetal contra el gorgojo de los andes y como antimoho.⁴

En el campo pecuario es utilizado para controlar los ectoparásitos y endoparásitos de los animales domésticos, además para curar sarna en

equinos y camélidos.⁶ En otras zonas de Latinoamérica, principalmente en Argentina, se le emplea para aromatizar y fabricar licores y bebidas.⁷

2.2.7 Pruebas de Susceptibilidad Microbiana

La actividad antimicrobiana se mide *in vitro* para determinar principalmente la potencia de un agente antibacteriano en solución, su concentración en los líquidos del cuerpo o en los tejidos y la susceptibilidad de un microorganismo dado a concentraciones conocidas del medicamento. Los métodos más utilizados son:

2.2.7.1 Método de Dilución

Se incorporan cantidades graduadas de las sustancias antimicrobianas en medios bacteriológicos líquidos o sólidos; los medios se inoculan después con las bacterias de prueba y se incuban. El punto final se toma como la cantidad de sustancia antibacteriana requerida para inhibir el crecimiento o para matar las bacterias de prueba.^{144,145}

Las pruebas de sensibilidad por dilución en agar consumen tiempo y su uso está limitado a circunstancias especiales. Sin embargo, el advenimiento de series preparadas de dilución de caldos para muchos fármacos distintos en placas con microdilución ha aumentado y simplificado de manera considerable al método. La ventaja de las pruebas con microdilución es que permite informar un resultado cuantitativo que indica la cantidad de un fármaco dada necesaria para inhibir (o matar) a los microorganismos sujetos a la prueba.^{144,145}

2.2.7.2 Método de Difusión

Este método, que sufrió diferentes modificaciones hasta que fue estandarizado por Kirby-Bauer en los Estados Unidos en 1966, representa la prueba de susceptibilidad más ampliamente utilizada en bacteriología clínica porque permite obtener resultados bastante exactos mediante un método cuantitativo, semicuantitativo o cualitativo, este último es el más utilizado.

El Comité de Expertos de la OMS (NCCLS en su documento M7-T) publicó las “Normas” para efectuar algunas modificaciones al descrito por Bauer, de manera que los resultados sean comparables en todas partes del mundo. Estas normas tienen en cuenta: ^{144,145}

Condiciones de la cepa:

- Debe aislarse del material de estudio.
- Debe obtenerse en forma de cultivo puro.
- Debe ser agente etiológico del proceso infeccioso.
- Se podrán utilizar cepas de referencia cuando existan dudas del material que se usa.

Cualidades del disco de papel:

- Debe tener un tamaño de 5 a 7 mm. y un espesor de 0.02 mm.
- Deben cargarse con una concentración de antimicrobiano selectivo de manera que se obtenga una zona de inhibición no mayor de 40 mm.
- La cantidad de antimicrobiano selectivo que contiene cada disco debe ser justa porque una sobrecarga falsearía los resultados.

- Deben mantenerse almacenados a temperaturas de 4°C o según las instrucciones del fabricante, para que no haya deterioro en la potencia de la droga.
- Tienen que estar en un ambiente con sustancias desecadoras para evitar los vapores de condensación al almacenarlos en e refrigerador.

Indicaciones para la preparación de las placas:

- El medio deberá distribuirse uniformemente en la caja.
- La altura del medio debe ser de 4mm para que se pueda estandarizar la difusión de la droga porque si se disminuyera el espesor de la capa de agar se obtendría halos inhibición más amplios.

Este método requiere experiencia de laboratorio y conocimiento de bacteriología porque de lo contrario se pueden cometer errores que repercutirán clínicamente. A continuación se detalla los pasos a seguir para realizar esta prueba: ^{144,145}

- Se realiza la siembra de la placa con el agar selectivo para el microorganismo específico, esta siembra puede ser por diseminación en la superficie, por inundación o por agotamiento por estrías.
- Se deja secar entre 3 y 5 minutos.
- Con una pinza estéril de puntas finas se colocan sobre la superficie del agar sembrado discos individuales o en estrella; estos llevan impresa la abreviatura del antimicrobiano selectivo en el cual se encuentran embebidos y la serie a la cual pertenecen.

- Con respecto a los discos se debe tener en cuenta que para asegurar el contacto adecuado y por lo tanto una difusión uniforme se los debe presionar suavemente. Para permitir la lectura de los resultados se los debe colocar con la inscripción hacia el medio de cultivo. Para impedir la superposición de los halos de inhibición deben estar a una distancia no menor de 15 mm entre sí y a 1.5 cm. del borde de la placa.
- Se deja la placa no menos de media hora a temperatura ambiente para que el disco absorba agua del medio de cultivo y así permita la difusión radial del antimicrobiano selectivo, lo que produce un gradiente de concentración, es decir que cuanto más nos alejamos del disco menor será la concentración del antimicrobiano. Esta predifusión es necesaria para reducir una posible causa de error.
- Luego se incuba de acuerdo a las características de cada microorganismo. Una vez transcurrido el tiempo indicado se procede a la medición e interpretación de la zona circunda el disco, llamada halo de inhibición. Este informa si el microorganismo es sensible, resistente o intermedio. La falta de desarrollo alrededor del disco indica que la bacteria es “sensible” al antimicrobiano selectivo, lo que significa que después de tratar al paciente infectado por el microorganismo con las dosis habituales de dicho antimicrobiano se observará una respuesta favorable al tratamiento. El crecimiento del microorganismo alrededor del disco indica una cepa “resistente”, es decir, una con la cual no se obtendrá ninguna respuesta terapéutica. Existe un tercer tipo de cepa, la

cepa “intermedia”, que es la que exige la administración de dosis de antimicrobianos superiores a las habituales para obtener una respuesta terapéutica favorable.

Como el tamaño de cada halo de inhibición depende de la sensibilidad de la cepa al antimicrobiano, de la velocidad de crecimiento del microorganismo, de la cantidad (carga) de antimicrobiano selectivo presente en el disco y de la capacidad para difundir en el medio, etc., un halo más grande no siempre indica mayor actividad antimicrobiana.

2.2.8 Evaluación de la Susceptibilidad Microbiana

Muchos microorganismos han desarrollado diferentes grados de resistencia a los quimioterápicos, lo que en algunos casos, con el paso del tiempo causan efectos colaterales; lo que no sucede con el uso de los principios activos de una planta.¹²⁰ Duraffourd ha trabajado mucho en fitoterapia clínica, aplicando tratamientos en base de principios activos comparándolos con la actividad de antibióticos, según lo que reporto el uso de principios activos en humanos no reportaron efectos secundarios.

Para demostrar la susceptibilidad que tienen los microorganismos a diversos aceites esenciales Duraffourd y col. realizaron estudios estadísticos determinando tablas de actividad antimicrobiana basado en porcentajes.¹²⁰ Estos consideran la actividad de los aceites esenciales en función al diámetro del halo de inhibición de crecimiento bacteriano (HICB):

- Nula (-), para un diámetro inferior a 8 mm.

- Sensibilidad límite (sensible = +) para un diámetro comprendido entre 8 a 14mm
- Medio (muy sensible =++) para un diámetro entre 14 y 20mm
- Finalmente para un diámetro superior a 20 mm el microorganismo es sumamente sensible (+++)

2.3 Definición de términos

- **Aceite esencial:** Los aceites esenciales son mezclas de varias sustancias químicas biosintetizadas provenientes de las plantas, que dan ciertas características a flores, árboles, semillas y a ciertos extractos de origen animal. Químicamente están formados por monoterpenos y algunos sesquiterpenos, y compuestos aromáticos.
- **Cepa bacteriana:** Todos los organismos descendientes de un cultivo puro, por tanto, con fenotipo y genotipo definidos.
- **Efectividad antibacteriana:** Calidad de un fármaco o agente químico determinado consistente en eliminar o inhibir el crecimiento de las bacterias patógenas que se desarrollan en un medio dado, al actuar sobre ellas indirecta (obstaculizando el desarrollo bacteriano) o directamente (ocasionando la muerte de la célula bacteriana).
- **Principio Activo:** Sustancia química responsable de la actividad farmacológica y del uso terapéutico de una droga.

2.4 Planteamiento del Problema

La patología pulpar y periapical son enfermedades inflamatorias de etiología microbiana. Los microorganismos y sus productos desempeñan un papel relevante en la inducción, la progresión y la perpetuación de tales patologías;^{126,146,147} toda bacteria que habita en la cavidad oral, teóricamente tiene la capacidad de invadir los canales radiculares, participar en la necrosis pulpar, estar relacionado en la infección de dichos conductos y finalmente ingresar hacia los tejidos periapicales.^{22,36-38,58} Sin embargo las bacterias presentes en la pulpa dental necrótica y en los tejidos radiculares infectados, son un número reducido de especies a comparación con la flora oral total, esto es debido a que existen condiciones especiales de tal manera que ciertas bacterias sean más patógenas que otras en dichas zonas.

Es conocida la estrecha relación existente entre microorganismos y patología de origen endodóntico.¹⁴⁶ La actividad enzimática y metabólica bacteriana, junto a los componentes estructurales de algunas bacterias son responsables de una sucesión de cambios patológicos que afectan el tejido pulpar; llevándolo a su degradación y muerte, teniendo como consecuencia final la diseminación bacteriana y de sus productos (toxinas), hasta entonces albergados en el conducto radicular desvitalizado e infectado, hacia los tejidos periapicales.

Más de 150 especies microbianas se han aislado de canales infectados, generalmente en infecciones mixtas que consisten en cuatro a siete diversas especies y con predominio de bacterias anaerobias obligadas,¹⁴⁸ que es el tipo de microflora responsable de la alteración a nivel periapical, entre los que se

destacan el género *Porphyromonas*, *Prevotella* y *Fusobacterium*, entre otros.¹⁴⁹⁻¹⁵⁴ Asimismo tenemos casos de infección persistente (presencia de sintomatología clínica y/o radiográfica durante el tratamiento de conductos o después de este), cuyo agente causal más representativo es el género *Enterococcus*.^{155,156}

El objetivo principal del tratamiento endodóntico es la completa remoción del tejido pulpar y los microorganismos que permanecen en el sistema intracanal otorgando un óptimo estado para su obturación y consecuentemente, la reparación de los tejidos periapicales.¹⁵⁷ Para cumplir este objetivo existen sustancias químicas que eliminan e inhiben el crecimiento bacteriano y la liberación de sus toxinas, dentro de estas sustancias tenemos a irrigantes, detergentes, quelantes y medicamentos intraconductos, dentro de este último grupo destaca la presencia del paramonoclorofenol alcanforado y el hidróxido de calcio.

A pesar de todos los alcances que ofrece la endodoncia todavía hay casos en que ocurren infecciones persistentes post tratamiento endodóntico, estudios demostraron que ciertas bacterias penetran profundamente en los túbulos dentinarios del conducto radicular que hace muy difícil su eliminación a la hora de la instrumentación biomecánica, desinfección con los irrigantes antisépticos o colocación de medicamento intracanal.⁴⁸

2.4.1 Delimitación

En diversos trabajos de investigación que se realizan en la actualidad en diversas partes del mundo, se destaca que cada vez se está dando mayor

importancia al estudio de las plantas medicinales como una alternativa al tratamiento de diversas patologías, y las afecciones bucodentales no son la excepción. El Perú, considerado el tercer país más mega diverso del planeta, ha efectuado importantes aportes de especies y variedades para el mundo gracias a los diversos pisos ecológicos y microclimas que presenta, contando con 84 zonas de vida de las 103 conocidas donde habría 50 mil especies vegetales (20% de las existentes en la Tierra) de las que 2,000 han sido utilizadas con fines curativos.¹⁵⁸

Estudios realizados demuestran que *Minthostachys mollis* griseb “muña”, planta medicinal que crece en nuestra sierra, tiene una marcada efectividad sobre bacterias orales en especial sobre anaerobios estrictos;¹⁰ planteándonos con esos resultados la posibilidad de que dicha sustancia sea efectiva en la eliminación de bacterias presentes en patología periapicales de origen endodóntico, constituyéndose en el motivo del presente trabajo de investigación.

2.4.2 Formulación del problema

¿Cuál es la efectividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de *Minthostachys mollis* griseb (muña) frente a bacterias más prevalentes en patologías periapicales crónicas de origen endodóntico?

2.5 Justificación

La presente investigación pretende efectuar un aporte experimental más al estudio microbiológico de los canales radiculares infectados y así aportar al

estudio de la patogénesis de las lesiones periapicales de etiología bacteriana específica.

Se estima que el 25 % de los fármacos expendidos en el mercado provienen de una fuente vegetal. Pese a ello, sólo se ha estudiado a fondo el 1% de las 250 000 especies de interés farmacológico, respecto a su composición química y uso terapéutico, por lo que se deduce que hay un gran número de moléculas bioactivas por ser estudiadas.¹⁰

Los aceites esenciales de las plantas llamadas medicinales, tienen comprobadas propiedades curativas (propiedades antibacteriana, antiviral y antimicótica) que han sido estudiadas en el campo de la medicina,^{55,159,160} siendo su estudio todavía exiguo en el campo estomatológico. Existe pues una razón primordial para que el análisis de la composición y bioactividad del aceite esencial de las hojas de: *Minthostachys mollis*, debe ser estudiado e investigado intensivamente en la actualidad, debido a que la drogas obtenidas por síntesis química, así como los conservadores son considerados carcinogénicos y teratogénicos.

Este proyecto es impulsado por el deseo de que la mayoría de los profesionales en odontología accedan a este tipo de productos, teniendo en cuenta la gran aceptación de la población por la medicina alternativa, esta investigación permitirá valorar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* griseb (muña) en casos de patologías periapicales de origen endodóntico.

Los resultados finales pretenden motivar el uso del aceite esencial de *Minthostachys mollis* griseb “muña” como agente antibacteriano; para la

obtención en la preparación de un medicamento intracanal, al alcance de la comunidad odontológica.

2.6 Objetivos de la Investigación

2.6.1 General

- Determinar la efectividad antibacteriana “*in vitro*” del aceite esencial de *Minthostachys mollis griseb* (muña) frente a bacterias prevalentes en lesiones periapicales crónicas de origen endodóntico.

2.6.2 Específicos

- Determinar la efectividad antibacteriana cuantitativamente y cualitativamente del aceite esencial de *Minthostachys mollis griseb* (muña) puro y en diluciones del 50% y 25% frente al crecimiento bacteriano de la cepa *Fusobacterium nucleatum*.
- Determinar la efectividad antibacteriana cuantitativamente y cualitativamente del aceite esencial de *Minthostachys mollis griseb* (muña) puro y en diluciones del 50% y 25% frente al crecimiento bacteriano de la cepa *Prevotella melaninogénica*.
- Determinar la efectividad antibacteriana cuantitativamente y cualitativamente del aceite esencial de *Minthostachys mollis*

griseb (muña) puro y en diluciones del 50% y 25% frente al crecimiento bacteriano de la cepa *Enterococcus faecalis*.

- Determinar la efectividad antibacteriana cuantitativamente y cualitativamente del aceite esencial de *Minthostachys mollis griseb* (muña) puro y en diluciones del 50% y 25% frente al crecimiento bacteriano de muestras de conducto radicular con PAC.
- Determinar la efectividad antibacteriana cuantitativamente y cualitativamente del aceite esencial de *Minthostachys mollis griseb* (muña) puro y en diluciones del 50% y 25% frente al crecimiento bacteriano de muestras de conducto radicular con PAC tratada endodónticamente con infección persistente.
- Comparar la efectividad antibacteriana cuantitativamente y cualitativamente según la dilución del aceite esencial de *Minthostachys mollis griseb* (muña) para las cepas *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella melaninogénica*, *Enterococcus faecalis* y muestra de conducto radicular.

2.7 Hipótesis

Hi: El aceite esencial de *Minthostachys mollis griseb* (muña) tiene efectividad antibacteriana *in vitro* frente a cepas de *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Enterococcus faecalis* y frente a muestras de conducto radicular.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 Tipo de Investigación

Las características de la investigación y de acuerdo a los objetivos planteados determinaron un estudio de tipo experimental, “*in vitro*”, prospectivo y transversal.

Es experimental debido a que se contó con un grupo control positivo representado por los discos de papel filtro embebidos con Paramonoclorofenol alcanforado, un grupo control negativo representado por discos de papel filtro embebidos en alcohol etílico al 70%; y un grupo experimental representado por discos de papel filtro embebidos con el aceite esencial de *Minthostachys mollis* griseb (muña).

In vitro porque el estudio se realizó en unos medios de cultivo que sirven para el desarrollo de las bacterias, y se manejó todo en un laboratorio.

Es prospectivo debido a que la recolección de los datos se realizó conforme la ocurrencia de los hechos.

Es transversal debido a que las variables fueron observadas en un solo momento de acuerdo a los objetivos de la investigación.

3.2 Población y Muestra

3.2.1 Universo

Las bacterias presentes en casos de lesiones periapicales de origen endodóntico.

3.2.2 Tamaño de la Muestra

Se seleccionaron de manera intencional dos especies diferentes de bacterias anaerobias estrictas: *Fusobacterium nucleatum* y *Prevotella melaninogénica*. También se seleccionó una especie bacteriana anaerobia facultativa: *Enterococcus faecalis*. Además se tomó muestras de conducto radicular de pacientes con Periodontitis apical crónica. Para obtener una muestra más homogénea se tomaron criterios de inclusión.

3.2.3 Criterios de Inclusión

- Bacterias anaerobias estrictas y anaerobias facultativas más prevalentes de patología periapical crónica.
- Replicaciones de cepas puras de bacterias liofilizadas.
- Bacterias que no han tenido contacto con ningún tipo de medicamento o solución antimicrobiana.
- Muestras de conducto radicular provenientes de pacientes sin enfermedad sistémica.

3.2.4 Tipo De Muestreo

El método de selección fue un muestreo no probabilístico por conveniencia.

3.2.5 Unidad De Análisis

Se utilizó el aceite esencial de *Minthostachys mollis* puro y en dilución y se trabajó con muestras de conducto radicular con Periodontitis apical crónica y con cepas estándares de bacterias anaerobias estrictas, procedentes de American Type Culture Collection (cepas ATCC®), identificadas por género y especie, las cuales fueron:

- *Fusobacterium nucleatum* ATCC® 25586
- *Prevotella melaninogénica* ATCC® 25845
- *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212

3.3 Operacionalización de variables

VARIABLE	DEFINICION	DIMENSION	INDICADOR	ESCALA	VALOR
Eficacia antibacteriana del aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> griseb (muña)	Capacidad del aceite esencial de <i>M. mollis</i> griseb (muña) consistente en eliminar o inhibir el crecimiento bacteriano que se desarrollan en un medio dado.	Cuantitativamente	Diámetro de halo de inhibición (medido en mm.)	Cuantitativa Razón	5 – 20 mm.
		Cualitativamente	Diámetro de halo de inhibición (medido en mm. y según las pautas de Duraffourd) ¹²⁰	Cualitativa Ordinal	Nula (-)
					sensible (+)
					muy sensible (++)
sumamente sensible (+++)					
Bacterias prevalentes en patologías periapicales crónicas	Especies bacterianas que desempeñan un papel preponderante en el desarrollo de la patología endodóntica a nivel periapical.	Cepas estándares ATCC <i>F. nucleatum</i> <i>P. melaninogénica</i> <i>E. faecalis</i>	Crecimiento bacteriano de la cepa	Cualitativa Nominal	Si No
		Muestra de conducto radicular	Crecimiento bacteriano	Cualitativa Nominal	Si No

Dilución del aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> griseb “muña” (covariable)	Dilución del aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> (muña) en alcohol etílico al 70%		Concentración de aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> “muña” puro	Cualitativa Ordinal	Aceite puro
			Concentración de 100µl. de aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> “muña” en solución de alcohol al 70% en proporción 1:1	Cualitativa Ordinal	Aceite al 50%
			Concentración de 100µl. de aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> “muña” en solución de alcohol al 70% en proporción 1:4	Cualitativa Ordinal	Aceite al 25%

3.4 Materiales

A Materiales y equipos para extraer el aceite esencial

- Hojas, flores y talluelos de muña
- Balanza
- Refrigeradora
- Balón de fondo plano
- Soporte
- Refrigerante de bolas o serpentín
- Vaso de precipitado
- Agua destilada

B Materiales y equipos para la preparación de medios de cultivo

- Medios de cultivo enriquecidos
 - Agar Schaedler (Remel®)
 - Agar Bilis Esculina (Remel®)
- Balanza
- Agua destilada
- Probetas
- Matraz de Erlenmeyer
- Placas petri
- Pipetas
- Esterilizador de calor seco (horno)
- Autoclave
- Mecheros

- Estufa (incubadora)
- Microscopio
- Refrigeradora
- Tubos de prueba
- Sangre desfibrinada
- Guantes

C Materiales y equipos para generar medio anaerobio

- Jarra de anaerobiosis
- Sobre de anaerobiosis “Anaerogen”
- Anaerocult (Merck®)
- Guantes

D Materiales para la obtención de muestra de conducto radicular

- Caldo thioglicolato
- Pinzas estériles
- Conos de papel # 15 y # 20
- Guantes estériles

E Materiales para la prueba de sensibilidad antimicrobiana

- Medios de cultivo para sensibilidad antibiótica
- Agar Schaedler – Sangre
- Agar Bilis Esculina
- Discos de papel filtro esteriles wathman 3

- Agua destilada
- Aceite esencial de *Minthostachys mollis*
- Discos embebidos con Paramonoclorofenol alcanforado
- Alcohol al 70%
- Pinzas estériles
- Hisopos
- Placas con agar
- Cepas bacterianas reactivadas
- Mecheros
- Asas de siembra
- Guantes estériles

3.5 Métodos

3.5.1 Procedimientos y Técnicas

3.5.1.1 Obtención del aceite esencial de *M. mollis* griseb (muña)

3.5.1.1. a Recolección de *Minthostachys mollis* (muña)

La obtención del aceite se realizó a partir de plantas frescas, o con un máximo de dos días de almacenamiento. Se recolectaron ramas, tallos, talluelos, hojas verdes y flores de *Minthostachys mollis* provenientes de las alturas del Centro Poblado Menor de Muruhuay, Distrito de Acobamba, ciudad de Tarma, Departamento de Junín (3 080 m.s.n.m.), los cuales fueron conservados a temperatura de ambiente sin desecar, exponer al sol o lavarlos hasta el momento de la extracción del aceite esencial. En total se recolectó aproximadamente 5 Kg. de materia prima. A la muestra recolectada se le roció alcohol al 70% en spray para desinfectarla y sacar a los insectos que estuvieran

en las hojas. Las muestras adquiridas fueron envueltas en papel kraft para su conservación hasta su posterior procesamiento (ver anexos).

3.5.1.1. b Identificación taxonómica

Se recolectaron 3 muestras completas de la planta de *M. mollis* “muña” (incluida tierra del lugar). La muestra recolectada fue estudiada y determinada según el sistema de clasificación de Cronquist (1988). Esta clasificación se realizó en las instalaciones del **Herbario del Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales Terapéuticos “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM** y estuvo a cargo de la curator Mg. **Margarita Lobatón Erazo** (ver anexos).

3.5.1.1. c Extracción del aceite esencial

La muestra se transportó a las instalaciones del Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM; se depuró la muestra limitándose a flores, talluelos y hojas frescas, se dejó reposar en la cámara de secado que contenía en su interior un sistema de aire comprimido que permitía oxigenar la muestra por un lapso de 5 días, obteniéndose al final una muestra de 750 gr. Posteriormente se transporto la muestra al **Laboratorio de Síntesis, Semisíntesis y Productos Naturales** del referido instituto para la obtención del aceite esencial, que estuvo a cargo del **Dr. Américo Castro Luna**.

La obtención del aceite esencial se efectuó con el método por arrastre de vapor de agua, que es el más recomendable por no usar ningún solvente.¹³⁵ La cantidad total que entró en el equipo de destilación fue de 600 gr. de materia

prima. Después de la condensación, el destilado se recibió en un depósito estéril y cerrado, aquí se observó un estado difásico entre agua y aceite esencial, debido a la diferencia de densidades, se recogió en un tubo de ensayo y para separar el aceite esencial del agua se añadió Sulfato de Sodio Anhidro, se agitó por 1 minuto y se apreció que el agua forma cristales con el sulfato en la base del tubo. El aceite se separó y se depositó en un frasco ámbar estéril y se dejó refrigerar.

3.5.1.2 Obtención de los Microorganismos

3.5.1.2. a Crecimiento de cepas bacterianas estándares

Se trabajó con cepas estándar ATCC (American Type Culture Collection) de 3 especies bacterianas implicadas en la patología periapical:

Fusobacterium nucleatum ATCC referencia 25586

Prevotella melaninogénica ATCC referencia 25611

Enterococcus faecalis ATCC referencia 29212

3.5.1.2. b Reconstitución de las cepas estándar ATCC

Cada una de las cepas ATCC se mantuvo en condiciones de refrigeración normal (2 - 8 °C) desde el momento de su adquisición hasta su reactivación en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de UNMSM. Las cepas están contenidas en sus respectivos envases Kwik – Stick™, luego de retirarlas de su envase y siguiendo todas las instrucciones fueron sembradas en una placa conteniendo un medio de cultivo enriquecido y bajo las

condiciones de anaerobiosis necesarias para cada bacteria. Este paso se realizó en un tiempo no mayor a 5 minutos.

En el caso de *Fusobacterium nucleatum* y *Prevotella melaninogénica*: Para viabilizar estas cepas bacterianas se utilizaron placas con Agar Shadler suplementado con sangre de cordero en las cuales se sembró el contenido del vial. Se llevaron a la incubadora a 37° C, en jarra de anaerobiosis con su respectivo sobre de Anaerogen® por el lapso de 7 días. Adicionalmente y como procedimiento confirmatorio se les realizó una coloración Gram a cada una de ellas, observándose en el microscopio óptico microorganismos Gramnegativos.

En el caso de *Enterococcus faecalis*: Para viabilizar esta cepa bacteriana se utilizó una placa con agar Bilis Esculina, en la cual se sembró el contenido del vial. Se llevó a incubadora a 37 °C, en condiciones de microanaerofilia, durante 48 horas. Al cabo de las 48 horas se realizó la respectiva coloración de Gram, observándose en el microscopio óptico microorganismos Grampositivos.

3.5.1.2.c Recolección y cultivo de muestra de conducto radicular

a. Pasos previos:

Preparación de los medios de transporte y de cultivo (caldo tioglicolato y agar schaedler).

b. Procedimiento:

1. Selección de muestra

Los pacientes a recibir terapia endodóntica presentaron piezas dentarias monoradiculares de un solo conducto con diagnóstico de

Periodontitis apical crónica. Se seleccionó 2 tipos de piezas con Periodontitis apical crónica:

- *Pieza dentaria sin tratamiento endodóntico previo:* determinado clínicamente por presencia de una lesión cariosa, cambio de coloración y respuesta a las pruebas de vitalidad pulpar (respuesta positiva) al aire, al frío y al calor, debiendo existir presencia de lesión periapical, determinado por presencia de una imagen radiolúcida perirradicular en la radiografía periapical.
- *Pieza dentaria tratada endodónticamente con infección persistente:* determinado clínicamente por la presencia de material de obturación en el conducto radicular (conos de gutapercha), cambio de coloración y respuesta a las pruebas de vitalidad pulpar (respuesta positiva) a la percusión vertical, debiendo existir presencia de lesión periapical, determinado por presencia de una imagen radiolúcida perirradicular en la radiografía periapical.

Aislamiento y apertura cameral:

Luego de realizar el diagnóstico se procedió a realizar el aislamiento absoluto de la pieza dentaria con dique de goma y uso de clamps; con la subsiguiente desinfección de la misma (corona clínica y campo quirúrgico) por medio de la acción bactericida del etanol 70% para así evitar falsos positivos.

Después se procedió a realizar la apertura cameral con el uso de fresa redonda mediana de grano grueso, y a desinfectar la porción coronal de la cámara pulpar con etanol 70%, previo aislamiento de ésta por medio de una bolilla de algodón.

2. Toma de muestra

- *Pieza dentaria con PAC sin tratamiento endodóntico previo*
 - Se empleó 2 ml. de suero fisiológico al 9% como solución irrigadora en la cámara pulpar y en el canal radicular por considerarla inocua para las especies bacterianas presentes.
 - Realizar un leve debridamiento por 30 segundos con una lima Kerr #10 ó 15 para así conseguir una máxima suspensión de bacterias en el medio.
 - Luego de realizar este procedimiento, insertar puntas de papel seco y estéril dentro del conducto radicular por un espacio de 3 segundos.
 - La muestra obtenida fue colocada inmediatamente dentro de un tubo de ensayo conteniendo el medio de transporte (caldo de thioglicolato) y se transportó la muestra al laboratorio para su cultivo en medio agar Schaedler. Este paso se realizó en un tiempo no mayor de 15 minutos.

- *Pieza dentaria con PAC tratada endodónticamente con infección persistente*
 - Después de haber realizado la apertura cameral con fresa redonda mediana de grano grueso, se procedió a realizar la desobstrucción del conducto radicular con la ayuda de xilol y limas Kerr # 15, 20, 25 de 21mm.
 - Se empleó 2 ml. de suero fisiológico al 9% como solución irrigadora en la cámara pulpar y en el canal radicular por considerarla inocua para las especies bacterianas presentes.
 - Se realizó un leve debridamiento por 30 segundos con una lima Kerr # 10 ó 15 para así conseguir una máxima suspensión de bacterias en el medio.
 - Luego de realizar este procedimiento, se insertó puntas de papel seco y estéril dentro del conducto radicular por un espacio de 3 segundos.
 - La muestra obtenida fue colocada inmediatamente dentro de un tubo de ensayo conteniendo el medio de transporte (caldo de thioglicolato) y se transportó la muestra al laboratorio para su cultivo en medio agar Schaedler.

3.5.1.3 Prueba de efectividad antibacteriana

Luego de reactivadas las cepas se procedió a realizar la siembra de cada una de las especies bacterianas en placas petri (por quintuplicado en caso de cepas estándares ATCC y por triplicado en caso de muestras de conducto

radicular) con los medios y en condiciones de anaerobiosis respectivas a cada especie bacteriana.

- Se extrajeron con asa de siembra 3 colonias de la cepa reactivada (en todos los casos) y se inocularon en 2 ml. de suero fisiológico al 9% en un tubo de ensayo, se agitó el tubo por 5 minutos, observando una turbidez de 0.5 en la escala de Mc. Farland.
- Con micropipeta se extrajeron 100 µl de cada una de las suspensiones mencionadas y este contenido se depositó en las placas con agar, con un hisopo estéril embebido en la suspensión mencionada, se procedió a realizar una siembra por diseminación, sembrados en Agar Schaedler suplementado con sangre de cordero en caso de las especies anaerobias estrictas *F. nucleatum*, *P. melaninogénica* y la muestra de conducto radicular; en el caso de la especie anaerobia facultativa *E. faecalis*, la siembra fue en Agar Bilis Esculina. Este paso se realizó en un tiempo no mayor a 15 minutos.
- Con pinzas estériles se procedió a colocar en cada placa 1 disco de papel de filtro embebido en 10 µl de alcohol al 70% (control negativo), 1 disco de paramonoclorofenol alcanforado (control positivo), 1 disco de papel de filtro embebido en el aceite esencial de *Minthostachys mollis* puro, 1 disco de papel de filtro embebido en el aceite esencial de *Minthostachys mollis* diluido al 50%, y 1 disco de papel de filtro embebido en el aceite esencial de *Minthostachys mollis*

diluido al 25%; a una distancia no menor de 15 mm. entre ellos y a 1.5 cm. del borde de la placa, presionándolos firmemente sobre la superficie del agar; todos estos discos se embebieron previamente en un recipiente por separado, para evitar que las sustancias difundan directamente en la placa.

- Cada una de las 3 especies bacterianas ATCC fueron sembradas por quintuplicado, de manera que al final se obtuvieron un total de 15 placas petri.
- Cada una de las muestras de conducto radicular fueron sembradas por triplicado, de manera que al final se obtuvieron un total de 6 placas petri.
- Se dejó secar de 2 a 3 minutos.
- Las placas conteniendo las bacterias anaerobias estrictas fueron transportadas de inmediato hacia la jarra de anaerobiosis.
- Las placas conteniendo las bacterias anaerobias facultativas fueron transportadas de inmediato hacia la incubadora a 37 °C.

3.5.1.4 Medición del diámetro de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano

El diámetro de los halos de inhibición, incluyendo el diámetro del disco embebido, se midió con una regla de metal milimetrada y se registraron los

datos en la ficha de recolección de datos correspondiente para cada cepa (ver anexos).

3.5.1.5 Evaluación de la efectividad antibacteriana

Para la interpretación de los resultados en la evaluación de tipo cuantitativa se tomaron como referencia los diámetros de halo de inhibición. Para la interpretación de los resultados en la evaluación de tipo cualitativa se tomaron como referencia las pautas por Duraffourd¹²⁰

3.5.2 Recolección de datos

Se realizó una ficha de datos en la cual se anotaron los resultados de la prueba de difusión en agar con discos (ver anexos). La recolección de los datos se realizó de forma manual y visualmente.

Para la medición de los halos se utilizó una regla correctamente calibrada. Se verificó cada una de las fichas para evitar errores u omisiones en los datos que pudieran perjudicar la investigación.

La lectura se realizó midiendo los halos de inhibición sobre el crecimiento del microorganismo alrededor del disco. El diámetro de esta zona de inhibición es directamente proporcional a la actividad bactericida del aceite esencial sobre el microorganismo estudiado.¹²⁰

3.5.2.1 Procesamiento de resultados

La interpretación de los resultados que se obtuvieron en función a las características de las variables, objetivos e hipótesis, se compararon los resultados obtenidos entre cada grupo de estudio (diluciones). Para esto se utilizó el método de análisis estadístico.

Los análisis se realizaron con el Software SPSS versión 15 (Statistical Package for Social Sciences). Se empleó un análisis descriptivo para obtener los promedios, desviaciones estándar y errores estándar de las variables continuas con la ayuda del Software Excel Windows Vista.

3.5.2.2 Análisis de resultados

Se aplicó la prueba **valor P** dentro del grupo de estudio (diluciones del aceite esencial de “muña”). El valor P Mide la probabilidad de que una diferencia entre grupos durante un experimento haya sucedido por casualidad. ¹⁶¹

Para establecer si la distribución de los promedios de halos de inhibición difieren entre si según la dilución del aceite esencial de “muña” en la efectividad antibacteriana tipo cuantitativa, se utilizó la prueba de **Kruskal-Wallis**. En los casos que hubo distribución significativa se aplicó la prueba de comparaciones múltiples o **prueba de Tukey** ¹⁶¹

Para establecer si la distribución de los halos de inhibición difieren entre si según la dilución del aceite esencial de “muña” en la efectividad antibacteriana tipo cualitativa, se utilizó la prueba **Chi cuadrado**.

IV RESULTADOS

Aceite esencial

Se obtuvo aproximadamente 15 ml de aceite esencial provenientes de 600 gr. de muestra (ver anexos), mediante la técnica de arrastre de vapor, lo cual representa un rendimiento de 2.5% (Gravedad específica del aceite 1,0249).

El aceite esencial obtenido tuvo las siguientes características organolépticas:

Color : Ligeramente verde amarillento.

Olor : Agradable, semejante a mentol.

Aspecto : Líquido, fluido, transparente.

Sabor : Picante.

Acción antibacteriana

Para la presente investigación fueron seleccionadas cuatro cepas bacterianas adquiridas de los laboratorios Genlab[®], de las cuales se pudieron reactivar satisfactoriamente tres de ellas:

- *Fusobacterium nucleatum* ATCC[®] 25586
- *Prevotella melaninogénica* ATCC[®] 25845
- *Enterococcus faecalis* ATCC[®] 29212

Las bacterias fueron reactivadas en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la UNMSM. La cepa bacteriana *Porphyromonas gingivalis* ATCC[®] 33277 no pudo ser reactivada.

A su vez fue tomado en cuenta muestras tomadas de conducto radicular de pacientes que acudieron a la clínica de Post Grado de Endodoncia de la UNMSM y presentaban como diagnóstico Periodontitis apical crónica (PAC). Se realizó la prueba de susceptibilidad en todas las cepas reactivadas y sembradas.

CUADRO 3. PRESENCIA DE HALO DE INHIBICION EN CULTIVOS DE *F. nucleatum* ENFRENTADOS AL ACEITE ESENCIAL DE *M. mollis* 1 SEMANA

DILUCIONES	HALO DE INHIBICION			
	Presencia		Ausencia	
	N	%	N	%
Aceite muña al 100%	5	100	0	0
Aceite muña al 50%	5	100	0	0
Aceite muña al 25%	3	60	2	40
Control +	5	100	0	0
Control -	0	0	5	100

Cuadro 3. Se presenta la frecuencia de halos de inhibición sobre la bacteria anaerobia estricta *Fusobacterium nucleatum*. Tanto con el aceite de “muña” al 100%, al 50% y el control + mostraron HICB en la totalidad de placas.

GRAFICO 1. PRESENCIA DE HALO DE INHIBICION EN CULTIVOS DE *F. nucleatum* ENFRENTADOS AL ACEITE ESENCIAL DE *M. mollis* 1 SEMANA

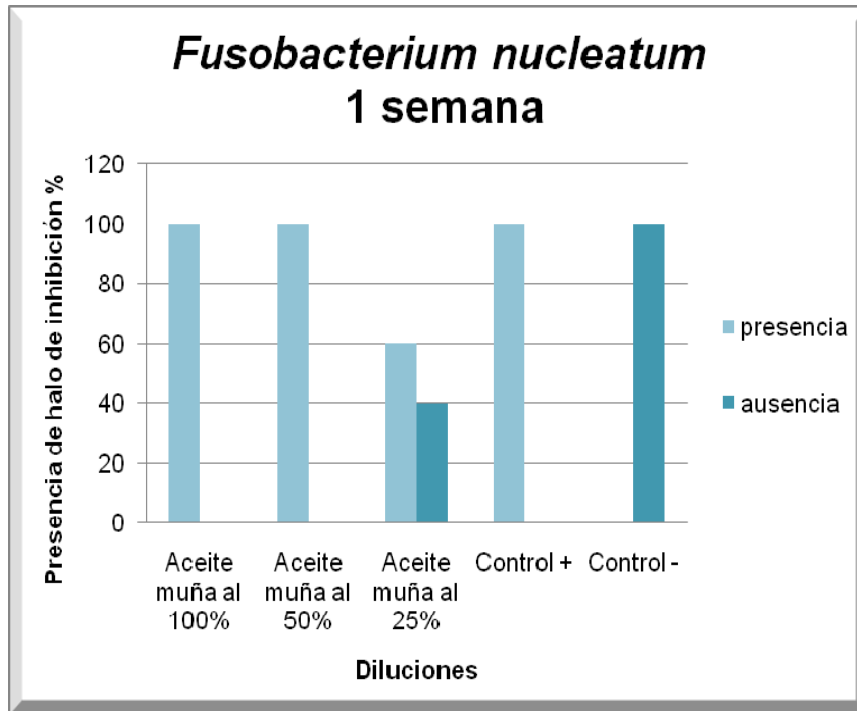


Gráfico 1. Ilustra la frecuencia de halos de inhibición de las diferentes diluciones del aceite de “muña” sobre la bacteria anaerobia estricta *Fusobacterium nucleatum*. Se observa que hubo ausencia de HICB en todas las placas que contenían el disco embebido con el control - .

**CUADRO 4. EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE
ESENCIAL DE *M. mollis* EN CULTIVOS DE *F. nucleatum* 1
SEMANA**

EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA CUANTITATIVAMENTE				
DILUCIONES	V min*	V max†	Media‡	DE§
Aceite muña al 100%	10.5	15.0	12.7	1.92
Aceite muña al 50%	9.0	11.0	9.9	0.74
Aceite muña al 25%	5.0	9.0	7.2	2.02
Control +	13.0	18.5	15.3	2.44
Control -	5.0	5.0	5.0	0.00

*Valor mínimo

‡Promedio de halos que incluye el diámetro del disco (5 mm)

†Valor máximo

§Desviación estándar

Cuadro 4. Se observa la efectividad antibacteriana de las diferentes diluciones del aceite de “muña” sobre la bacteria anaerobia estricta *Fusobacterium nucleatum*, el disco embebido con la dilución del aceite de “muña” 100% es mayor a las otras diluciones en cuanto a promedios de halos de inhibición; cuanto mayor es la concentración del aceite esencial de “muña”, mayor es el diámetro de halo inhibitorio. El valor de la desviación estándar fue mayor para el control +. Se realizó la prueba estadística de **Kruskal y Wallis** con las tres diluciones de aceite esencial de *M. mollis* y el grupo control (control positivo: Paramonoclorofenol alcanforado) la cual dio como resultado **p (0.001) < 0.05** (estadísticamente significativo).

Luego se realizó la prueba de comparaciones múltiples **HSD de Tukey** entre las distintas diluciones del aceite esencial de *M. mollis* y el grupo control (control positivo: Paramonoclorofenol alcanforado) dando como resultados: aceite al 100% - Paramonoclorofenol alcanforado dio un valor **p (0.172) > 0.05 (estadísticamente no significativo)**; aceite al 50% - Paramonoclorofenol alcanforado dio un valor **p (0.002) < 0.05 (estadísticamente significativo)**; aceite al 25% - Paramonoclorofenol alcanforado dio un valor **p (0.000) < 0.05 (estadísticamente significativo)**. A su vez, se realizó la misma prueba entre diluciones del aceite esencial dando como resultados: aceite al 100% - aceite al 50% dio un valor **p (0.129) > 0.05 (estadísticamente no significativo)**; aceite al 100% - aceite al 25% dio un valor **p (0.002) < 0.05 (estadísticamente significativo)**; aceite al 50% - aceite al 25% dio un valor **p (0.150) > 0.05 (estadísticamente no significativo)**.

GRAFICO 2. EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *M. mollis* EN CULTIVOS DE *F. nucleatum* 1 SEMANA

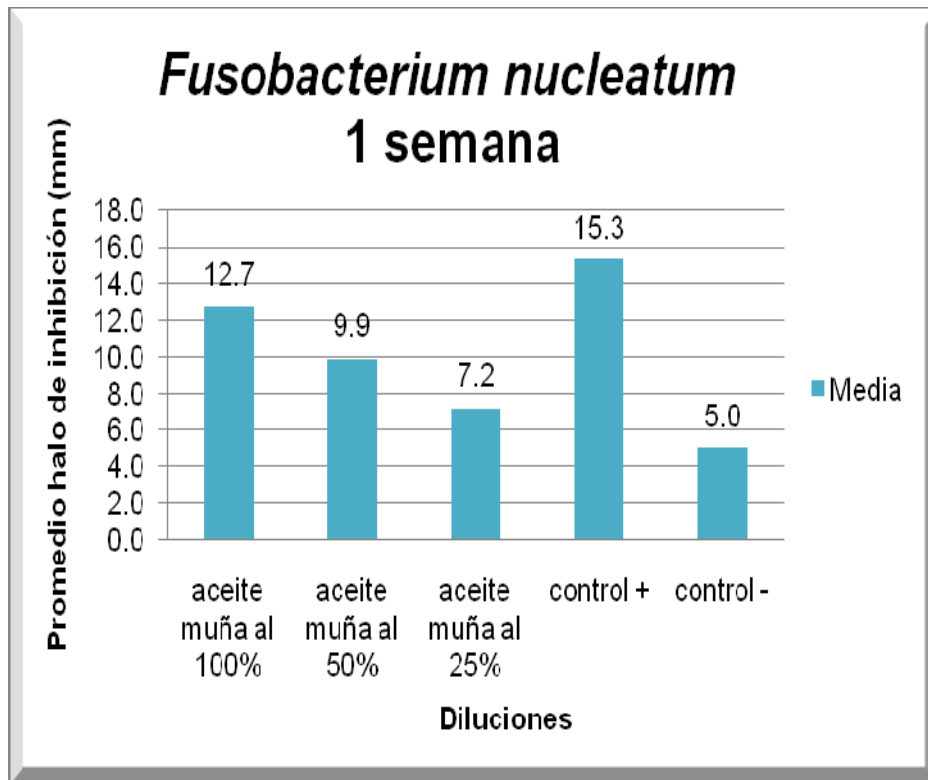


Gráfico 2. Ilustra la diferencia entre los promedios de halos de inhibición (mm.) de las diferentes diluciones del aceite de “muña” sobre *F. nucleatum*, observándose que la dilución de aceite de “muña puro tiene mayor efectividad antibacteriana que las diluciones al 50% y 25%.

**CUADRO 5. EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE
ESENCIAL DE *M. mollis* EN CULTIVOS DE *F. nucleatum* 1
SEMANA SEGÚN LAS PAUTAS DE DURAFFOURD**

DILUCION	EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA CUALITATIVAMENTE					
	nula*		sensible†		muy sensible‡	
	N	%	N	%	n	%
Aceite muña al 100%	0	0	3	60	2	40
Aceite muña al 50%	0	0	5	100	0	0
Aceite muña al 25%	2	40	3	60	0	0
Control +	0	0	2	40	3	60
Control -	5	100	0	0	0	0

*HICB menor a 8mm. †HICB de 8 a 14mm. ‡HICB de 14 a 20mm.

Cuadro 5. Podemos observar la efectividad antibacteriana cualitativamente del aceite esencial de *M. mollis* “muña” sobre la bacteria anaerobia estricta *Fusobacterium nucleatum*; según las pautas de Duraffourd, *F. nucleatum* presenta una sensibilidad límite al aceite de “muña” puro en un 60% y una sensibilidad moderada en un 40% de las placas. Se realizó la prueba estadística de **Chi Cuadrado** entre las diluciones del aceite esencial de *M. mollis* obteniéndose un valor **p (0.068) > 0.05 (estadísticamente no significativo)**.

GRAFICO 3. EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *M. Mollis* EN CULTIVOS DE *F. nucleatum* 1 SEMANA SEGÚN LAS PAUTAS DE DURAFFOURD

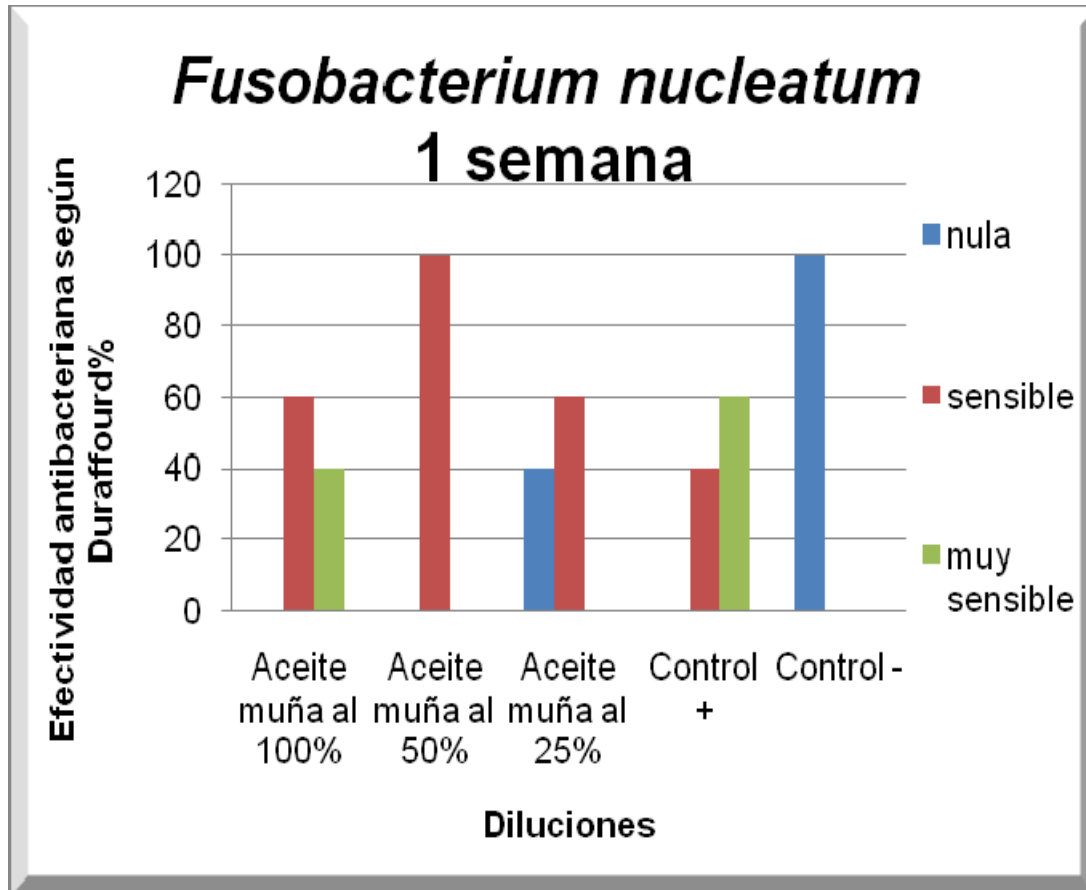


Gráfico 3. Ilustra la efectividad antibacteriana cualitativamente de las diferentes diluciones del aceite de “muña” sobre *F. nucleatum*. Se aprecia una sensibilidad límite en todas las diluciones a excepción del alcohol al 70% y una sensibilidad moderada tanto para el Paramonoclorofenol alcanforado y el aceite de “muña” puro, respectivamente. Se observa que a una mayor concentración de aceite esencial mayor efectividad antibacteriana.

**CUADRO 6. PRESENCIA DE HALO DE INHIBICION EN
CULTIVOS DE *P. melaninogénica* ENFRENTADOS AL ACEITE
ESENCIAL DE *M. mollis* 1 SEMANA**

DILUCIONES	HALO DE INHIBICION			
	Presencia		Ausencia	
	N	%	N	%
Aceite muña 100%	5	100	0	0
Aceite muña al 50%	5	100	0	0
Aceite muña al 25%	2	40	3	60
Control +	5	100	0	0
Control -	0	0	5	100

Cuadro 6. Se presenta la frecuencia de halos de inhibición sobre la bacteria anaerobia estricta *Prevotella melaninogénica*. Tanto con el aceite de “muña” puro, al 50% y el Paramonoclorofenol alcanforado mostraron HICB en la totalidad de placas.

GRAFICO 4. PRESENCIA DE HALO DE INHIBICION EN CULTIVOS DE *P. melaninogénica* ENFRENTADOS AL ACEITE ESENCIAL DE *M. mollis* 1 SEMANA

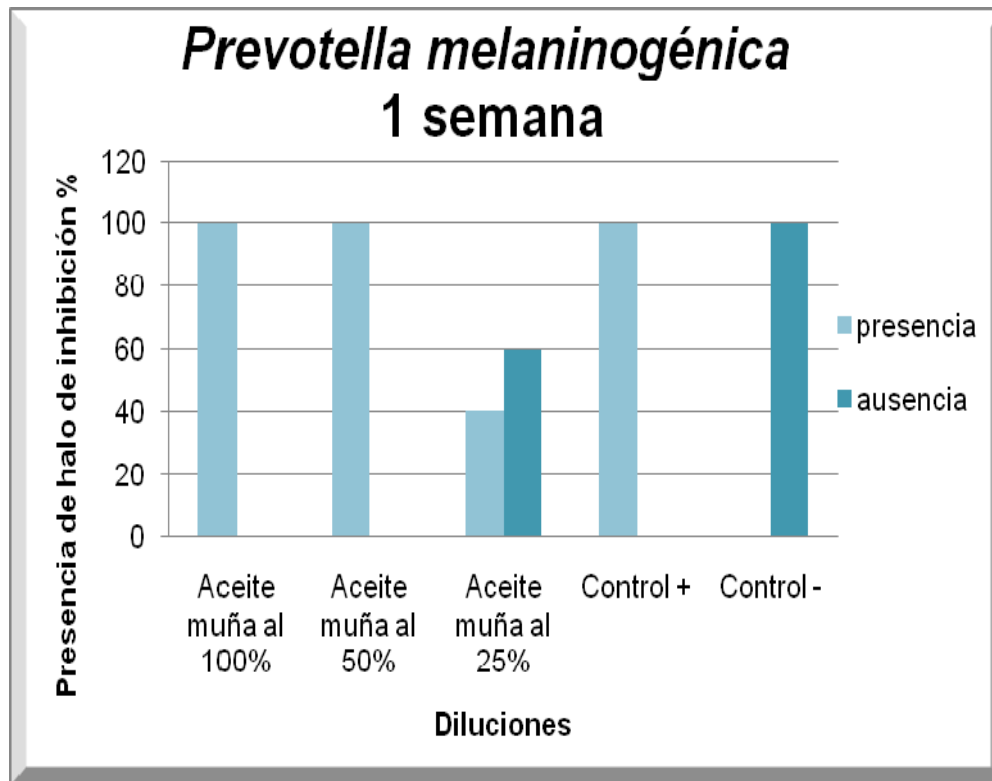


Gráfico 4. Ilustra la frecuencia de halos de inhibición de las diferentes diluciones del aceite de “muña” sobre la bacteria anaerobia estricta *Prevotella melaninogénica*. Se observa que hubo ausencia de HICB en todas las placas que contenían el disco embebido con el alcohol al 70% (control -).

**CUADRO 7. EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE
ESENCIAL DE *M. Mollis* EN CULTIVOS DE *P. melaninogénica* 1
SEMANA**

DILUCIONES	EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA CUANTITATIVAMENTE			
	V min*	V max†	Media‡	D E§
Aceite muña al 100%	10.5	13.0	11.9	1.14
Aceite muña al 50%	8.0	10.0	9.0	0.71
Aceite muña al 25%	5.0	8.0	6.0	1.41
Control +	11.0	15.0	13.2	1.64
Control -	5.0	5.0	5.0	0.00

*Valor mínimo
†Valor máximo
‡Promedio de halos que incluye el diámetro del disco (5 mm)
§Desviación estándar

Cuadro 7. Se observa la efectividad antibacteriana de las diferentes diluciones del aceite de “muña” sobre la bacteria anaerobia estricta *Prevotella melaninogénica*, el disco embebido con la dilución del aceite de “muña” 100% es mayor a las otras diluciones en cuanto a promedios de halos de inhibición; cuanto mayor es la concentración del aceite esencial de “muña”, mayor es el diámetro de halo inhibitorio. El valor de la desviación estándar fue mayor para el control +. Se realizó la prueba estadística de **Kruskal y Wallis** con las tres diluciones de aceite esencial de *M. mollis* y el grupo control (control positivo: Paramonoclorofenol alcanforado) la cual dio como resultado **p (0.001) < 0.05 (estadísticamente significativo)**.

Luego se realizó la prueba de comparaciones múltiples **HSD de Tukey** entre las distintas diluciones del aceite esencial de *M. mollis* y el grupo control (control positivo: Paramonoclorofenol alcanforado) dando como resultados:

aceite al 100% - Paramonoclorofenol alcanforado dio un valor **p (0.400) > 0.05 (estadísticamente no significativo)**; aceite al 50% - Paramonoclorofenol alcanforado dio un valor **p (0.000) < 0.05 (estadísticamente significativo)**; aceite al 25% - Paramonoclorofenol alcanforado dio un valor **p (0.000) < 0.05 (estadísticamente significativo)**. A su vez, se realizó la misma prueba entre diluciones del aceite esencial dando como resultados: aceite al 100% - aceite al 50% dio un valor **p (0.012) < 0,05 (estadísticamente significativo)**; aceite al 100% - aceite al 25% dio un valor **p (0.000) < 0.05 (estadísticamente significativo)**; aceite al 50% - aceite al 25% dio un valor **p (0.009) < 0.05 (estadísticamente significativo)**.

GRAFICO 5. EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *M. Mollis* EN CULTIVOS DE *P. melaninogénica* 1 SEMANA

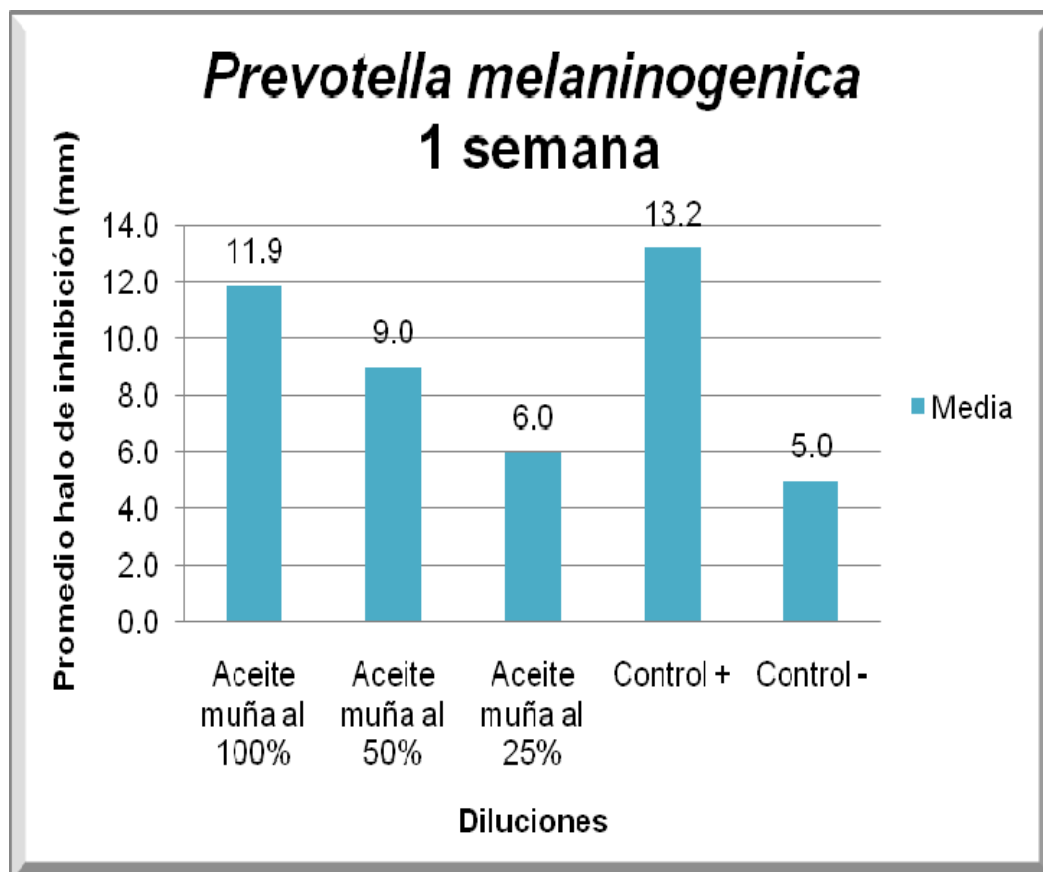


Gráfico 5. . Ilustra la diferencia entre los promedios de halos de inhibición (mm.) de las diferentes diluciones del aceite de “muña” sobre *P. melaninogénica*, observándose que el Paramonoclorofenol alcanforado tiene mejor efecto antibacteriano que la dilución de aceite de “muña” puro la cual obtiene el segundo lugar seguido de las diluciones de aceite de muña al 50% y 25% respectivamente.

**CUADRO 8. EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE
ESENCIAL DE *M. Mollis* EN CULTIVOS DE *P. melaninogénica* 1
SEMANA SEGÚN LAS PAUTAS DE DURAFFOURD**

DILUCION	EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA CUALITATIVAMENTE					
	nula*		sensible†		muy sensible‡	
	n	%	n	%	n	%
Aceite muña al 100%	0	0	5	100	0	0
Aceite muña al 50%	0	0	5	100	0	0
Aceite muña al 25%	4	80	1	20	0	0
Control +	0	0	2	40	3	60
Control -	5	100	0	0	0	0

*HICB menor a 8mm. †HICB de 8 a 14mm. ‡HICB de 14 a 20mm.

Cuadro 8. Podemos observar la efectividad antibacteriana cualitativamente del aceite esencial de *M. mollis* “muña” sobre la bacteria anaerobia estricta *Prevotella melaninogénica*; según las pautas de Duraffourd, *P. melaninogénica* presenta una sensibilidad límite al aceite de “muña” puro y al 50% en la totalidad de las placas. Se realizó la prueba estadística de **Chi Cuadrado** entre las diluciones del aceite esencial de *M. mollis* obteniéndose un valor **p (0.004) < 0.05 (estadísticamente significativo)**.

**GRAFICO 6. EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE
ESENCIAL DE *M. Mollis* EN CULTIVOS DE *P. melaninogénica* 1
SEMANA SEGÚN LAS PAUTAS DE DURAFFOURD**

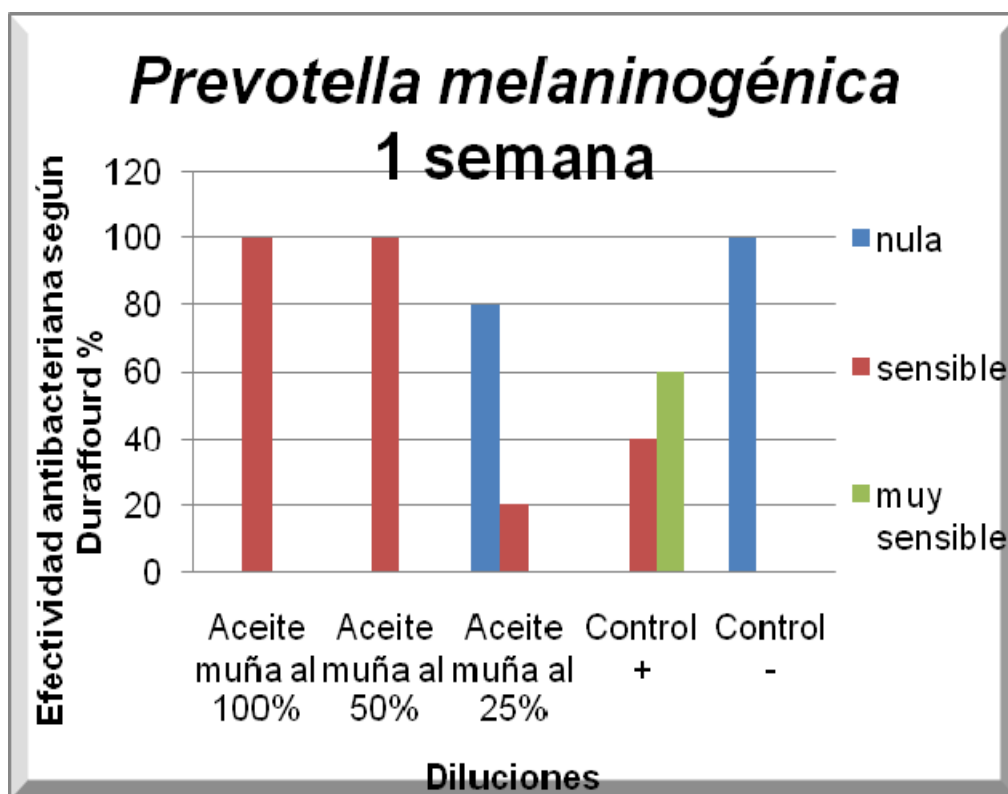


Gráfico 6. Ilustra la efectividad antibacteriana cualitativamente de las diferentes diluciones del aceite de “muña” sobre *P. melaninogénica*. Se aprecia una sensibilidad límite en todas las diluciones a excepción del alcohol al 70% y una sensibilidad moderada sobre el Paramonoclorofenol alcanforado. Se observa una marcada sensibilidad de *P. melaninogénica* tanto para el aceite de “muña” puro y al 50%.

**CUADRO 9. PRESENCIA DE HALO DE INHIBICION EN
CULTIVOS DE *E. faecalis* ENFRENTADOS AL ACEITE
ESENCIAL DE *M. mollis* 48 H**

DILUCIONES	HALO DE INHIBICION			
	Presencia		Ausencia	
	N	%	N	%
Aceite muña al 100%	5	100	0	0
Aceite muña al 50%	4	80	1	20
Aceite muña al 25%	0	0	5	100
Control +	5	100	0	0
Control -	0	0	5	100

Cuadro 9. Se presenta la frecuencia de halos de inhibición sobre la bacteria anaerobia facultativa *Enterococcus faecalis* a las 48 horas. Tanto con el aceite de “muña” puro y el Paramonoclorofenol alcanforado mostraron HICB en la totalidad de placas.

GRAFICO 7. PRESENCIA DE HALO DE INHIBICION EN CULTIVOS DE *E. faecalis* ENFRENTADOS AL ACEITE ESENCIAL DE *M. mollis* 48 H

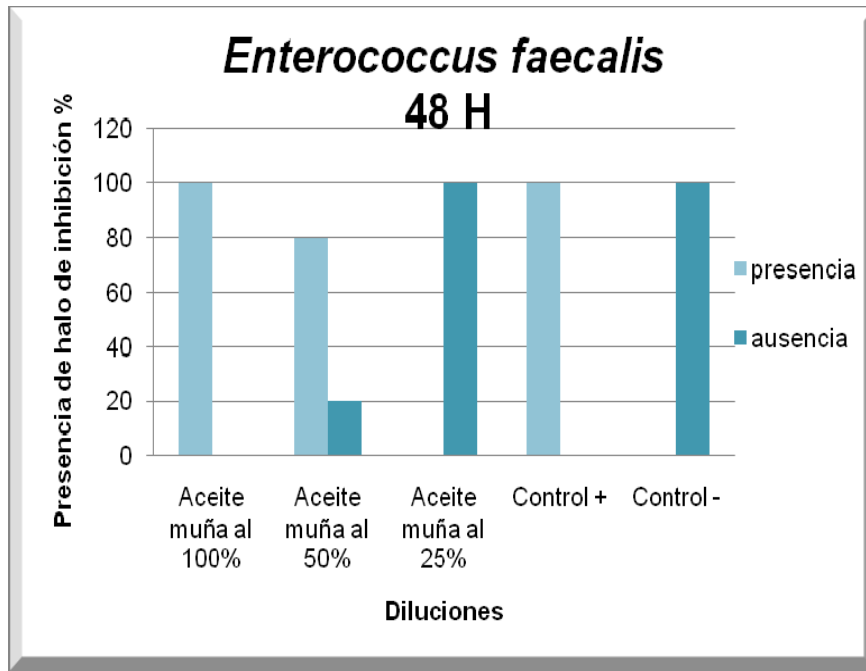


Gráfico 7. Ilustra la frecuencia de halos de inhibición de las diferentes diluciones del aceite de “muña” sobre la bacteria anaerobia facultativa *Enterococcus faecalis* a las 48 horas. Se observa que hubo ausencia de HICB en todas las placas que contenían el disco embebido con el aceite de “muña” al 25% y alcohol al 70% (control -).

**CUADRO 10. EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE
ESENCIAL DE *M. Mollis* EN CULTIVOS DE *E. faecalis* 48 H**

EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA CUANTITATIVAMENTE				
DILUCIONES	V min*	V max†	Media‡	D E§
Aceite muña al 100%	8.5	10.0	9.0	0.61
Aceite muña al 50%	5.0	8.0	7.0	1.27
Aceite muña al 25%	5.0	5.0	5.0	0.00
Control +	11.0	14.0	12.2	1.30
Control -	5.0	5.0	5.0	0.00

*Valor mínimo
†Promedio de halos que incluye el diámetro del disco (5 mm)
‡Valor máximo
§Desviación estándar

Cuadro 10. Se observa la efectividad antibacteriana de las diferentes diluciones del aceite de “muña” sobre la bacteria anaerobia facultativa *Enterococcus faecalis* a las 48 horas, la dilución del aceite de “muña” 100% es mayor a las otras diluciones en cuanto a promedios de halos de inhibición; cuanto mayor es la concentración del aceite esencial de “muña”, mayor es el diámetro de halo inhibitorio. El valor de la desviación estándar fue mayor para el control +. Se realizó la prueba estadística de **Kruskal y Wallis** con las tres diluciones de aceite esencial de *M. mollis* y el grupo control (control positivo: Paramonoclorofenol alcanforado) la cual dio como resultado **p (0.000) < 0.05** (estadísticamente significativo).

Luego se realizó la prueba de comparaciones múltiples **HSD de Tukey** entre las distintas diluciones del aceite esencial de *M. mollis* y el grupo control (control positivo: Paramonoclorofenol alcanforado) dando como resultados:

aceite al 100% - Paramonoclorofenol alcanforado dio un valor **p (0.000) < 0.05 (estadísticamente significativo)**; aceite al 50% - Paramonoclorofenol alcanforado dio un valor **p (0.000) < 0.05 (estadísticamente significativo)**; aceite al 25% - Paramonoclorofenol alcanforado dio un valor **p (0.000) < 0.05 (estadísticamente significativo)**. A su vez, se realizó la misma prueba entre diluciones del aceite esencial dando como resultados: aceite al 100% - aceite al 50% dio un valor **p (0.022) < 0,05 (estadísticamente significativo)**; aceite al 100% - aceite al 25% dio un valor **p (0.000) < 0.05 (estadísticamente significativo)**; aceite al 50% - aceite al 25% dio un valor **p (0.022) < 0.05 (estadísticamente significativo)**.

GRAFICO 8. EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *M. Mollis* EN CULTIVOS DE *E. faecalis* 48 H

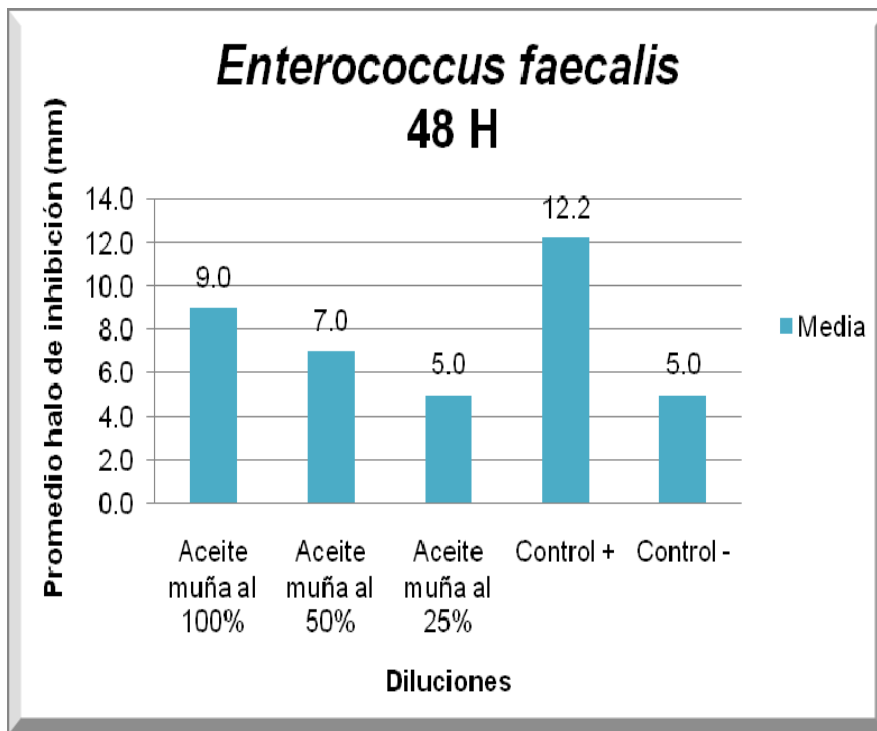


Gráfico 8. Ilustra la diferencia entre los promedios de halos de inhibición (mm.) de las diferentes diluciones del aceite de “muña” sobre *E. faecalis* a las 48 horas, observándose que el Paramonoclorofenol alcanforado tiene mejor efecto antibacteriano que la dilución de aceite de “muña” puro la cual obtiene el segundo lugar seguido de las dilución de aceite de muña al 50 %; No hubo efectividad antibacteriana del aceite de “muña” al 25%.

**CUADRO 11. EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE
ESENCIAL DE *M. Mollis* EN CULTIVOS DE *E. faecalis* 48 H
SEGÚN LAS PAUTAS DE DURAFFOURD**

DILUCION	EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA CUALITATIVAMENTE					
	nula*		sensible†		muy sensible‡	
	N	%	n	%	N	%
Aceite muña al 100%	0	0	5	100	0	0
Aceite muña al 50%	3	60	2	40	0	0
Aceite muña al 25%	5	100	0	0	0	0
Control +	0	0	4	80	1	20
Control -	5	100	0	0	0	0

*HICB menor a 8mm. †HICB de 8 a 14mm. ‡HICB de 14 a 20mm.

Cuadro 11. Podemos observar la efectividad antibacteriana cualitativamente del aceite esencial de *M. mollis* “muña” sobre la bacteria anaerobia facultativa *Enterococcus faecalis* a las 48 horas; según las pautas de Duraffourd, *E. faecalis* presenta una sensibilidad límite al aceite de “muña” puro en la totalidad de las placas. Se realizó la prueba estadística de **Chi Cuadrado** entre las diluciones del aceite esencial de *M. mollis* obteniéndose un valor **p (0.003) < 0.05 (estadísticamente significativo)**.

GRAFICO 9. EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *M. Mollis* EN CULTIVOS DE *E. faecalis* 48 H. SEGÚN LAS PAUTAS DE DURAFFOURD

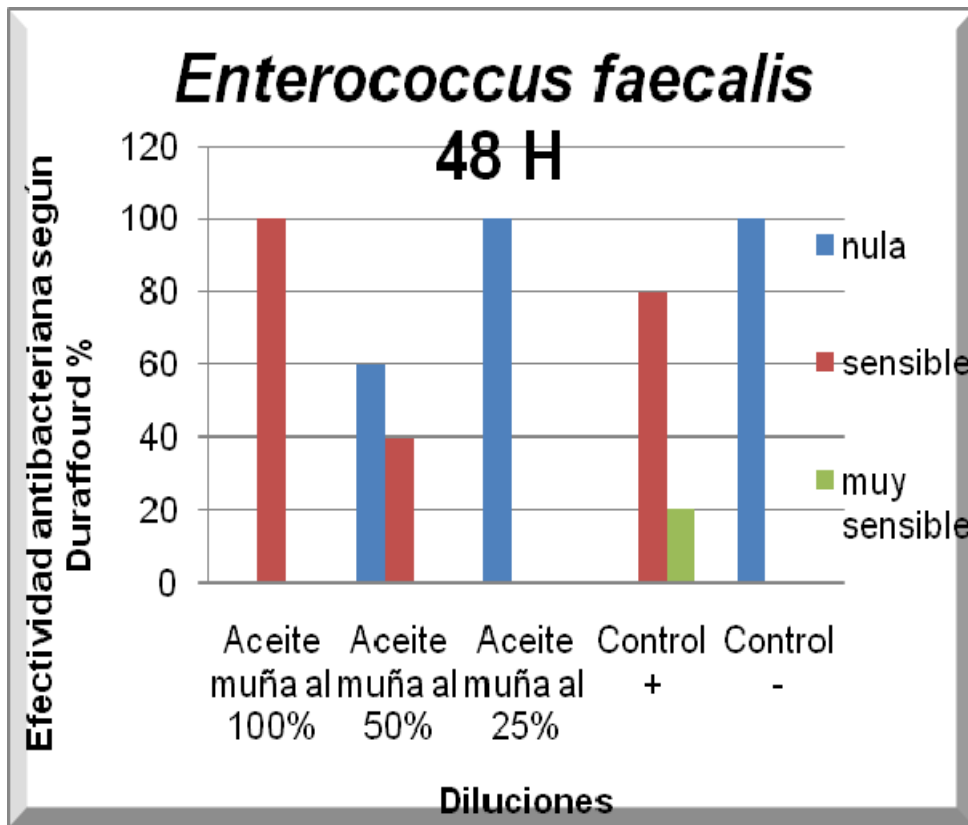


Gráfico 9. Ilustra la efectividad antibacteriana cualitativamente de las diferentes diluciones del aceite de “muña” sobre *E. faecalis*. Se aprecia, a las 48 horas, una sensibilidad límite del 40% en la dilución del aceite de “muña” al 50% y una sensibilidad moderada del 20% sobre el Paramonoclorofenol alcanforado. Se observa una marcada sensibilidad de *E. faecalis* frente al aceite de “muña” puro.

**CUADRO 12. PRESENCIA DE HALO DE INHIBICION EN
CULTIVOS BACTERIANOS DE MUESTRAS PROVENIENTES DE
CONDUCTO RADICULAR CON PERIODONTITIS APICAL
CRONICA ENFRENTADOS AL ACEITE ESENCIAL DE *M. mollis*
72 H**

DILUCIONES	HALO DE INHIBICION			
	Presencia		Ausencia	
	N	%	N	%
Aceite muña 100%	3	100	0	0
Aceite muña al 50%	3	100	0	0
Aceite muña al 25%	2	67	1	33
Control +	3	100	0	0
Control -	0	0	3	100

Cuadro 12. Se presenta la frecuencia de halos de inhibición sobre bacterias presentes en conducto radicular con PAC. Tanto con el aceite de “muña” puro, al 50% y el Paramonoclorofenol alcanforado mostraron HICB en la totalidad de placas.

GRAFICO 10. PRESENCIA DE HALO DE INHIBICION EN CULTIVOS BACTERIANOS DE MUESTRAS PROVENIENTES DE CONDUCTO RADICULAR CON PERIODONTITIS APICAL CRONICA ENFRENTADOS AL ACEITE ESENCIAL DE *M. mollis* 72 H

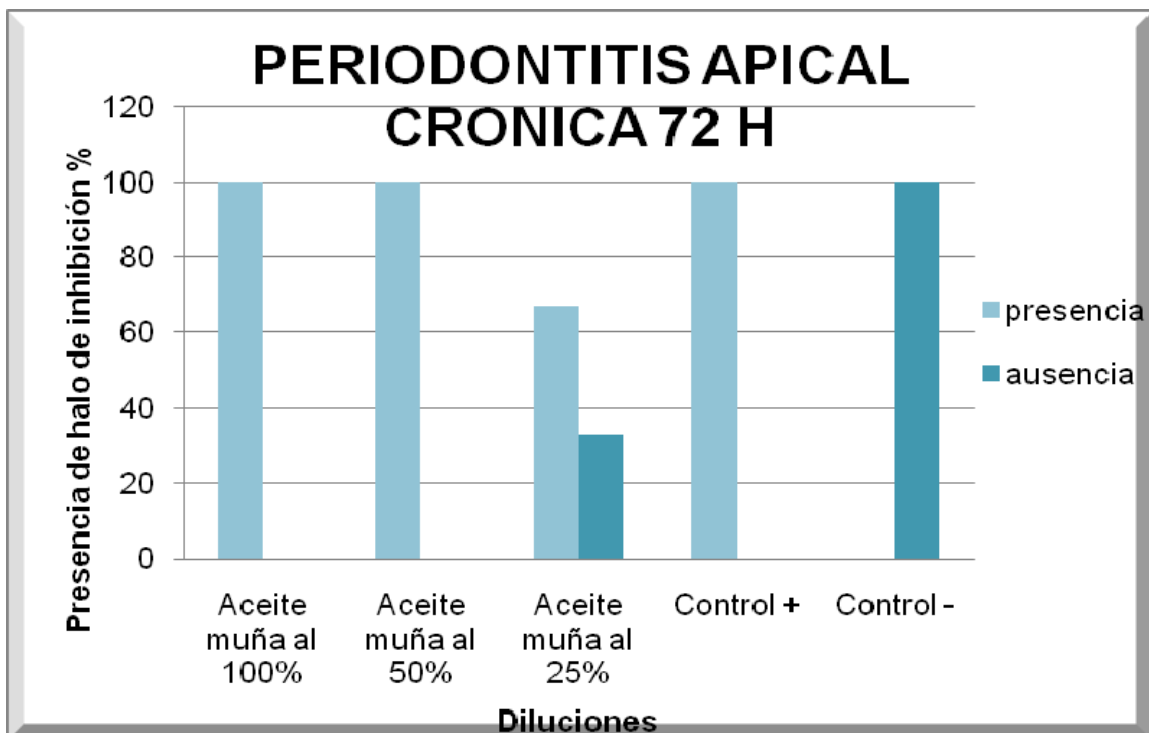


Gráfico 10. Ilustra la frecuencia de halos de inhibición de las diferentes diluciones del aceite de “muña” sobre bacterias presentes en conducto radicular con PAC. Se observa que hubo ausencia de HICB en todas las placas que contenían el disco embebido con el alcohol al 70% (control -).

**CUADRO 13. EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE
ESENCIAL DE *M. mollis* EN CULTIVOS BACTERIANOS DE
MUESTRAS PROVENIENTES DE CONDUCTO RADICULAR CON
PERIODONTITIS APICAL CRONICA 72 H**

EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA CUANTITATIVAMENTE				
DILUCIONES	V min*	V max†	Media‡	D E§
Aceite muña al 100%	8.0	15.0	11.3	3.51
Aceite muña al 50%	6.0	12.0	8.8	3.01
Aceite muña al 25%	5.0	10.0	7.7	2.52
Control +	10.0	12.0	10.7	1.15
Control -	5.0	5.0	5.0	0.00

*Valor mínimo
†Valor máximo
‡Promedio de halos que incluye el diámetro del disco (5 mm)
§Desviación estándar

Cuadro 13. Se observa la efectividad antibacteriana de las diferentes diluciones del aceite de “muña” sobre bacterias presentes en conducto radicular con PAC, el aceite de “muña” puro muestra halos de inhibición mayores que las otras diluciones, inclusive mayor que el control +. Cuanto mayor es la concentración del aceite esencial de “muña” mayor es el diámetro de halo inhibitorio. El valor de la desviación estándar fue mayor para el aceite de “muña” puro. Se realizó la prueba estadística de **Kruskal y Wallis** con las tres diluciones de aceite esencial de *M. mollis* y el grupo control (control positivo: Paramonoclorofenol alcanforado) la cual dio como resultado **p (0.378) > 0.05 (estadísticamente no significativo)**.

**GRAFICO 11. EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE
ESENCIAL DE *M. Mollis* EN CULTIVOS BACTERIANOS DE
MUESTRAS PROVENIENTES DE CONDUCTO RADICULAR CON
PERIODONTITIS APICAL CRONICA 72 H**

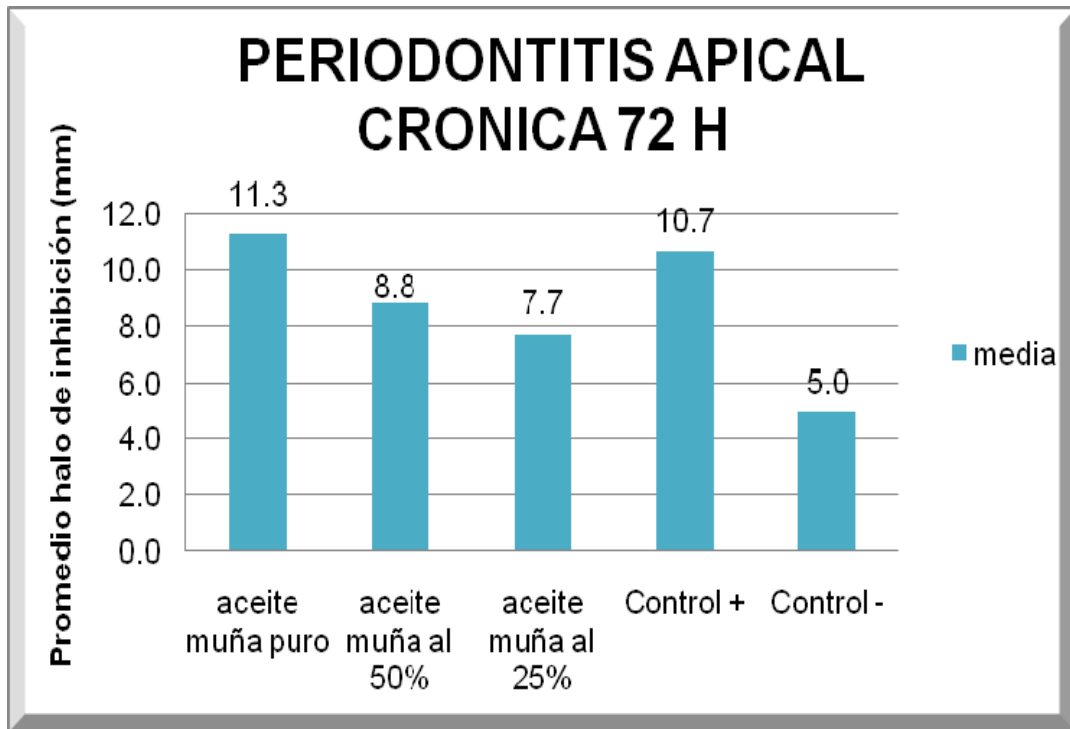


Gráfico 11. Ilustra la diferencia entre los promedios de halos de inhibición (mm.) de las diferentes diluciones del aceite de “muña” sobre bacterias presentes en conducto radicular con PAC, observándose que el aceite de “muña” puro tiene mejor efecto antibacteriano que el Paramonoclorofenol alcanforado la cual obtiene el segundo lugar seguido de las diluciones de aceite de muña al 50% y 25% respectivamente.

**CUADRO 14. EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE
ESENCIAL DE *M. Mollis* EN CULTIVOS BACTERIANOS DE
MUESTRAS PROVENIENTES DE CONDUCTO RADICULAR CON
PERIODONTITIS APICAL CRONICA 72 H SEGÚN LAS PAUTAS
DE DURAFFOURD**

DILUCION	EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA CUALITATIVAMENTE					
	nula*		sensible†		muy sensible‡	
	N	%	N	%	n	%
Aceite muña al 100%	0	0	2	67	1	33
Aceite muña al 50%	1	33	2	67	0	0
Aceite muña al 25%	1	33	2	67	0	0
Control +	0	0	3	100	0	0
Control -	3	100	0	0	0	0

*HICB menor a 8mm. †HICB de 8 a 14mm. ‡HICB de 14 a 20mm.

Cuadro 14. Podemos observar la efectividad antibacteriana cualitativamente del aceite esencial de *M. mollis* “muña” sobre bacterias presentes en conducto radicular con PAC; según las pautas de Duraffourd, éstas presentan una sensibilidad límite con las tres diluciones del aceite de “muña”. Se realizó la prueba estadística de **Chi Cuadrado** entre las diluciones del aceite esencial de *M. mollis* obteniéndose un valor **p (0.558) > 0.05 (estadísticamente no significativo)**.

GRAFICO 12. EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *M. Mollis* EN CULTIVOS BACTERIANOS DE MUESTRAS PROVENIENTES DE CONDUCTO RADICULAR CON PERIODONTITIS APICAL CRONICA 72 H SEGÚN LAS PAUTAS DE DURAFFOURD

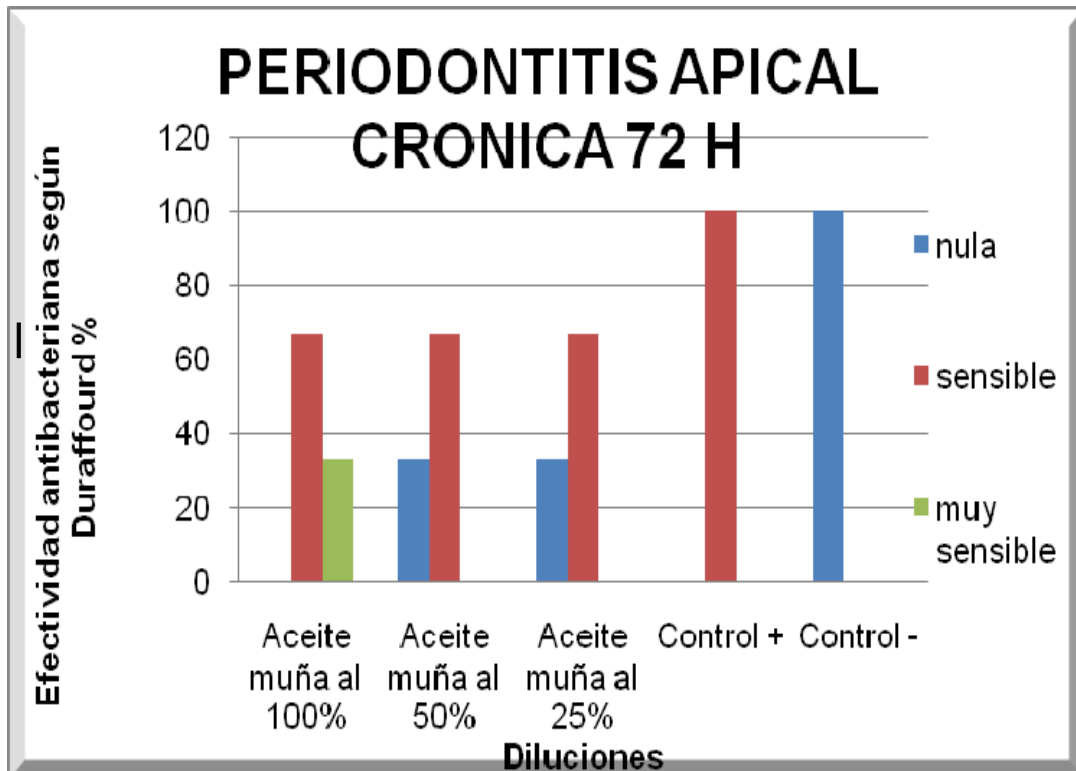


Gráfico 12. Ilustra la efectividad antibacteriana cualitativamente de las diferentes diluciones del aceite de “muña” sobre bacterias presentes en conducto radicular con PAC. Se aprecia una sensibilidad límite de éstas frente a todas las diluciones a excepción del alcohol al 70% y una sensibilidad moderada frente al aceite de “muña” puro.

CUADRO 15. PRESENCIA DE HALO DE INHIBICION EN CULTIVOS BACTERIANOS DE MUESTRAS PROVENIENTES DE CONDUCTO RADICULAR CON PERIODONTITIS APICAL CRONICA - INFECCION PERSISTENTE ENFRENTADOS AL ACEITE ESENCIAL DE *M. mollis* 72 H

DILUCIONES	HALO DE INHIBICION			
	Presencia		Ausencia	
	N	%	N	%
Aceite muña 100%	3	100	0	0
Aceite muña al 50%	3	100	0	0
Aceite muña al 25%	1	33	2	67
Control +	3	100	0	0
Control -	0	0	3	100

Cuadro 15. Se presenta la frecuencia de halos de inhibición sobre bacterias presentes en conducto radicular con PAC e infección persistente. Tanto con el aceite de “muña” puro, al 50% y el Paramonoclorofenol alcanforado mostraron HICB en la totalidad de placas.

GRAFICO 13. PRESENCIA DE HALO DE INHIBICION EN CULTIVOS BACTERIANOS DE MUESTRAS PROVENIENTES DE CONDUCTO RADICULAR CON PERIODONTITIS APICAL CRONICA - INFECCION PERSISTENTE ENFRENTADOS AL ACEITE ESENCIAL DE *M. mollis* 72 H



Gráfico 13. Ilustra la frecuencia de halos de inhibición de las diferentes diluciones del aceite de “muña” sobre bacterias presentes en conducto radicular con PAC - infección persistente. Se observa que hubo ausencia de HICB en todas las placas que contenían el disco embebido con el alcohol al 70% (control -).

**CUADRO 16. EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE
ESENCIAL DE *M. mollis* EN CULTIVOS BACTERIANOS DE
MUESTRAS PROVENIENTES DE CONDUCTO RADICULAR CON
PERIODONTITIS APICAL CRONICA - INFECCION PERSISTENTE
72 H**

EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA CUANTITATIVAMENTE				
DILUCIONES	V min*	V max†	Media‡	DE§
Aceite muña al 100%	8.0	10.0	8.8	1.04
Aceite muña al 50%	7.0	7.5	7.3	0.29
Aceite muña al 25%	5.0	8.0	6.0	1.73
Control +	7.5	9.0	8.2	0.76
Control -	5.0	5.0	5.0	0.00

*Valor mínimo
†Valor máximo
‡Promedio de halos que incluye el diámetro del disco (5 mm)
§Desviación estándar

Cuadro 16. Se observa la efectividad antibacteriana de las diferentes diluciones del aceite de “muña” sobre bacterias presentes en conducto radicular con PAC - infección persistente, el aceite de “muña” puro muestra halos de inhibición mayores que las otras diluciones, inclusive mayor que el control +. Cuanto mayor es la concentración del aceite esencial de “muña” mayor es el diámetro de halo inhibitorio. El valor de la desviación estándar fue mayor para el aceite de “muña” puro. Se realizó la prueba estadística de **Kruskal y Wallis** con las tres diluciones de aceite esencial de *M. mollis* y el grupo control (control positivo: Paramonoclorofenol alcanforado) la cual dio como resultado **p (0.090) > 0.05 (estadísticamente no significativo)**.

GRAFICO 14. EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *M. mollis* EN CULTIVOS BACTERIANOS DE MUESTRAS PROVENIENTES DE CONDUCTO RADICULAR CON PERIODONTITIS APICAL CRONICA - INFECCION PERSISTENTE 72 H

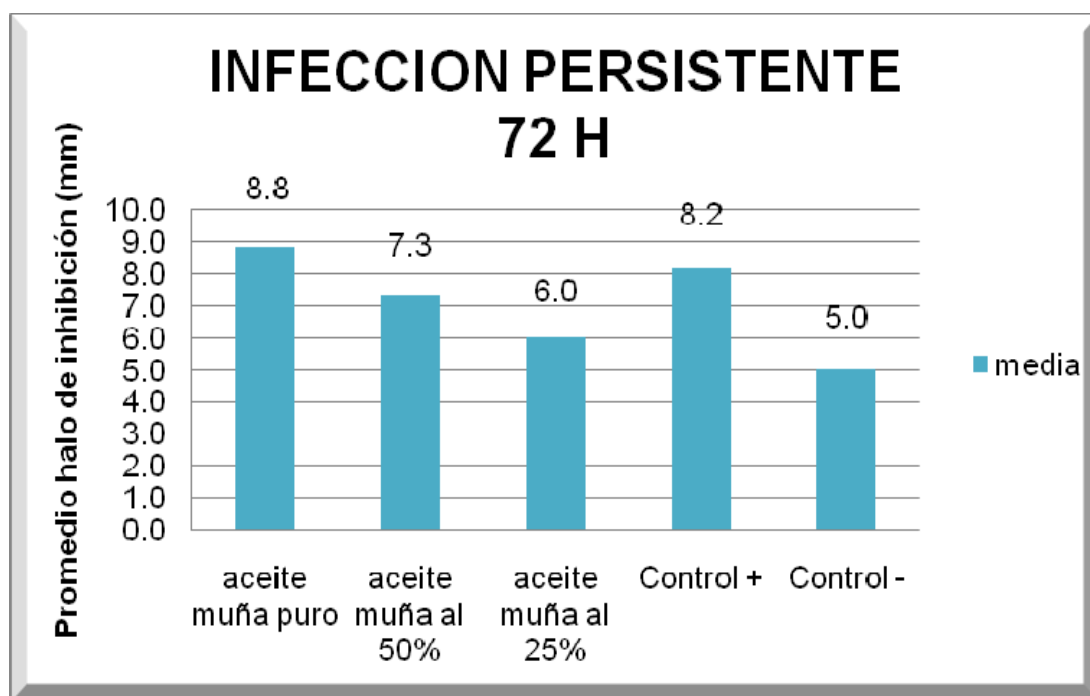


Gráfico 14. Ilustra la diferencia entre los promedios de halos de inhibición (mm.) de las diferentes diluciones del aceite de “muña” sobre bacterias presentes en conducto radicular con PAC - infección persistente, observándose que el aceite de “muña” puro tiene mejor efecto antibacteriano que el Paramonoclorofenol alcanforado la cual obtiene el segundo lugar seguido de las diluciones de aceite de muña al 50% y 25% respectivamente.

**CUADRO 17. EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE
ESENCIAL DE *M. mollis* EN CULTIVOS BACTERIANOS DE
MUESTRAS PROVENIENTES DE CONDUCTO RADICULAR CON
PERIODONTITIS APICAL CRONICA - INFECCION PERSISTENTE
72 H SEGÚN LAS PAUTAS DE DURAFFOURD**

DILUCION	EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA CUALITATIVAMENTE					
	nula*		sensible†		muy sensible‡	
	N	%	N	%	n	%
Aceite muña al 100%	0	0	3	100	0	0
Aceite muña al 50%	3	100	0	0	0	0
Aceite muña al 25%	2	67	1	33	0	0
Control +	1	33	2	67	0	0
Control -	3	100	0	0	0	0

*HICB menor a 8mm. †HICB de 8 a 14mm. ‡HICB de 14 a 20mm.

Cuadro 17. Podemos observar la efectividad antibacteriana cualitativamente del aceite esencial de *M. mollis* “muña” sobre bacterias presentes en conducto radicular con PAC - infección persistente; según las pautas de Duraffourd, éstas presentan una sensibilidad límite con el aceite de “muña” puro en el 100% de los casos. Se realizó la prueba estadística de **Chi Cuadrado** entre las diluciones del aceite esencial de *M. mollis* obteniéndose un valor **p (0.043) < 0.05 (estadísticamente significativo)**.

GRAFICO 15. EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *M. Mollis* EN CULTIVOS BACTERIANOS DE MUESTRAS PROVENIENTES DE CONDUCTO RADICULAR CON PERIODONTITIS APICAL CRONICA - INFECCION PERSISTENTE 72 H SEGÚN LAS PAUTAS DE DURAFFOURD

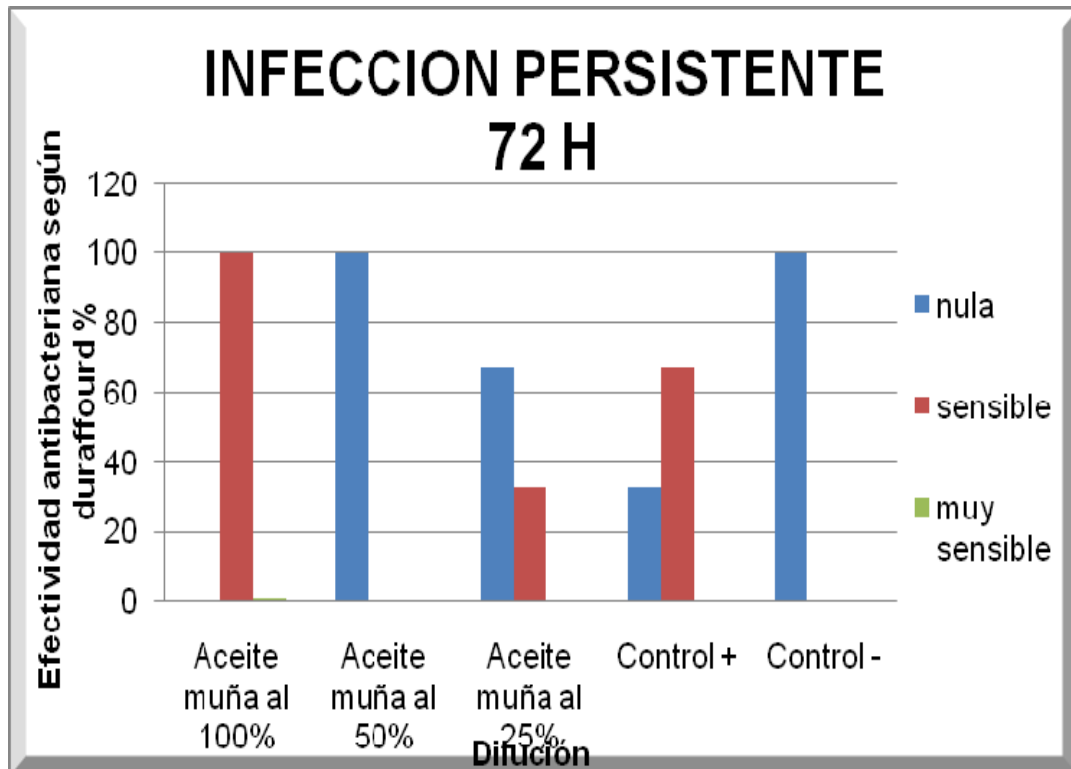


Gráfico 15. Ilustra la efectividad antibacteriana cualitativamente de las diferentes diluciones del aceite de “muña” sobre bacterias presentes en conducto radicular con PAC - infección persistente. Se aprecia una sensibilidad límite de éstas frente a todas las diluciones a excepción del aceite de “muña” al 50% y alcohol al 70% (control -); no se observa sensibilidad moderada en ninguna dilución.

CUADRO 18. COMPARACION DE LA EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA CUANTITATIVAMENTE DEL ACEITE ESENCIAL DE *M. mollis* SOBRE ESPECIES BACTERIANAS

DILUCION	MEDIAS DE HICB POR ESPECIES BACTERIANAS (mm)				
	<i>F. nucleatum</i> (1 sem)	<i>P. melaninogénica</i> (1 sem)	<i>E. faecalis</i> (48 H)	PAC (72 H)	<i>Infeccion persistente</i> (72 H)
Aceite muña al 100%	12.7	11.9	9	11.3	8.8
Aceite muña al 50%	9.9	9	7	8.8	7.3
Aceite muña al 25%	7.2	6	5	7.7	6
Control +	15.3	13.2	12.2	10.7	8.2
Control -	5	5	5	5	5

*Halo de inhibición de crecimiento bacteriano

Cuadro 18. Se presenta el consolidado de los promedios de diámetros de halos de inhibición (en milímetros) por cada especie bacteriana. Se observó que la solución control positivo (Paramonoclorofenol alcanforado) tuvo una mayor efectividad sobre la bacteria *Fusobacterium nucleatum* y en segundo lugar sobre *Prevotella melaninogénica* (**Gráfico 16**). La dilución de aceite esencial de *M. mollis* al 100% tuvo mayor efectividad sobre la cepa de *Fusobacterium nucleatum* y en segundo lugar sobre *Prevotella melaninogénica* (**Gráfico 17**). La dilución de aceite esencial de *M. mollis* al 50% tuvo mayor efecto inhibitorio sobre la bacteria *Fusobacterium nucleatum* (**Gráfico 18**). Por último, la solución control negativo (alcohol al 70%) no tuvo ningún efecto inhibitorio sobre las bacterias empleadas en este estudio.

GRAFICO 16. COMPARACION DE LA EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA CUANTITATIVAMENTE DEL ACEITE ESENCIAL DE *M. Mollis* SOBRE ESPECIES BACTERIAS

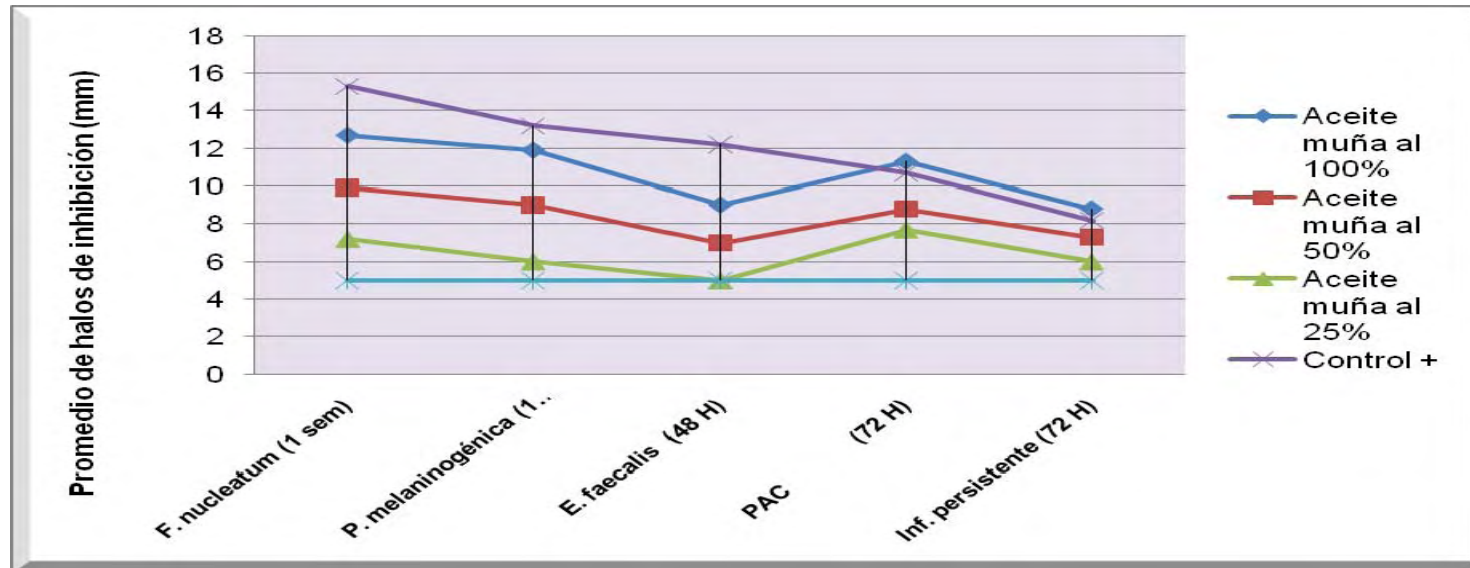


Gráfico 16. Ilustra el consolidado de los promedios de halos de inhibición por cada bacteria y de acuerdo al tiempo de realizarse la lectura de datos. Los mayores promedios están dados por el control + (Paramonoclorofenol alcanforado), seguido por la dilución del aceite esencial de “muña” puro.

GRAFICO 17. EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA DILUCION AL 100% DEL ACEITE ESENCIAL DE *M. mollis*

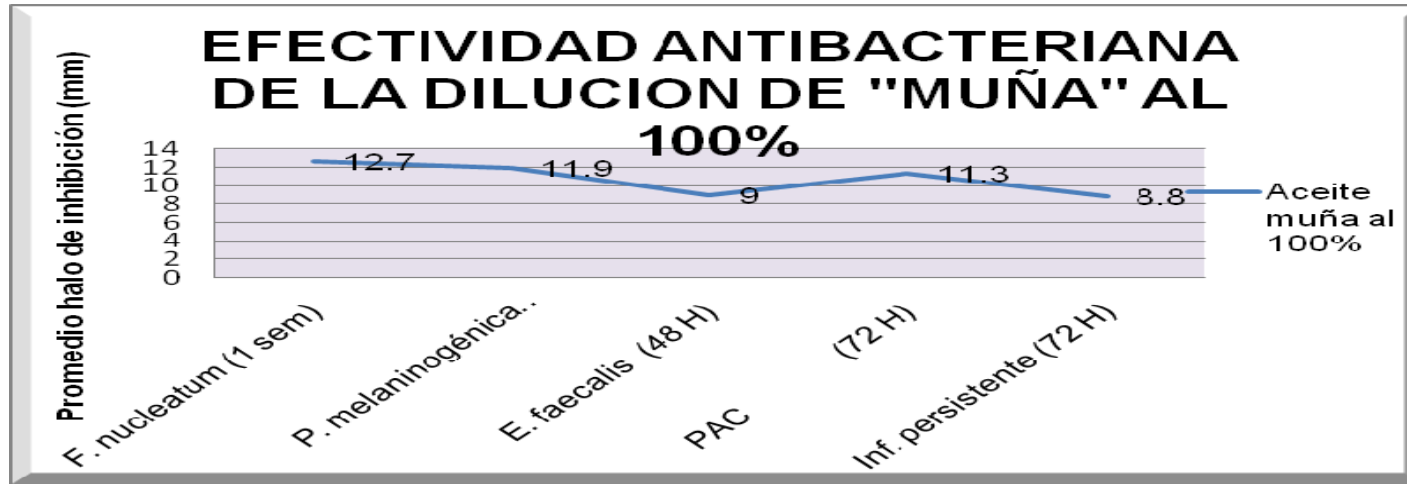


Gráfico 17. Ilustra los promedios de halos de inhibición obtenidos luego de realizar la prueba de susceptibilidad a la dilución de “muña” puro en cada una de las cinco muestras empleadas en el estudio. Se observa del gráfico que la bacteria *Fusobacterium nucleatum* es la que presenta mayor susceptibilidad a dicha dilución, seguida por *Prevotella melaninogénica*, mientras que la menor efectividad antibacteriana se observa en la muestra de conducto radicular con PAC – infección persistente.

GRAFICO 18. EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA DILUCION AL 50% DEL ACEITE ESENCIAL DE *M. mollis*

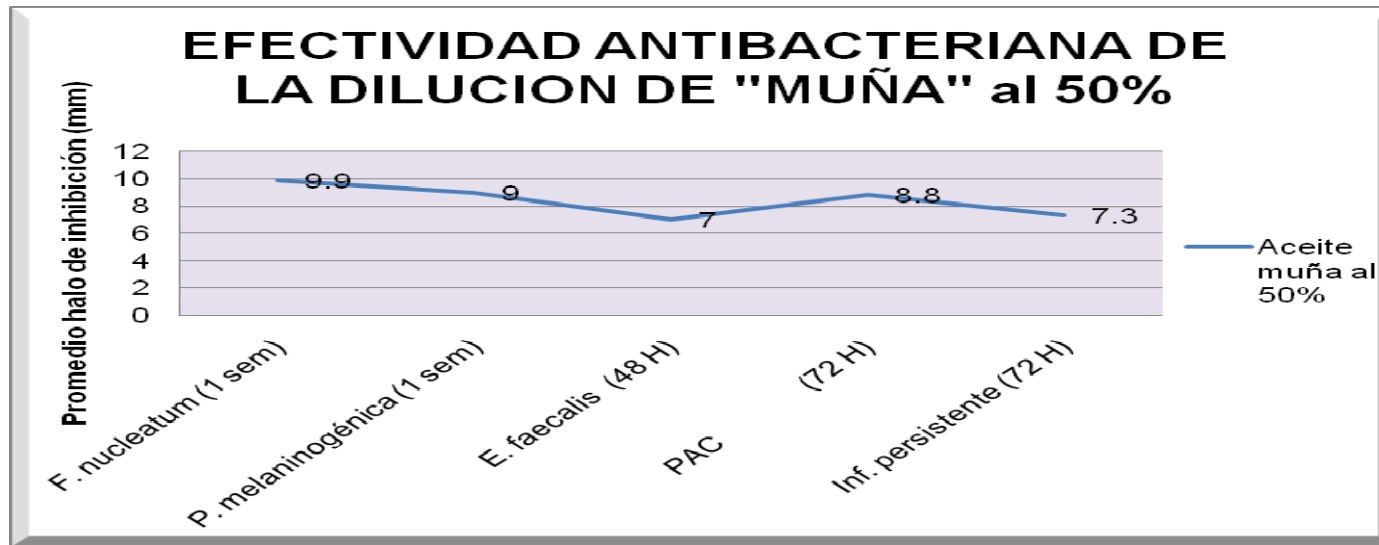


Gráfico 18. Ilustra los promedios de halos de inhibición obtenidos luego de realizar la prueba de susceptibilidad a la dilución de “muña” al 50% en cada una de las cinco muestras empleadas en el estudio. Se observa del gráfico que la bacteria *Fusobacterium nucleatum* es la que presenta mayor susceptibilidad a dicha dilución, seguida por *Prevotella melaninogénica*, mientras que la menor efectividad antibacteriana se observa en la bacteria *Enterococcus faecalis*.

GRAFICO 19. EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA DILUCION AL 25% DEL ACEITE ESENCIAL DE *M. mollis*

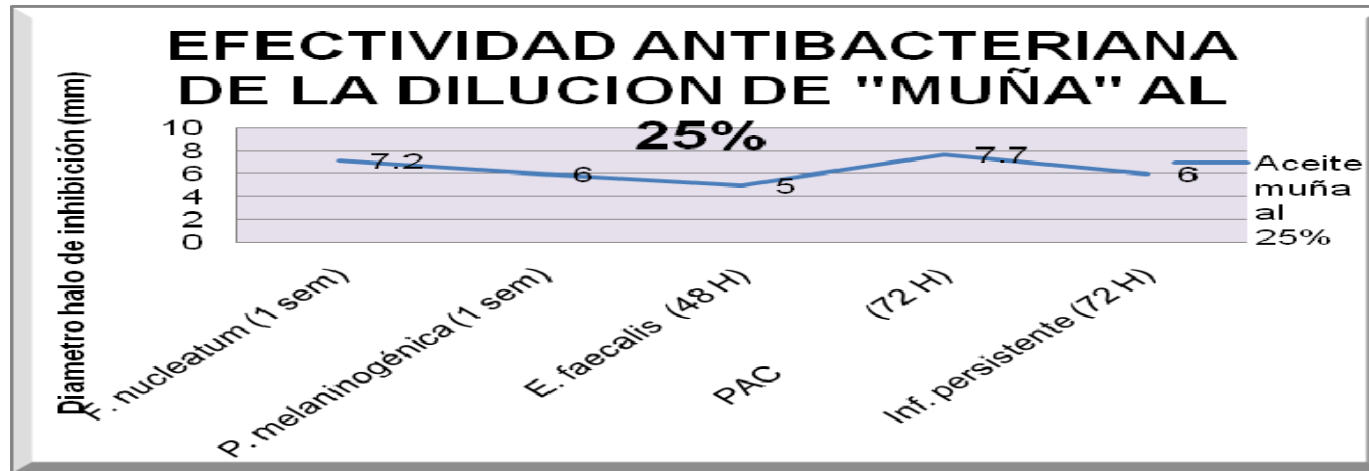


Gráfico 19. Ilustra los promedios de halos de inhibición obtenidos luego de realizar la prueba de susceptibilidad a la dilución de “muña” al 25% en cada una de las cinco muestras empleadas en el estudio. Se observa del gráfico que la muestra de conducto radicular con PAC es la que presenta mayor susceptibilidad a dicha dilución, seguida por la bacteria *Fusobacterium nucleatum*, mientras que la menor efectividad antibacteriana se observa en la bacteria *Enterococcus faecalis*.

V. DISCUSION

Se decidió recolectar la planta *Minthostachys mollis* “muña” en las alturas del centro poblado menor de Muruhuay (Tarma), basándonos en los estudios de Fuertes - Munguía y Cano^{6,12} sobre *Minthostachys mollis* proveniente de dicha ciudad, ésta fue estudiada concluyendo que la muestra estuvo conformada por sustancias oxigenadas aromáticas ó alicíclicas, lo que nos indica que el aceite extraído tiene mejores condiciones que el aceite de otros lugares.

Para determinar la efectividad antibacteriana de *M. mollis* se obtuvo una sustancia oleosa producto de la destilación de la parte aérea de la planta (hojas, flores, talluelos), coincidiendo con los estudios de Munares, Días, Chica y Mora que trabajaron usando el aceite esencial de *M. mollis* frente a diversos microorganismos encontrando actividad antimicrobiana.^{2,10,11,14} También se han reportado estudios sobre *M. mollis* utilizando otro tipo de vehículos esperando encontrar efectividad antimicrobiana, Palacios y col.⁹ utilizaron preparados de hojas de “muña” mezclados con agua destilada enfrentados a Streptococos orales *in vitro*, no encontrando resultados positivos. Bravo y col.⁸ estudiaron la composición química del extracto de *Minthostachys mollis* determinando la presencia de flavonoides y presentando actividad antimicrobiana frente a *E. coli* y *S. aureus*.

En su estudio, Salmon³ no obtuvo halos de inhibición con *Minthostachys mollis*, en contraposición al resto de estudios donde se emplearon las mismas bacterias (*E. coli* y *S. aureus*). Contreras e Inga - Guerra si lograron demostrar

las propiedades antibacterianas de *Minthostachys mollis* frente a las bacterias antes mencionadas.^{1,5}

En la presente investigación se trabajó con los géneros *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromona* y *Enterococcus* como los representativos de la microbiota de un diente con patología periapical endodóntica crónica.³⁵ Sundqvist y Siqueira Jr.^{22,36} estudiaron las asociaciones de especies bacterianas en la taxonomía, ecología y patogenicidad de la flora de un canal radicular infectado, concluyendo que el predominio de bacterias anaerobias estrictas en lesiones de larga duración es debido al cambio de nutrientes en el medio, reemplazando las bacterias sacarolíticas por bacterias proteolíticas. Especies tales como: *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella melaninogénica* y *Porphyromonas gingivalis* predominan en la flora microbiana, esta es la razón por la que son aisladas frecuentemente en lesiones de larga duración y lesiones periapicales. Por otra parte, Abou ras y Bogen⁹⁸ identificaron, mediante cultivos, un 63.6% de bacterias anaerobias estrictas y un 36.4% de facultativas en lesiones perirradiculares cerradas con tratamientos endodónticos refractarios. En este mismo sentido, Molander³⁴ estudió desde el punto de vista microbiológico, 100 dientes en los que el tratamiento endodóntico convencional había fracasado. En 68 los cultivos fueron positivos con más de 117 especies bacterianas, predominando los anaerobios facultativos Gram (+) en un 69%, la especie mas frecuente fue *Enterococcus faecalis*.

Para la prueba de susceptibilidad a las diluciones del AE de *M. mollis* se empleó el método de Difusión, estandarizado por Kirby-Bauer en los Estados

Unidos en 1966, se demuestra la gran utilidad de los ensayos *in vitro*, que se fundamenta en la inhibición del crecimiento bacteriano, mediante la difusión de sustancias activas en un medio sólido y posteriormente se evidencia por la formación de halos claros.^{143,144} Se decidió emplear el método de difusión en agar con disco con el objetivo de comparar cuantitativamente y cualitativamente la eficacia antibacteriana de las distintas diluciones de *M. mollis*, a diferencia de las investigaciones previas de Bravo y col.⁸ que emplearon el método de difusión en agar con perforaciones para estudiar la presencia de Flavonoides en *Minthostachys mollis* “muña” y *Lepechinia millerii* (Walp) Epling y la actividad antimicrobiana de sus extractos frente a cepas de *E. coli* y *S. aureus*. Investigaciones como las de Días, Chica, Cano, Guiza – Rincón y Mora avalan el buen funcionamiento del método Difusión en agar con disco en trabajos similares de *M. mollis*.¹⁰⁻¹³

En nuestro estudio; el aceite esencial de *M. mollis* en su dilución al 100%, enfrentado a cultivos bacterianos de *F. nucleatum* presentó halos de inhibición de mayor diámetro en comparación a otras cepas ATCC, esto coincide con el estudio de Días¹⁰ que concluyó que *Fusobacterium nucleatum* fue la cepa más sensible al aceite de *M. mollis*. Esto no coincide con el estudio de Alzamora y Morales que determinaron que las bacterias Gram (-) son resistentes al AE de *M. mollis*.¹³⁶

A su vez, la cepa que presentó halos de inhibición de menor diámetro, en comparación a otras cepas ATCC, frente al aceite esencial de *M. mollis* fue *Enterococcus faecalis*, este microorganismo fue utilizado en este estudio

debido a su fácil cultivo e importancia clínica en cuadros de infecciones endodónticas. En sus investigaciones, Siqueira¹⁰⁸ y Ferrari¹⁰⁹ sostienen que *E. faecalis* es prevalente en este tipo de patología gracias a sus factores de patogenicidad, tales como: capacidad de adhesión, el crecimiento y el poder de invasión en los tejidos, su resistencia a los medicamentos intracanal y a los cambios de pH, lo que hace que esta bacteria sea tan difícil de erradicar del sistema de conductos. En su estudio Matos¹¹⁷ concluye que, a pesar de las distintas técnicas de preparación biomecánica, *E. faecalis* no disminuye en el interior de los conductos radiculares. En la revisión bibliográfica no se encontraron estudios previos relacionados a la efectividad antimicrobiana del Aceite esencial de *M. mollis* en cepas de *E. faecalis*.

En cuanto a las muestras provenientes de conducto radicular diagnosticado con Periodontitis apical crónica en piezas sin tratamiento endodóntico previo y a las tratadas endodónticamente con infección persistente, se apreció que el aceite esencial de *M. mollis* “muña” al 100% presentó halos de inhibición mayores que las otras diluciones e incluso mayor que el control positivo (Paramonoclorofenol alcanforado), en la revisión de la literatura no se encontraron estudios previos relacionados a la efectividad antimicrobiana del AE de *M. mollis* en muestras de conductos.

Para poder analizar nuestros resultados cualitativamente se tomó en cuenta los parámetros que postuló Duraffourd y col.¹²⁰ que se basaron en el trabajo de Lapraz que en 1979 realizó estudios estadísticos que le permitieron establecer tablas de actividad antimicrobiana de aceites esenciales frente a un gran

número de microorganismos determinando el porcentaje de acción de los aceites esenciales de diversas plantas.

En el presente estudio; el aceite esencial de *M. mollis* en su dilución al 100%, enfrentado a cultivos bacterianos de *F. nucleatum* presentó mayor efectividad en comparación a otras cepas ATCC y muestras de conducto radicular, según las pautas de Duraffourd, mostrando un 60% de efectividad límite y un 40% de efectividad moderada. La utilización de este análisis se basó en el estudio de Alzamora y Morales¹³⁶ que estudió la actividad antimicrobiana y antifúngica de los aceites esenciales de cinco plantas empleadas en la medicina tradicional del Perú de forma cualitativa, usando los parámetros de Duraffourd, encontrando diversa actividad antimicrobiana.

En el presente estudio no se halló halos de inhibición mayor a 20 mm.; rango correspondiente, según Duraffourd, al valor sumamente sensible (+++), por lo que no se tomó en cuenta para el análisis de la efectividad antibacteriana tipo cualitativa, a diferencia del estudio de Alzamora y Morales¹³⁶ donde determinaron halos de inhibición mayores a 20 mm.

En la presente investigación se observa, en todos los casos, que la efectividad antimicrobiana de tipo cuantitativa o cualitativa de *M. mollis* es directamente proporcional a la concentración del aceite esencial en la dilución, esto coincide con el trabajo de Chica y col¹¹ que estudiaron la actividad antimicrobiana de *M. mollis* frente a bacterias patógenas propias de la papa hallando una relación directamente proporcional entre la concentración y el tamaño de la inhibición.

VI CONCLUSIONES

- El aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” puro y en sus diluciones del 50% y 25% presenta efectividad antibacteriana cuantitativamente frente a la cepa *Fusobacterium nucleatum* con promedios de halos de inhibición de 12.7mm, 9.9mm y 7.2mm respectivamente, con una significación menor del 5% (**P < 0.001**). Cualitativamente, frente a la misma cepa, el Aceite esencial puro presentó una efectividad límite y moderada, la dilución al 50% y 25% una efectividad límite; con una significación mayor del 5% (**P < 0.068**).
- El aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” puro y en sus diluciones del 50% y 25% presenta efectividad antibacteriana cuantitativamente frente a la cepa *Prevotella melaninogénica* con promedios de halos de inhibición de 11.9mm, 9.0mm y 6.0mm respectivamente, con una significación menor del 5% (**P < 0.001**). Cualitativamente, frente a la misma cepa, el Aceite esencial puro y la dilución al 50% presentó una efectividad límite; con una significación menor del 5% (**P < 0.004**).
- El aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” puro y en su dilución del 50% presenta efectividad antibacteriana cuantitativamente frente a la cepa *Enterococcus faecalis* con promedios de halos de inhibición de 9.0mm y 7.0mm respectivamente, con una significación menor del 5% (**P < 0.000**). Cualitativamente, frente a la misma cepa, el Aceite esencial puro presentó una efectividad límite; con una significación menor del 5% (**P < 0.003**).

- El aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” puro y en sus diluciones del 50% y 25% presenta efectividad antibacteriana cuantitativamente frente a las muestras de conducto radicular con Periodontitis apical crónica, con promedios de halos de inhibición de 11.3mm, 8.8mm y 7.7mm respectivamente, con una significación mayor del 5% (**P < 0.378**). Cualitativamente, frente a la misma muestra, el Aceite esencial puro y las diluciones al 50% y 25% presentaron una efectividad límite; con una significación mayor del 5% (**P < 0.558**).
- El aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” puro y en sus diluciones del 50% y 25% presenta efectividad antibacteriana cuantitativamente frente a las muestras de conducto radicular con Periodontitis apical crónica tratada endodónticamente con infección persistente, con promedios de halos de inhibición de 8.8mm, 7.3mm y 6.0mm respectivamente, con una significación mayor del 5% (**P < 0.900**). Cualitativamente, frente a la misma muestra, el Aceite esencial puro presentó una efectividad límite; con una significación menor del 5% (**P < 0.040**),
- El aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” puro presenta una efectividad antibacteriana, tanto cuantitativamente como cualitativamente, mayor en comparación a las diluciones del 50% y 25% frente a las cepas de *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella melaninogénica*, *Enterococcus faecalis* y muestras de conducto radicular.

VII RECOMENDACIONES

- La presente investigación se debe complementar con la identificación de los componentes químicos del aceite esencial de *Minthostachys mollis*
- Realizar trabajos posteriores con mayor cantidad de ensayos, así como con otras bacterias prevalentes en patologías periapicales tanto Gram+ como Gram -.
- Se sugiere enfocar los estudios de efectividad antibacteriana del aceite esencial de *M. mollis* “muña” en su concentración pura, así como continuar y ampliar con estudios de efectividad antibacteriana de *M. mollis* en base a muestras de conducto radicular.
- Se sugiere ampliar el trabajo, extendiéndolo a estudiar la posibilidad de acción sinérgica entre el aceite esencial de *Minthostachys mollis* y el Paramonoclorofenol alcanforado, así como con otros medicamentos intracanal de uso clínico, Ejm. Hidróxido de Calcio.

**REFERENCIAS
BIBLIOGRAFICAS**

1. Contreras G. Actividad antimicrobiana del Aceite Esencial de *Minthostachys mollis* (muña) frente a bacterias enteropatógenas. Tesis de bachiller para Biólogo. Lima: UNALM; 1983.
2. Munares M. Estudio del aceite esencial de muña en almacenaje de papa como inhibidor de brotamiento de microorganismos. Tesis de bachiller para Ingeniero en Industrias Alimentarias. Lima: UNALM; 1983.
3. Salmón L. Contribución al estudio de la especie vegetal *Minthostachys mollis* KuntGriseb "Muña" en los aspectos fitoquímico, toxicológico, antimicrobiano y bromatológico. Lima; 1994. p. 5-15.
4. Oblitas E. Plantas medicinales en Bolivia: farmacopea Callawaya. 2° Edición. La Paz: Editorial los amigos del libro; 1998. p. 8.
5. Inga A y Guerra B. Efecto del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) contra algunas bacterias y hongos de interés en la salud. Tesis de bachiller para Químico Farmacéutico. Lima: UNMSM; 2000.
6. Fuertes C y Munguía Y. Estudio comparativo del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb "muña" de tres regiones peruanas por cromatografía de gases y espectrometría de masas. Ciencia e Investigación 2001; IV (1): 23-39.
7. Primo V, Rovera M, Zanón S, Oliva M, Demo M, Daghero J, et al. Determinación de La actividad antibacteriana y antiviral del aceite esencial de *Minthostachys verticillata* Griseb Epling. Rev Argent Microbiol 2001; 33(2): 113-117.
8. Bravo O, Hernández E, Tereschuk L, Romero A, Abdala R. *Minthostachys mollis* griseb y *Lepechinia meyenii* walp epling: actividad antimicrobiana de sus extractos, determinaciones preliminares de sus flavonoides mayoritarios. Revista del CIZAS Nov 2004; 5(1 y 2): 7-23
9. Palacios E, Mendoza A, Salcedo D. Efecto bactericida *in vitro* de *Minthostachys mollis* (muña) frente a Streptococos orales. Instituto de Investigación Estomatológica. Lima: UNMSM; 2004.
10. Díaz K. Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* de *Minthostachys mollis* Griseb (muña) frente a bacterias orales de importancia estomatológica. Tesis de bachiller para Cirujano Dentista. Lima: UNMSM; 2005.

11. Chica N, Sánchez J, Carrascal K, Melgarejo M. Antimicrobial activity of *Minthostachys mollis* (Lamiaceae) essential oil. APS Caribbean Division 2007; 97(7) (Suppl).
12. Cano C. Actividad antimicótica in vitro y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña). Tesis de maestría para Magister en Recursos Vegetales y Terapéuticos. Lima: UNMSM; 2007.
13. Güisa D y Rincón L. Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* combinado con inactivación térmica, sobre cepas de *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*. Tesis de bachiller para Microbiólogo industrial. Bogotá: PUJ; 2007.
14. Mora F. et al. Chemical composition and *in vitro* antibacterial activity of the essential oil of *Minthostachys mollis* from venezuelan Andes. *Natural Product Communications*. 2009; 4(7): 997-1000.
15. Ingle I y Taintor F. Endodoncia. 3° Edición. México D.F.: Editorial Interamericana S.A.; 1987.
16. Lasala A. Endodoncia. 4° Edición. Barcelona: Editorial Salvat; 1992.
17. Walton E y Torabinejad M. Endodoncia, Principios y Práctica Clínica (traducido). 2° Edición. México D. F.: Editorial Interamericana Mc graw-Hill; 1997.
18. Miller G, Mayo T de, Hutter W. Production of interleukin-I by PMN leucocytes resident in periradicular tissue. JOE 1996 Jul; 22(7): 346-351.
19. Shimauchi H, Takayama S, Miki Y, Okada H. The change of periapical exudates PGE2 levels during root canal treatment. JOE 1997 Dec; 23(12): 755-758.
20. Sjögren U. Success and failure in endodontics. Dissertation. Department of Endodontics: Umeå University; 1996.
21. Teles R, Wang Y, Stashenko, P. Increased susceptibility of RAG-2 SCID mice to dissemination of endodontic infections. *Infect. Immun.* 1997 Sep; 65(9): 3781-3787.

22. Sundqvist G. Taxonomy, ecology and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Pathol.* 1994 Oct; 78(4): 522-530.
23. Torabinejad M. Mediators of acute and chronic periradicular lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994 Oct; 78(4): 261-266.
24. Kawashima N, Okiji T, Kosaka T, Suda H. Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars. *JOE* 1996 Jun; 26(2): 311-316.
25. Hamachi T, Anan H, Akamine A, Fujise O, Maeda K. Deteccion of interleukin-1 mRNA in rat periapical lesions. *JOE* 1995 Mar; 21(3): 118-121.
26. Metzger Z, Berg D, Doran M. Fibroblast growth in vitro suppressed by LPS-activated macrophages. Reversal of depression by hydrocortisone *JOE* 1997 Aug; 23(8): 517-521.
27. Akamine A, Anan H, Hamachi T, Maeda K. An histochemical study of the behavior of macrophages during experimental apical periodontitis in rats. *JOE* 1994 Oct; 20(10): 474-478.
28. Takayama S, Miki Y, Shimauchi H, Okada H. Relationship between Pg. E2 concentrations in periapical exudates from root canals and clinical findings of periapical periodontitis. *JOE* 1996 Dec; 22(12): 677-68.
29. Delzangles B, Boy Lefevre M, Forest N. Glycoproteins expression in apical pathologic tissues: clinical incidences. *JOE* 1997 Sep; 23(9): 565-568.
30. Anan H, Matsumoto A, Hamachi T, Yoshamine Y, Morita Y, Maeda K. Effects of a combination of an antibacterial agent (Ofloxacin) and a collagenase inhibitor (FN-439) on the healing of rat periapical lesions. *JOE* 1996 Dec; 22 (12): 668-673.
31. Ingle I y Bakland L. *ENDODONCIA*. 5° edición. México: Editorial Mc Graw-Hill Interamericana; 2004.
32. Canalda C y Brau E. *ENDODONCIA: técnicas clínicas y bases científicas*. 1° Edición. Barcelona: Editorial Masonas; 2001.
33. Soares J y Goldberg F. *ENDODONCIA, técnica y fundamentos*. 1° Edición. Buenos aires: Editorial Médica Panamericana; 2003.

34. Molander A, Reit C, Kvist T. Microbiological status of root –filled teeth with apical peirodontitis. *Int Endod Journ* 1998; 31(1): 1-7.
35. Sunde P, Olsen I, Debelian G, Tronstad L. Microbiota of Periapical Lesions Refractory to Endodontic Therapy. *J Endod* 2002; 28(4): 304-310.
36. Siqueira Jr. F. Tratamento das infecções endodónticas. 1º Edicion. Río de Janeiro: Editorial MEDSI. R. J; 1997.
37. Sundqvíst G. Endodontic microbiology. En: Spångberg Larz SW. *Experimental Endodontics*. 1º Edicion. Sweden: International Standard Book; 1990. p. 131-53.
38. Sundqvíst G. Ecology of the root canal flora. *JOE* 1992 Sep; 18(9): 427-430.
39. Sundqvíst G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microb Immun* 1992; 7: 257-262.
40. Siqueira J, Rocas I, Souto R, Uzeda M, Colombo A. Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001; 92(4): 451-457.
41. Schifferle E, Shostad A, Bayers-Thering T, Dyer D, Neiders D. Effect of Protoporphyrin IX limitation on *Porphyromonas gingivalis*. *JOE* 1996 Jul; 22(7): 352-355.
42. Blum Y, Michalesco P, Abadie M. An evaluation of the bactericidal effect of the Nd: YAP laser. *JOE* 97 Sep; 23(9): 583-585.
43. Bufflier P, Suchett-Kage G, Morrier J, Benay G, Decoriet D, Bonín P et al. In vitro evaluation of the antibacterial effects of the intracanal Micro Plasma Aystem Treatment. *JOE* 1997 Jan; 23(1): 28-31.
44. Fegan S, Steiman R. Comparative evaluation of the antibacterial effect of the Nd: YAG laser: an in vitro study *JOE* 1995 Aug; 21(8): 415-417.
45. Gomes A, Drucker B, Lilley D. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod Journ* 1994 Nov; 27(6): 291-298.

46. Safavi K, Nichols C. Alteration of biological properties of bacterial LPS by calcium hydroxide treatment. JOE 1994 Mar; 23(3): 127-129.
47. Siqueira F, Goncalves B. Actibacterial activities of root canal sealers against selected anaerobic bacteria. JOE 1996 Feb; 22(2): 79-80.
48. Siqueira F, Uzeda, M de, Fonseca E. A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. JOE 1996 Jun; 92(6): 308-310.
49. Love M. Regional variation in root dentinal tubule infection by *Streptococci gordoni*. JOE 1996 Jun; 2(6): 91-93.
50. Nagaoka S, Miyagaki Y, Liu H, Iwamoto Y, Kitano M. Bacterial invasion into dentinal tubules of human vital and non-vital teeth. JOE 1995 Feb; 21(2): 70-73.
51. Hirai K, Tagami A, Okuda K. Isolation and clasification of anaerobic bacteria from pulp cavities of non-vital teeth in man. Bull Tokio Dent Coll. 1991 Aug; 32(3): 95-98.
52. Nissan R, Segal H, Pashley D, Stevens R. Ability of bacterial endotoxin to diffuse through human dentin. JOE 1995 Feb; 21(2): 62-64.
53. Pissiotis E, Spangberg E. Dentin permeability to bacterial proteins in vitro. JOE 1994 Mar; 20(3): 118-122.
54. Kiryu T, Hoshino E, Iwaku M. Bacteria invading periapical cementum. JOE 1994 Apr; 20(4): 169-172.
55. Liébana J. Microbiología Oral. 1º edición. Madrid: Editorial Interamericana - Mc Graw – Hill; 1995.
56. Hosoya S, Matsushima K. Stimulation of interleukin-1b production of human dental pulp cells by *Porphyromonas endodontalis* LPS. JOE 1997 Jan; 23(1): 39-42.
57. Siqueira F, Uzeda M de, Varejao E. Sintomatologia clinica persistente devido infeccao endodontica por *Fusobacterium nucleatum*. Rev Gaucha Odontol 1995 May/Jun; 43(3): 149-152.

58. Sundqvist G, Eckerbom M, Larsson P, Sjogren U. Capacity of Anaerobic bacteria from necrotic dental pulps to induce purulent infections. *Infect Immun* 1979 Aug; 25(2): 685-693.
59. Bae K-S, Baumgartner C, Shearer R, David L. Occurrence of *Prevotella nigrescens* and *Prevotella intermedia* in infections of endodontic origin. *JOE* 1997 Oct; 23(10): 620-623.
60. Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1997 Apr; 71(4): 492-495.
61. Hashioka K, Suzuki K, Yoshida T, Nakane A, Horiba N, Nakamura H. Relationship between clinical symptoms and enzyme-producing bacteria isolated from infected root canals. *JOE* 1994 Feb; 20(2): 75-77.
62. Nakane A, Yoshida T, Nakata K, Horiba N, Nakamura H. Effects of LPS on human dental pulp cells. *JOE* 1995 Mar; 21(3): 128-130.
63. Debelian J, Olsen I, Tronstad L. Bacteremia in conjunction with endodontic therapy *Endod Dental Traumatol* 1995; 1: 142-149.
64. Oguntebi B, Slee M, Tanzer M, Langeland K. Predominant microflora associated with human dental periapical abscesses. *J Clin Microb* 1982 May; 15(5): 964-966.
65. Williams B, McCann GF, Schoenknecht FD. Bacteriology of dental abscesses of endodontic origin. *J Clin Microb* 1983 Oct; 18(4): 770-774.
66. Bolstad I, Jensen H, Bakken V. Taxonomy, biology and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clin Microb Rev* 1996 Jan; 9(1): 55-71.
67. Bolstad I, Jensen H. Complete sequence of omp 1, the structural gene encoding the 40-kDa outer membrane protein of *Fusobacterium nucleatum* strain fev1. *Gene*. 1993 May; 132: 107-112.
68. Bolstad I, Tommassen J, Jensen H. Sequence variability of the 40-kDa outer membrane proteins of *Fusobacterium nucleatum* strains and a model for the topology of the proteins. *Mol Gen Genet*. 1994; 244: 104-110.

69. Brook I, Walker R. The relationship between *Fusobacterium nucleatum* species and other flora in mixed infections. *J Med Microb* 1986; 21: 91-100.
70. Brook I. Encapsulated anaerobic bacterian in synergistic infections. *Microb Rev* 1986 Dec; 50(4): 452-457.
71. Haake S, Wang X. Clonning and expression of FomA, the mayor outer membrane protein gen of *Fusobacterium nucleatum*. *Arch Oral Biol* 1997 Jan; 42(1): 19-24.
72. Nunes P, Nilsen R, Kristoffersen T, Jonson R. Spontaneous gingival antibody production of *Fusobacterium nucleatum* outer membrane in patients with adult periodontitis. *Eur J Oral Sci* 1995 Apr; 103(2-1): 77-83.
73. Holt J, Krieg N, Sneath P, Staley J. *Bergeys Manual of Determinative Bacteriology*. 5° Edition. Baltimore: Editorial Willians & Wilkins; 1994.
74. Koneman E, Alien S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. *Diagnóstico Microbiológico*. 5° Edición. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana; 1999.
75. Liebana J. *Microbiología Oral*. 2° Edición. México DF: editorial Mc Graw-Hill. Interamericana; 2002.
76. Singer E, Buckner A. Butyrate and propionate: important components of toxin dental plaque extracts. *Infect Immun* 1981 May; 32(2): 458-463.
77. Bartelt M. *Diagnostic bacteriology*. 1° Edición. Philadelphia: Editorial Davis Company; 2000.
78. Marsh P, Martin M. *Oral Microbiology*. 4° edition. England: Editorial Wright; 2000.
79. Holt S, Kesavalu L, Walker S, Genco C. Virulence factors of *Porphyromona gingivalis*. *Periodontol* 2000; 20: 168-238.
80. Olsen I, Shah N, Gharbia E. Taxonomy and biochemical characteristics of *Actinobacillus actinomycescomitans* and *Porphyromona gingivalis*. *Periodontol* 2000; 20: 14-52.

81. Shah N, Hardie M. Taxonomic studies on *Bacteroides melaninogenicus*, *Bacteroides oralis*, *Bacteroides ruminicola* and related organisms. Res Clin Forums 1979; 1: 51–53.
82. Coykendall L, Kacmarek S, Slots J. Genetic heterogeneity in *Bacteroides*. Int J Syst Bacteriol 1980; 30: 559–564.
83. Okuda K, Takazoe I. The Role of *Bacteroides gingivalis* in Periodontal Disease. Adv Dent Res 1988; 2(2): 260-268.
84. Van Winkelhoff V, Van Steenberghe T, Graff J de. The role of black pigmented *Bacteroides* in human oral infections. J Clin Periodontol. 1988; 15: 145-155.
85. Bogen G, Slots J. Black-pigmented anaerobic rods in closed periapical lesions. Inter Endod Jour 2001 Dec; 32(3): 204 – 210.
86. Siqueira JJr, Rôças I, Oliveira J, Santos K. Detection of Putative Oral Pathogens in Acute Periradicular Abscesses by 16S rDNA-Directed Polymerase Chain Reaction. JOE 2001 Mar; 27(3): 164-167.
87. Lamont R, Jenkinson H. Life below the gum line: Pathogenic Mechanism of *Porphyromona gingivalis*. Microbiol Mol Biol Rev 1999; 62(4): 1244-1263.
88. Shah H, Collins M. Prevotella, a New genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. Int J Syst Bacteriol 1990; 40(2): 205-208.
89. Slots J, Taubman M. Contemporary Oral Microbiology and Immunology. 1° edition. St. Louis: Editorial Mosby; 1992.
90. Grenier D, Turgeron J. Occurrence and identity of proteolytic bacteria in adult periodontitis. J Periodontol Res 1994; 29: 365 – 370.
91. Balows A, Hausler S. Manual of Clinical Microbiology. 5° edición. Massachusetts: American Society for Microbiology; 1999.
92. Joklik A. Zinnsser Microbiología. 20° edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1994: 841-848, 855-856.
93. Estrela C. Ciencia endodóntica. 1° Edición. México DF: Editora Artes Médicas Ltda; 2005.

94. Tobón D. Manual Básico de Endodoncia. 1° Edición. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2003.
95. Glennon P, Setchell J, Gulabirata K. Prevalence of and factors affecting post obturation pain in patients undergoing root canal treatment. Int Endod J 2004; 37: 381-391.
96. Otzan M. Endodontic treatment of teeth associated with a large periapical lesion. Int Endod J 2000; 35: 73-76.
97. González A, González N. Infecciones bacterianas de origen pulpar y periodontal. Oral Med Oral Pathol Oral Surg 2004; 9: 32-36.
98. Abou-Rass M, Bogen M. Microorganisms in closed periapical lesions. Int Endod J 1998; 31: 39-47.
99. Castaño D, Gómez J, Rosales P, Contreras A. Microbiología en pericoronitis aguda de terceros molares mandibulares. Rev Estomatol 2003; 11: 13-19.
100. Berkiten M, Okar I, Berkiten R. In Vitro Study of the Penetration of *Streptococcus sanguis* and *Prevotella intermedia* Strains into Human Dentinal Tubules. JOE 2000 Apr; 26(4): 236-239.
101. Lode H, Stahlmann R. Enterococcus faecalis. Zeitschrift für Chemotherapie 2005 Steinplatz 1.
102. Murray R. Microbiologia Médica. 4ª edición. Rio de Janeiro: editorial Guanabara Koogan; 2004.
103. Von Henning R, Daschner F, Schumacher M. Prävalenz nosokomialen Infektionen: Qualitätssicherung in der Krankenhaushygiene. Nosokomiale Infektionen in Deutschland NIDEP-Studie; 1995.
104. Murray E. The life and time of the Enterococcus. Clin Microbiol Rev 1990 Jan; 3(1): 46-65.
105. Love M. Bacterial adhesions: their role in tubule invasion and endodontic disease. Aust Endod J 2002 Apr; 28(1): 25-28.
106. Suart CH. *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and concepts in retreatment. J Endod 2006 Feb; 32(2): 93-98.

107. Pinheiro T. Microorganisms from canals of root – filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003 Jan; 36(1): 1-11.
108. Siqueira S, Rôças N. Polymerase chain reaction – based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg* 2004 Jan; 97(1): 85-94.
109. Ferrari H, Cai S, Bombana AC. Effect of endodontic procedures on Enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infections. *Int Endod J* 2005 Jun; 38(6): 372-380.
110. Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship To Endodontic Disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15(5): 308-320.
111. Akpta E, Blechman H. Bacterial invasion of pulpal dentin wall in vitro. *J Dent Res* 1982 Feb; 61(2): 435-438.
112. Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol* 1985 Oct; 1(5): 170-175.
113. Geijersstam A. Antimicrobial susceptibility and molecular analysis of *Enterococcus faecalis* originating from endodontic infections in Finland and Lithuania. *Oral Microbiol Immunol* 2006 Jun; 21(3): 164-168.
114. Leclercq R. Enterococci acquire new kinds of resistance. *Clin Infect Dis* 97 Jan; 24(1): 808-845.
115. Love M. *Enterococcus faecalis* – a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001 Jul; 34(5): 399-405.
116. Evans M. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 2002 Mar; 35(3): 221-228.
117. Matos M. Avaliação *in vitro* da eficácia de técnicas endodônticas de preparo mecânico na redução de *Enterococcus faecalis*. Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre pelo programa de pós-graduação área de concentração: endodontia. Universidade de Taubaté. Sao Paulo; 2007

118. Rodriguez C. Eficacia antimicrobiana de soluciones irrigadoras de canales radiculares. Dissertação apresentada ao Programa de Maestrado em Medicina Tropical. Universidad Federal de Goias; 2000: 27.
119. Thompson W. Guia práctica ilustrada de las plantas medicinales. 1º Edición. Barcelona: Editorial Blume; 1981: 119.
120. Duraffourd C, D' hervicourt L, Lapraz JC. Cuadernos de Fitoterapia Clínica. 1º edición. París: editorial Masson SA; 1983
121. Diccionario de botánica” Editorial labor S.A. Barcelona – España.1979.
122. Look de ugaz, O “Investigación fitoquímica”. Métodos en el estudio de productos naturales PUCP Fondo editorial 1988.
123. Strasburger E, Noll E, Schenk H. Tratado de Botánica. 7º edición: ediciones Marin Barcelona - España 1978.
124. Augusto W. Fraccionamiento del aceite esencial de *M. Mollis* (muña) y su aplicación en la inhibición del brotamiento de papa cultivar mariva. Tesis de bachiller para Químico. Lima: UNALM; 1975.
125. Morales A. Estudio de la extracción y características de los aceites esenciales de *M. Mollis* y de *S. Sagittata* (hierba buena). Tesis de bachiller para Químico. Lima: UNALM; 1973.
126. Marques AMC. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de soluções irrigadoras à base de clorexidina em diferentes concentrações sobre microorganismos freqüentemente encontrados no canal radicular. Estudo in vitro. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Bahia Salvador; 1997.
127. Agapito T. y Sung I. Fito Medicina 110 Plantas Medicinales. 1º edición. Lima: Editorial Isabel IRL; 2003.
128. Goldsmith J. Thorpe's Dictionary of applied Chemistry. 10º Edición. Londres: Editorial Sir Ian Heilbron; 1967(8): 658.
129. Miller E. Fisiología Vegetal. 1º Edición. México D.F.: Editorial Centro Regional de Ayuda Técnica; 1967: 111-114.
130. Meyer L. Introducción a la Fisiología Vegetal. 3º Edición. Buenos Aires: Editorial EUDEBA; 1970: 272.

131. Guenter M. The essential Oils. 1° Edición. New York: Editorial D. Van Nostrand company; 1960.
132. Ricse C. Contribución al estudio de la esencia de *Minthostachys setosa* epl. Tesis de bachiller para Químico. Lima: UNMSM; 1962.
133. Chobanu L. Variability of the composition of terpenoids for *Mentha longifolia.sp* Caucasica Brig. In ontogénesis. Mater Resp Kon. Fiziol Bokhim 1976: 262-271.
134. Kakrani K, Nai V. Antibacterial and antifungal activity of volatile oil from the seeds of *Aglaia odoratissima*. Fitoterapia 1982; 53: 107-109.
135. Motle P. Proyecto de factibilidad para la instalación de una planta de extracción de aceite esencial de Menta. Tesis de bachiller. Lima: UNI; 1977.
136. Alzamora L, Morales L, Armas L, Fernández G. Medicina Tradicional en el Perú: Actividad antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. Anales de la Facultad de Medicina UNMSM 2001; 62 (2): 156 – 161.
137. Bardales A, Yarlequé M, Rueda L. Estudio biológico y Fitoquímica del extracto alcohólico de *Minthostachys mollis* "Muña". I Congreso Internacional de Biología - XIII Congreso Nacional de Biología- VII Simposium de Educación en Ciencias Biológicas. Lima: Perú; 1999.
138. Sotta N. Plantas aromáticas y medicinales de la. región Arequipa. 1° edición. Arequipa: Editorial Akuarella; 2000: 99-100.
139. Weberbauer M. El mundo vegetal de los Andes Peruanos. 1° edición. Lima: Editorial Lumen S.A.; 1945.
140. Oviedo F. Ensayos toxicológicos preliminares con aceite esencial de 'muña'. Tesis de bachiller. Cuzco: UNSAAC; 1979.
141. Jaroslav S. Vocabulario de los nombres vulgares de la Flora Peruana. 1° edición. Lima: Editorial Salesiana; 1970.
142. Gibaja S. Investigaciones químicas de la muña *M. mollis*. Tesis de bachiller para el título de Químico. Lima: UNMSM; 1960.

143. Agencia de cooperación técnica del Perú (ACT) del Instituto Interamericano de cooperación para la agricultura (IICA). Plantas medicinales en atención primaria de salud, agroindustria, fitoquímica y ecoturismo: Perspectivas de desarrollo en la región Los Libertadores Wari (curso regional). Ayacucho (Perú): 1999. p: 237 – 246.
144. Negroni M. Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica. 1° edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1999. p: 203 - 215
145. Brooks G, Butel J, Ornston N. *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. 15° edición. México: Editorial Manual Moderno; 1996.
146. Jimenez P, Navarro L, Murtra J. Estudio de la morfología y composición del barro dentinario. *Oris* 1992; 1: 19 - 27.
147. Stewart G. The importance of chemo mechanical preparation of root canal. *Oral Surgery* 1955; 8(9): 993 – 997.
148. Silva C. Efectivida de antimicrobiana do hipoclorito de sodio e clorexidina como irrigantes endodónticos. Master's thesis. Porto Alegre: Luteran University of Brasil; 1999.
149. Brook I, Frazier H, Gher Jr. Microbiology of periapical abcesses and asociated maxillary sinusitis. *J Periodontol* 1996; 67: 608-610.
150. Nisengard J, Goodman A, Nisengard N, Newman G. Infeccoes periapicais. In: Guanabara Koogan, Rio de janeiro. *Microbiologia Oral e Inmunologia* 1997; 2: 336-341.
151. Kuriyama T, Karasawa T. Bacteriologic features features and antimicrobial susceptibility in isolates from orofacial odontogenic oinfections. *Oral Med Oral Patho Oral Surg* 2000; 90: 5.
152. Peters LB, Wesselink Pr, Van Wilkelhoff J. Combinations of bacterial species in endodontic infections. *Int Endodon Journal* 2002; 35: 698-702.
153. Jacinto C, Gomes A, Ferras R, Zaia A, Souza J. Microbiological analysis of infected root canal syntomatic and asyntomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of Selle isolated anaerobic bacteria. *Oral Microbiology Inmunology* 2003; 18: 285-292.

154. Gomes A, Pinheiro T, Gade-Neto R, Sousa R, Feltas CR, Zaia A et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiology and Immunology* 2004; 19: 71-76.
155. Noda M, Komatsu H. Antibiotic susceptibility of bacteria detected from the root canal exudate of persistent apical periodontitis. *Journal of Endodontics* 1997; 26(4): 221-224.
156. Pinheiro T, Gomes P. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiology and Immunology* 2003; 18: 100-103.
157. Bral M, Brounstein N. Antimicrobianos y enfermedades periodontales. *Clínicas Odontológicas Norteamericanas* 1988; 2: 234 - 239.
158. Andean Products. El futuro de los productos andinos en la región alta y los valles centrales de los Andes. Informe Roadmapping. Perú; 2006.
159. Siani C, Franco L, Sousa C de, Oliveira M. Óleos essenciais / Potencial anti-inflamatorio. *Biotecnología Ciencia y Desarrollo* 1998; 16: 1-11.
160. Palacios J. Plantas medicinales nativas del Perú II. 2º edición. Lima: Editorial CONCYTEC; 1997: 180-182.
161. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la investigación. 3º edición. México: Editorial Mc Graw Hill; 2003: 550.

ANEXOS

INDICE DE CUADROS Y GRAFICOS

CUADROS

CUADRO 1. Clasificación de las lesiones periapicales.....	14
CUADRO 2. Bacterias frecuentemente aisladas en lesiones periapicales crónicas	15
CUADRO 3. Presencia de halo de inhibición en cultivos de <i>F. Nucleatum</i> enfrentados al aceite esencial de <i>M. mollis</i>	84
CUADRO 4. Efectividad antibacteriana del aceite esencial de <i>M. mollis</i> en cultivos de <i>F. nucleatum</i>	86
CUADRO 5. Efectividad antibacteriana del aceite esencial de <i>M. mollis</i> en cultivos de <i>F. nucleatum</i> según las pautas de Duraffourd.....	89
CUADRO 6. Presencia de halo de inhibición en cultivos de <i>P. melaninogénica</i> enfrentados al aceite esencial de <i>M. mollis</i>	91
CUADRO 7. Efectividad antibacteriana del aceite esencial de <i>M. mollis</i> en cultivos de <i>P. melaninogénica</i>	93
CUADRO 8. Efectividad antibacteriana del aceite esencial de <i>M. mollis</i> en cultivos de <i>P. melaninogénica</i> según las pautas de Duraffourd.....	96
CUADRO 9. Presencia de halo de inhibición en cultivos de <i>E. faecalis</i> enfrentados al aceite esencial de <i>M. mollis</i>	98
CUADRO 10. Efectividad antibacteriana del aceite esencial de <i>M. mollis</i> en cultivos de <i>E. faecalis</i>	100
CUADRO 11. Efectividad antibacteriana del aceite esencial de <i>M. mollis</i> en cultivos de <i>E. faecalis</i> según las pautas de Duraffourd.....	103
CUADRO 12. Presencia de halo de inhibición en cultivos bacterianos de muestras provenientes de conducto radicular con Periodontitis apical crónica enfrentados al aceite esencial de <i>M. mollis</i>	105
CUADRO 13. Efectividad antibacteriana del aceite esencial de <i>M. mollis</i> en cultivos bacterianos de muestras provenientes de conducto radicular con Periodontitis apical crónica.....	107

CUADRO 14. Efectividad antibacteriana del aceite esencial de *M. mollis* en cultivos bacterianos de muestras provenientes de conducto radicular con Periodontitis apical crónica según las pautas de Duraffourd109

CUADRO 15. Presencia de halo de inhibición en cultivos bacterianos de muestras provenientes de conducto radicular con Periodontitis apical crónica - infección persistente enfrentados al aceite esencial de *M. mollis*.....111

CUADRO 16. Efectividad antibacteriana del aceite esencial de *M. mollis* en cultivos bacterianos de muestras provenientes de conducto radicular con Periodontitis apical crónica - infección persistente.....113

CUADRO 17. Efectividad antibacteriana del aceite esencial de *M. mollis* en cultivos bacterianos de muestras provenientes de conducto radicular con Periodontitis apical crónica - infección persistente según las pautas de Duraffourd.....115

CUADRO 18. Comparación de la efectividad antibacteriana cuantitativamente del aceite esencial de *M. mollis* sobre especies bacterianas117

GRAFICOS

GRAFICO 1. Presencia de halo de inhibición en cultivos de *F. nucleatum* enfrentados al aceite esencial de *M. mollis*85

GRAFICO 2. Efectividad antibacteriana del aceite esencial de *M. mollis* en cultivos de *F. nucleatum*..... 88

GRAFICO 3. Efectividad antibacteriana del aceite esencial de *M. mollis* en cultivos de *F. nucleatum* según las pautas de Duraffourd.....90

GRAFICO 4. Presencia de halo de inhibición en cultivos de *P. melaninogénica* enfrentados al aceite esencial de *M. mollis*92

GRAFICO 5. Efectividad antibacteriana del aceite esencial de *M. mollis* en cultivos de *P. melaninogénica*.....95

GRAFICO 6. Efectividad antibacteriana del aceite esencial de *M. mollis* en cultivos de *P. melaninogénica* según las pautas de Duraffourd.....97

GRAFICO 7. Presencia de halo de inhibición en cultivos de *E. faecalis* enfrentados al aceite esencial de *M. mollis*.....99

GRAFICO 8. Efectividad antibacteriana del aceite esencial de <i>M. mollis</i> en cultivos de <i>E. faecalis</i>	102
GRAFICO 9. Efectividad antibacteriana del aceite esencial de <i>M. mollis</i> en cultivos de <i>E. faecalis</i> según las pautas de Duraffourd.....	104
GRAFICO 10. Presencia de halo de inhibición en cultivos bacterianos de muestras provenientes de conducto radicular con Periodontitis apical crónica enfrentados al aceite esencial de <i>m. Mollis</i>	106
GRAFICO 11. Efectividad antibacteriana del aceite esencial de <i>M. mollis</i> en cultivos bacterianos de muestras provenientes de conducto radicular con Periodontitis apical crónica.....	108
GRAFICO 12. Efectividad antibacteriana del aceite esencial de <i>M. mollis</i> en cultivos bacterianos de muestras provenientes de conducto radicular con Periodontitis apical crónica según las pautas de Duraffourd.....	110
GRAFICO 13. Presencia de halo de inhibición en cultivos bacterianos de muestras provenientes de conducto radicular con Periodontitis apical crónica - infección persistente enfrentados al aceite esencial de <i>M. mollis</i>	112
GRAFICO 14. Efectividad antibacteriana del aceite esencial de <i>M. mollis</i> en cultivos bacterianos de muestras provenientes de conducto radicular con Periodontitis apical crónica - infección persistente.....	114
GRAFICO 15. Efectividad antibacteriana del aceite esencial de <i>M. mollis</i> en cultivos bacterianos de muestras provenientes de conducto radicular con Periodontitis apical crónica - infección persistente según las pautas de Duraffourd.....	116
GRAFICO 16. Comparación de la efectividad antibacteriana cuantitativamente del aceite esencial de <i>M. mollis</i> sobre especies bacterias.....	118
GRAFICO 17. Efectividad antibacteriana de la dilución al 100% del aceite esencial de <i>M. mollis</i>	119
GRAFICO 18. Efectividad antibacteriana de la dilución al 50% del aceite esencial de <i>M. mollis</i>	120
GRAFICO 19. Efectividad antibacteriana de la dilución al 25% del aceite esencial de <i>M. mollis</i>	121

FICHA DE RECOLECCION DE DATOS

Microorganismo: Fecha:	Diámetro de Halo de Inhibición (incluido el disco) mm				
	Placa 01	Placa 02	Placa 03	Placa 04	Placa 05
Aceite "muña" puro					
Aceite "muña" al 50%					
Aceite "muña" al 25%					
Paramonoclorofenol alcanforado (control +)					
Alcohol al 70% (control -)					



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



CONSTANCIA N° 001-ICFYRNT-FFB-2009

LA CURATOR DEL HERBARIO DEL INSTITUTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y RECURSOS NATURALES TERAPÉUTICOS DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (completa), recibida del **señor Lito Azaña Espinoza**, Bachiller de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha sido estudiada y clasificada como: ***Minthostachys mollis (Spach) Griseb*** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: METHACHLAMYDEAE

ORDEN: TUBIFLORAE

FAMILIA: LAMIACEAE


GÉNERO: MINTHOSTACHYS

ESPECIE: MINTHOSTACHYS mollis (Spach) Griseb

Nombre vulgar: "Muña"

Se extiende la siguiente constancia a solicitud del interesado, para fines de estudio.

Lima, 06 de julio de 2009


MG. MARGARITA LOBATÓN ERAZO
Curator del Herbario

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO DEL ALIMENTO Y DEL TOXICO"

FOTOGRAFIAS



1. Centro Poblado Menor de Muruhuay, Tarma



2. Recolección *Minthostachys mollis* “muña”



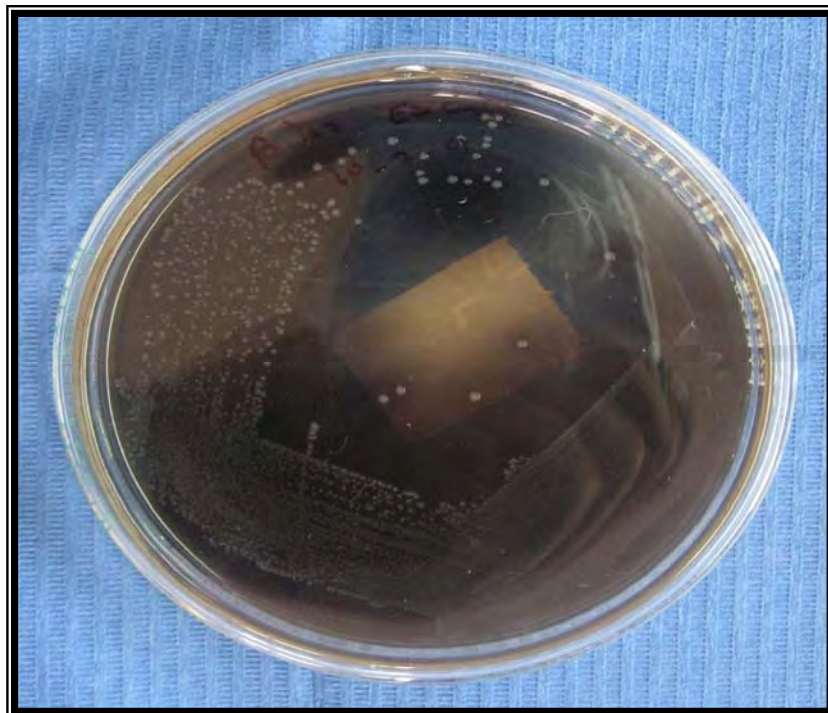
3. proceso de depuración y secado de la muestra



4. Obtención del aceite esencial por arrastre de vapor de agua



5. Paramonoclorofenol alcanforado, el aceite esencial de *M. mollis* puro y alcohol a 70°



6. Reactivación cepa ATCC



7. Embebiendo el disco de papel con ayuda de micropipeta (10ul)



8. Colocación de los discos embebidos en la placa con ayuda de pinza

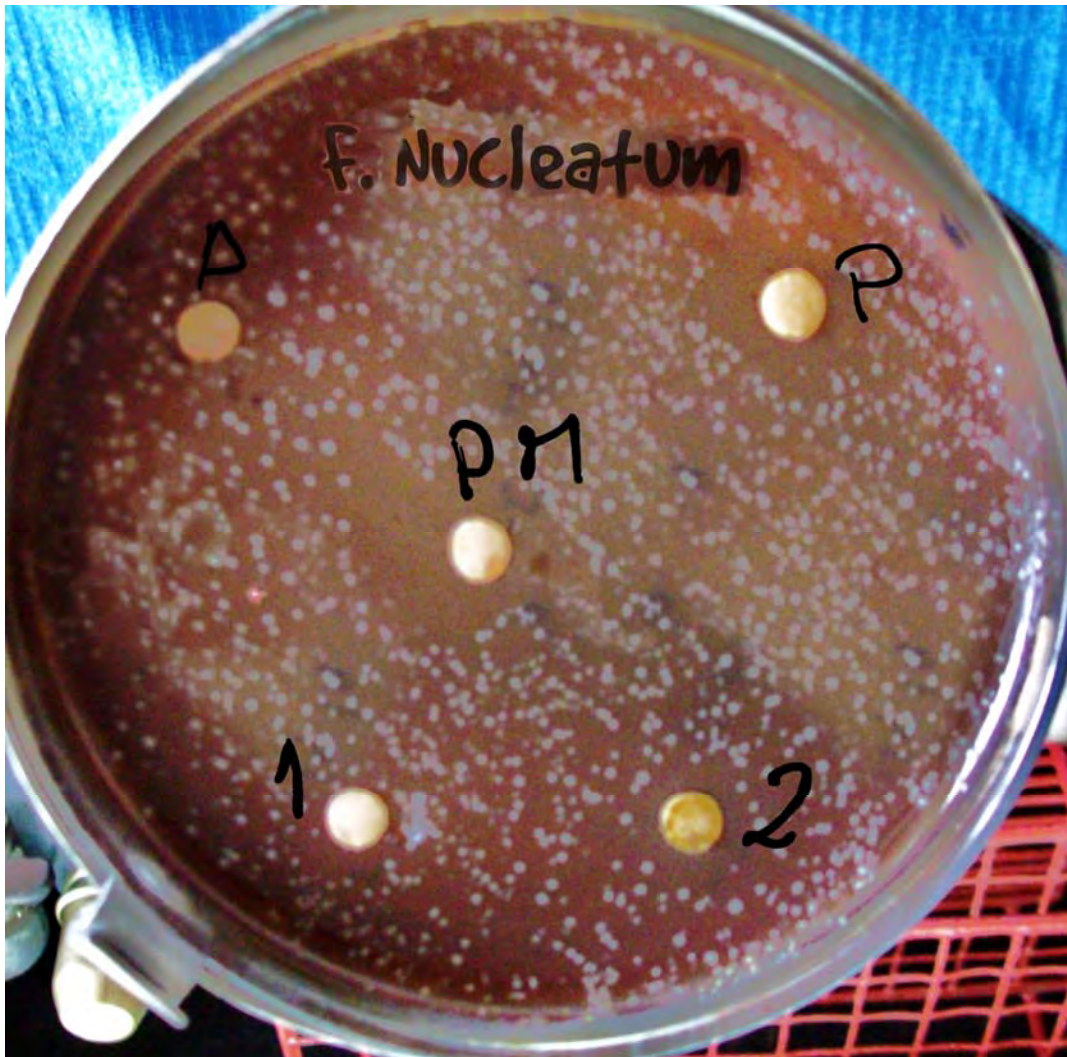


9. Incubadora a 37°C



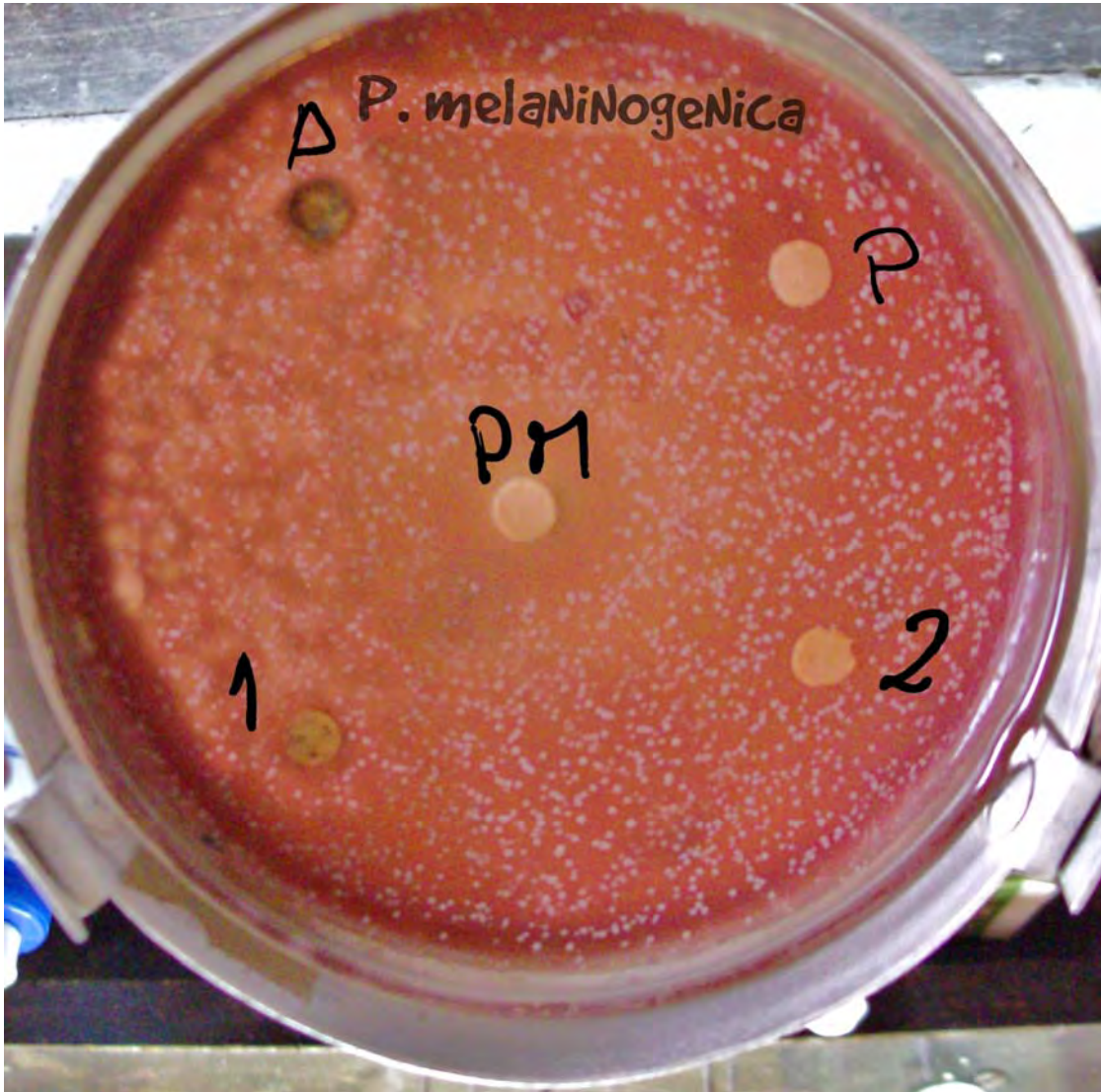
10. Jarra de anaerobiosis

FUSOBACTERIUM NUCLEATUM



11. Halos de inhibición formados a la semana de incubación

PREVOTELLA MELANINOGENICA



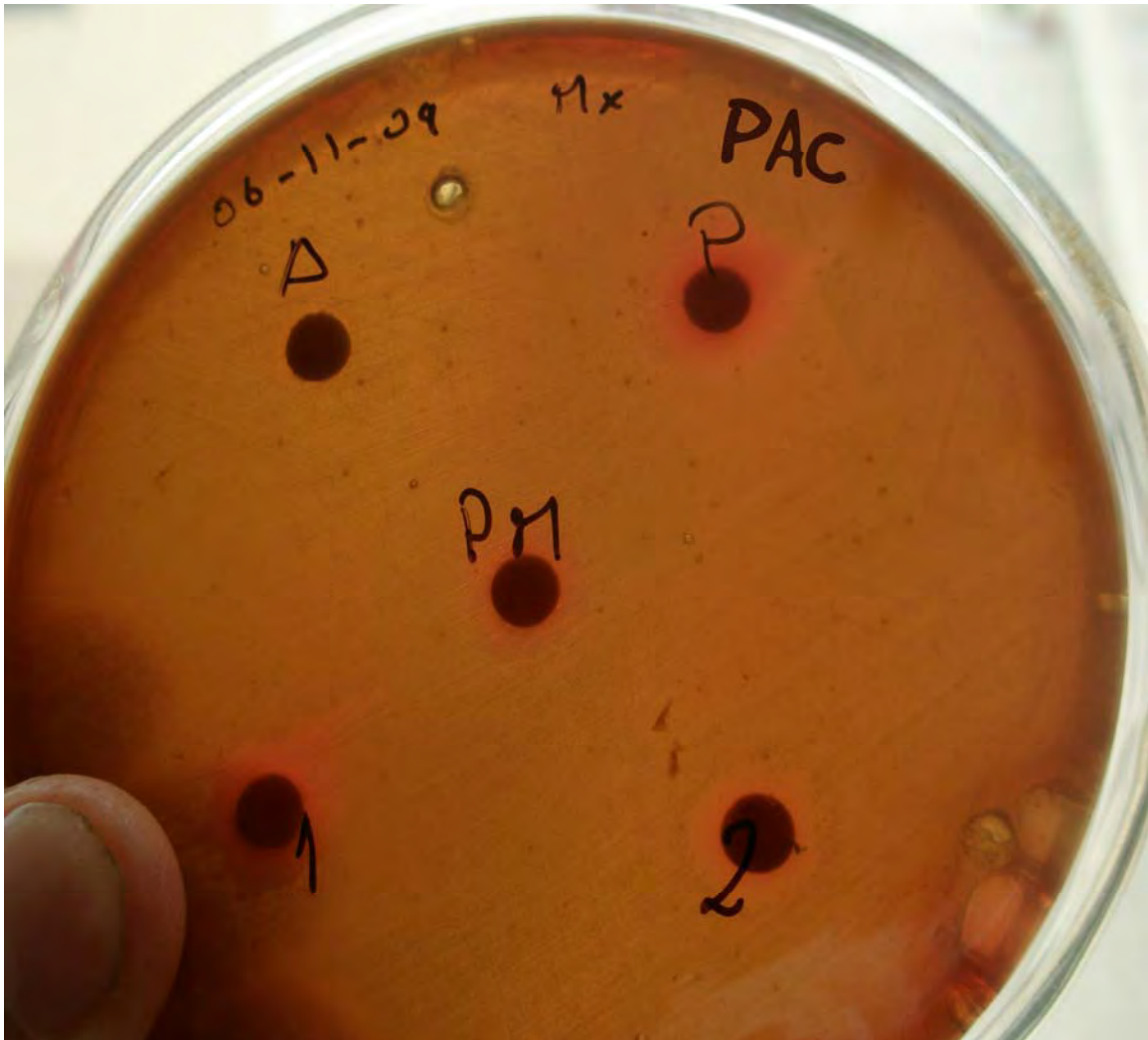
12. Halos de inhibición formados a la semana de incubación

ENTEROCOCCUS FAECALIS



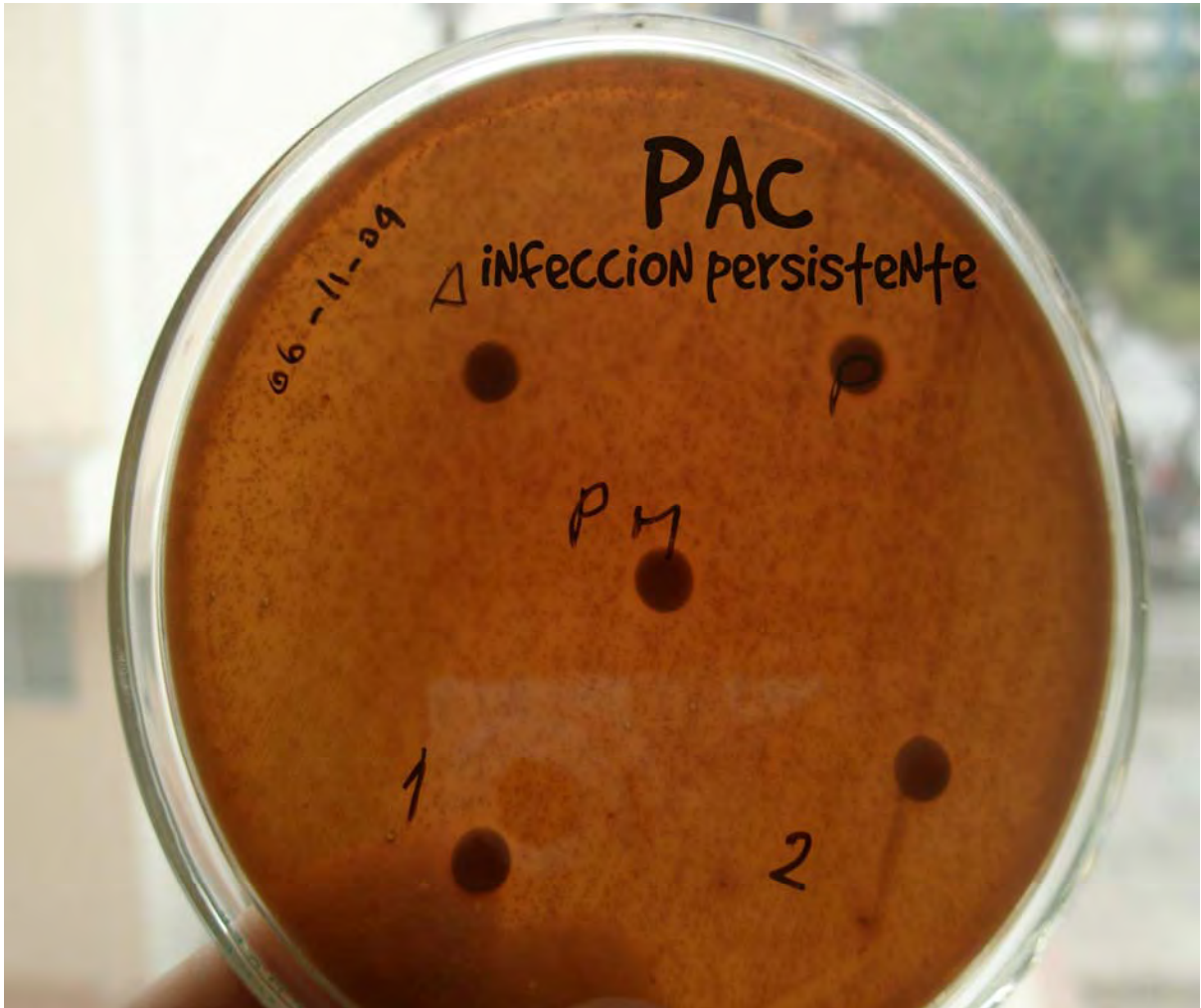
13. Halos de inhibición formados a las 48 horas de incubación

PERIODONTITIS APICAL CRONICA



14. Halos de inhibición formados a las 72 horas de incubación

PERIODONTITIS APICAL CRONICA INFECCION PERSISTENTE



15. Halos de inhibición formados a las 72 horas de incubación