

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Odontología
Segunda Especialidad en Odontopediatría



EFFECTO ANTIMICROBIANO *IN VITRO* DE LA “*Annona muricata*” En *Enterococcus faecalis* DE CONDUCTOS RADICULARES INFECTADOS EN NIÑOS DE LA CIUDAD DE AREQUIPA, 2017.

Tesis Presentada por la Cirujano Dentista:

Quispe Sanca, Brígida

Para optar el Título Profesional de

Segunda Especialidad en Odontopediatría

Asesor: Dr. Figueroa Banda, Alberto

Arequipa- Perú

2018

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
URB. SAN JOSE S/N - UMACOLLO

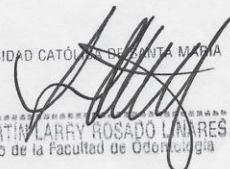
DR LARRY ROSADO LINARES

BOLETA DE DICTAMEN DE BORRADOR DE TESIS Nro 113

Vista la solicitud que presenta don (ña **QUISPE SANCA BRIGIDA** sobre el dictamen de la Tesis titulada "EFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DE LA ANNONA MURICATA FRENTE FRENTE ENTEROCOCCUS FAECALIS DE CONDUCTOS RADIVULARES INFECTADOS EN NIÑOS DE LA CIUDAD DE AREQUIPA 2017" y en concordancia con la Ley Universitaria 30220, y el Art. 13 del Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Odontología, se nombra el JURADO DICTAMINADOR para que en el lapso de ocho a diez días, se sirvan evaluar el dictamen correspondiente

DR LARRY ROSADO LINARES
DR AGUSTIN CARPIO PONCE
DRA ELSA VASQUEZ HUERTA


Arequipa, 18 de DICIEMBRE del 2017

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA

Dr. MARTIN LARRY ROSADO LINARES
Decano de la Facultad de Odontología

INFORME

Sr. Decano:
Habiendo revisado el presente Borrador de Tesis y sugiero lo siguiente:
1) Orden de paginas preliminares
2) Hipotesis
3) Técnica
4) Tamaño de los grupos: No de réplicas
5) Títulos de tablas

Asimismo la interezada absolto en a diligencias el presente Borrador de Tesis cuenta con
MI OPINION FAVORABLE

Arequipa, 2017 Dic. 

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
URB. SAN JOSE S/N - UMACOLLO

DR AGUSTIN CARPIO PONCE

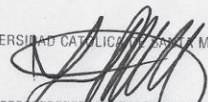
BOLETA DE DICTAMEN DE BORRADOR DE TESIS Nro 113

Vista la solicitud que presenta don (ña **QUISPE SANCA BRIGIDA** sobre el dictamen de la Tesis titulada "**EFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DE LA ANNONA MURICATA FRENTE FRENTE ENTEROCOCCUS FAECALIS DE CONDUCTOS RADIVULARES INFECTADOS EN NIÑOS DE LA CIUDAD DE AREQUIPA 2017**" y en concordancia con la Ley Universitaria 30220, y el Art. 13 del Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Odontología, se nombra el JURADO DICTAMINADOR para que en el lapso de ocho a diez días, se sirvan evaluar el dictamen correspondiente

DR LARRY ROSADO LINARES
DR AGUSTIN CARPIO PONCE
DRA ELSA VASQUEZ HUERTA

Arequipa, 18 de DICIEMBRE del 2017

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARÍA


Dr. MARTIN LARRY ROSADO LINARES
Decano de la Facultad de Odontología

INFORME

*Dr. Decano, buello con informacion q' el presente
Trabajo de Investigación ha corregido todas las
def observaciones indicadas, por lo tanto se le da
por por su institución*

*Atte
Dr. Agustin Carpio*

Arequipa, 2017 *08-01-18*

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
URB. SAN JOSE S/N - UMACOLLO

DRA ELSA VASQUEZ HUERTA

BOLETA DE DICTAMEN DE BORRADOR DE TESIS Nro 113

Vista la solicitud que presenta don (ña **QUISPE SANCA BRIGIDA** sobre el dictamen de la Tesis titulada "EFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DE LA ANNONA MURICATA FRENTE FRENTE ENTEROCOCCUS FAECALIS DE CONDUCTOS RADIVULARES INFECTADOS EN NIÑOS DE LA CIUDAD DE AREQUIPA 2017" y en concordancia con la Ley Universitaria 30220, y el Art. 13 del Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Odontología, se nombra el JURADO DICTAMINADOR para que en el lapso de ocho a diez días, se sirvan evaluar el dictamen correspondiente

DR LARRY ROSADO LINARES
DR AGUSTIN CARPIO PONCE
DRA ELSA VASQUEZ HUERTA

Arequipa, 18 de DICIEMBRE del 2017

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARÍA
Dr. MARTA LARRY ROSADO LINARES
Decano de la Facultad de Odontología

INFORME

Los puntos a evaluar son:
1) Lengua título, 2) Determinación del Problema 3) métodos
investigativos e Hipótesis, 4) contenido de inclusión, 6) antecedentes
7) Resumen cuadro y gráficos 8) conclusiones e
recomendaciones.

*Se le pide con bastante urgencia para que
prosigua su trámite con prontitud.*

Atte. *[Firma]*

Arequipa, 2017 08 de Enero

DEDICATORIA

A Dios, porque él es benigno, esperanza, a quien debemos nuestra existencia y la gracia de disfrutar todo lo que la vida nos pueda brindar.

A los estudiantes y colegas quienes están relacionados con la salud bucal del niño y su grupo familiar.



INTRODUCCIÓN

Los productos naturales derivados de las plantas, se han utilizado desde tiempo remoto para ayudar a la humanidad a mantener su salud. Durante el último siglo, los fitoquímicos en las plantas han sido focos de estudio fundamental para el descubrimiento farmacéutico. La importancia de los ingredientes activos de las plantas en la agricultura, la medicina y la biotecnología han estimulado un interés científico significativo en las actividades biológicas de estas sustancias. A pesar de estos estudios, una gama restringida de especies de plantas ha experimentado una inspección científica detallada, una de estas plantas con uso tradicional extenso es *Annona muricata*.

En El Capítulo I Tenemos el planteamiento teórico en el que podemos apreciar la certeza bibliográfica de la *Annona muricata* por sus propiedades anticancerígenas y antimicrobianas, es preciso determinar por técnicas *in vitro* la relevancia de los extractos de hojas de esta especie frente a uno de los mayores microorganismos presentes en los conductos radiculares infectados como es *E. faecalis*, además de su comparación con el gluconato de clorhexidina al 0.12%. Por otro lado la diversidad de microorganismos encontrados dentro del conducto radicular y también la resistencia de algunas especies bacterianas es frecuentemente estudiado y de interés para un desarrollo continuo de nuevos productos irrigantes de conductos.

El objetivo fue determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* de la “*Annona muricata*” en diferentes concentraciones frente *Enterococcus faecalis* de conductos radiculares infectados en niños.

En El Capítulo II Se puede apreciar la técnica instrumentos y materiales de investigación, la población y muestra, procedimientos en las que detalla la ejecución de la investigación, durante la ejecución del presente trabajo de investigación se excluyeron niños con enfermedades sistémicas graves, uso de antibióticos en los últimos 30 días y niños menores de 6 años y mayores de 9 años.

En el Capítulo III En los resultados obtenidos en el proceso de investigación, han sido bastante favorables, de esta manera se ha validado la hipótesis de investigación. Teniendo como conclusión el efecto antimicrobiano *in vitro* de la “*Annona muricata*” a diferentes concentraciones frente *Enterococcus faecalis* de conductos radiculares infectados en niños de la ciudad de Arequipa, presentó una respuesta buena comparada con su prueba control del gluconato de clorhexidina al 0.12%. Cabe destacar que la eficacia del gluconato de clorhexidina es superior a la del extracto acuso, sin embargo, se puede minimizar el riesgo de contraer enfermedades bucales mediante la inhibición bacteria con extractos naturales a un menor costo.

En el anexo se muestra los instrumentos y secuencia fotográfica de aplicación durante la ejecución del trabajo de investigación.

INDICE GENERAL

INTRODUCCION.....	I
ABSTRACT.....	II
RESUMEN.....	III
CAPITULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACION.....	2
1.1 DETERMINACION DEL PROBLEMA.....	2
1.2 ENUNCIADO.....	2
1.3 DESCRIPCION DEL PROBLEMA.....	3
a. Área del conocimiento.....	3
b. Análisis u operacionalización de variables.....	3
c. Interrogantes básicas.....	3
d. Taxonomía de la investigación.....	4
1.4 JUSTIFICACION.....	4
a. Relevancia Social.....	4
b. Relevancia Científica.....	5
c. Viabilidad.....	5
2.OBJETIVOS.....	5
3. MARCO TEÓRICO.....	7
3.1 Marco conceptual.....	7
A. Annona muricata.....	7
A.1 Taxonomía.....	7
A.2 Descripción botánica.....	7
A.3 Usos en la medicina tradicional.....	8
A.4 Composición química.....	10
A.4.1. Fitoquímicos.....	10
A.4.2. Acetogeninas:.....	10
A.5 Actividad Biológica.....	12
B. Conductos radiculares.....	17
B.1 Vías de infección microbiológica:.....	17

B.2 Fisiopatología.....	20
B.3 Microbiología de las infecciones del canal radicular.....	21
B.4 Resistencia a drogas.....	23
a. Detección Quorum.....	24
C. Características de la Enterococcus faecalis.....	25
C.1 Prevalencia en las infecciones secundarias del canal radicular....	30
C.2 Factores de supervivencia.....	31
C.3 Métodos de erradicación.....	34
D. Ensayos in vitro.....	36
D.1 Método de difusión.....	36
3.2 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....	37
4. HIPOTESIS.....	39
CAPITULO II TÉCNICA, INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACIÓN.....	41
1.1 TÉCNICA.....	41
a. Identificación de la técnica	41
b. Esquematización.....	41
c. Diseño investigativo.....	41
c.1 Tipo.....	41
c.2 Esquema básico.....	42
c.3 Diagramación Operativa.....	42
c.4 Descripción de la técnica.....	42
1.2 INSTRUMENTO.....	48
a. Instrumento documental.....	49
b.- Instrumento Mecánico.....	49
1.4 MATERIALES.....	49
2. CAMPO DE VERIFICACION.....	50
3. ESTRATEGIAS DE RECOLECCION.....	51
4. ESTRATEGIA PARA MANEJAR LOS RESULTADOS.....	52
CAPITULO III: RESULTADOS.....	55

DISCUSION.....	67
CONCLUSIONES.....	68
RECOMENDACIONES.....	70
BIBLIOGRAFÍA.....	71
ANEXO.....	84

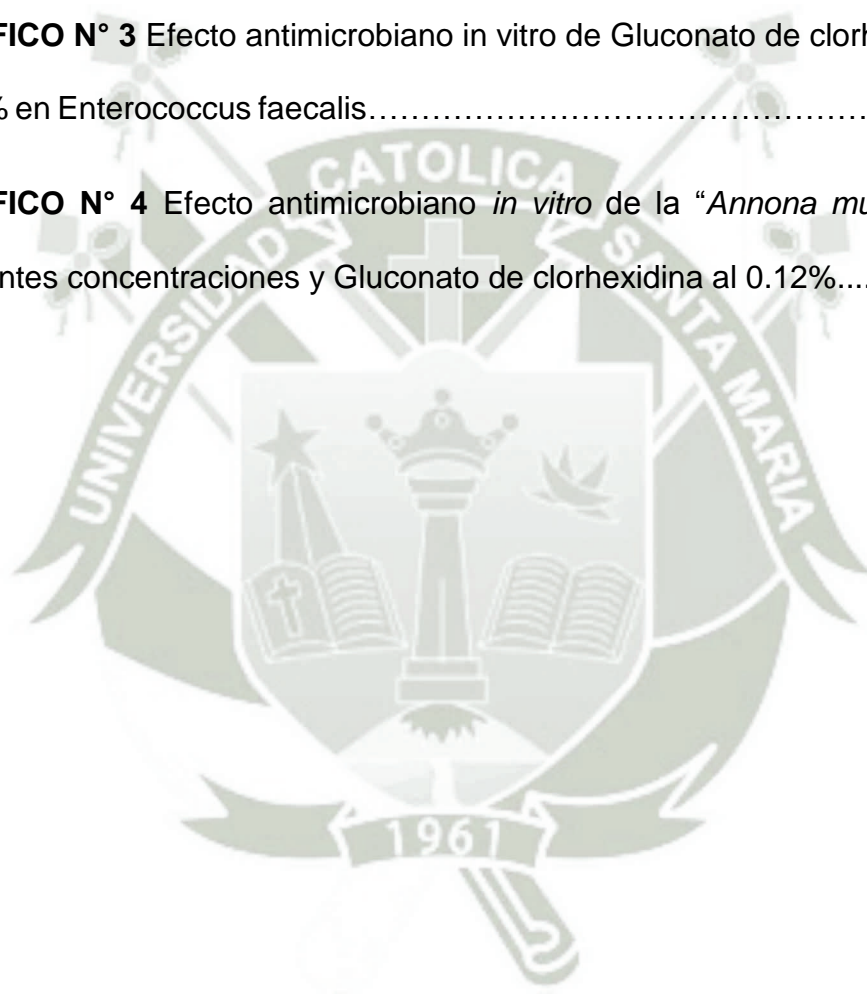


INDICE DE TABLAS

TABLA N° 1 Efecto antimicrobiano in vitro de la “ <i>Annona muricata</i> ” al 50% en <i>Enterococcus faecalis</i>	56
TABLA N° 2 Efecto antimicrobiano in vitro de la “ <i>Annona muricata</i> ” al 75% en <i>Enterococcus faecalis</i>	58
TABLA N° 3 Efecto antimicrobiano in vitro de Gluconato de clorhexidina al 0.12% en <i>Enterococcus faecalis</i>	60
TABLA N° 4 Efecto antimicrobiano <i>in vitro</i> de la “ <i>Annona muricata</i> ” en diferentes concentraciones y Gluconato de clorhexidina al 0.12%.....	62
TABLA N° 5 Análisis de la prueba T Student de gluconato de clorhexidina al 0.12% y <i>Annona muricata</i> al 75%.....	64

INDICE DE GRAFICOS

GRAFICO N° 1 Efecto antimicrobiano in vitro de la “ <i>Annona muricata</i> ” al 50% en <i>Enterococcus faecalis</i>	57
GRAFICO N° 2 Efecto antimicrobiano in vitro de la “ <i>Annona muricata</i> ” al 75% en <i>Enterococcus faecalis</i>	59
GRAFICO N° 3 Efecto antimicrobiano in vitro de Gluconato de clorhexidina al 0.12% en <i>Enterococcus faecalis</i>	61
GRAFICO N° 4 Efecto antimicrobiano <i>in vitro</i> de la “ <i>Annona muricata</i> ” en diferentes concentraciones y Gluconato de clorhexidina al 0.12%.....	63



RESUMEN

Varios países como el Perú han utilizado los extractos de la *Annona muricata* para tratamientos diversas enfermedades, sus propiedades curativas y los resultados en el cáncer ha llevado al autor de este estudio investigar el efecto del extracto de *Annona muricata* en la microbiota oral, en particular sobre el *E. faecalis*.

En base a estas informaciones las hojas de estas plantas se usaron como un extracto en concentraciones variables como un agente antibacteriano contra los *E. faecalis*.

El objetivo fue determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* de la “*Annona muricata*” en concentraciones de 25%, 50% y 75% frente *Enterococcus faecalis* de conductos radiculares infectados en niños.

Materiales y métodos: se aislaron e identificaron las colonias de *E. faecalis* posteriormente se prepararon extractos acuosos de hojas de *Annona muricata* con concentraciones del 25%, 50 y 75%. La eficacia antimicrobiana se evaluó mediante el método de difusión de disco contra *Enterococcus faecalis*

Teniendo como resultado de máxima inhibición a las 48 horas. Que las concentraciones de 25% fueron negativas para la inhibición, sin embargo, para las muestras de 50% el diámetro alcanzado es de 7.625mm como promedio de inhibición y para 75% el diámetro alcanzado es de 10.875mm como promedio de inhibición. Difiere con los resultados de nuestra muestra control de G. de clorhexidina al 0.12% logrando alcanzar un diámetro de 16.25 como promedio.

observó en las pruebas *in vitro* que el extracto acuoso de la *Annona muricata* al 75% funciona para inhibir *E. Faecalis* es decir que la bacteria objetivo es susceptible en esa concentración del extracto acuoso.

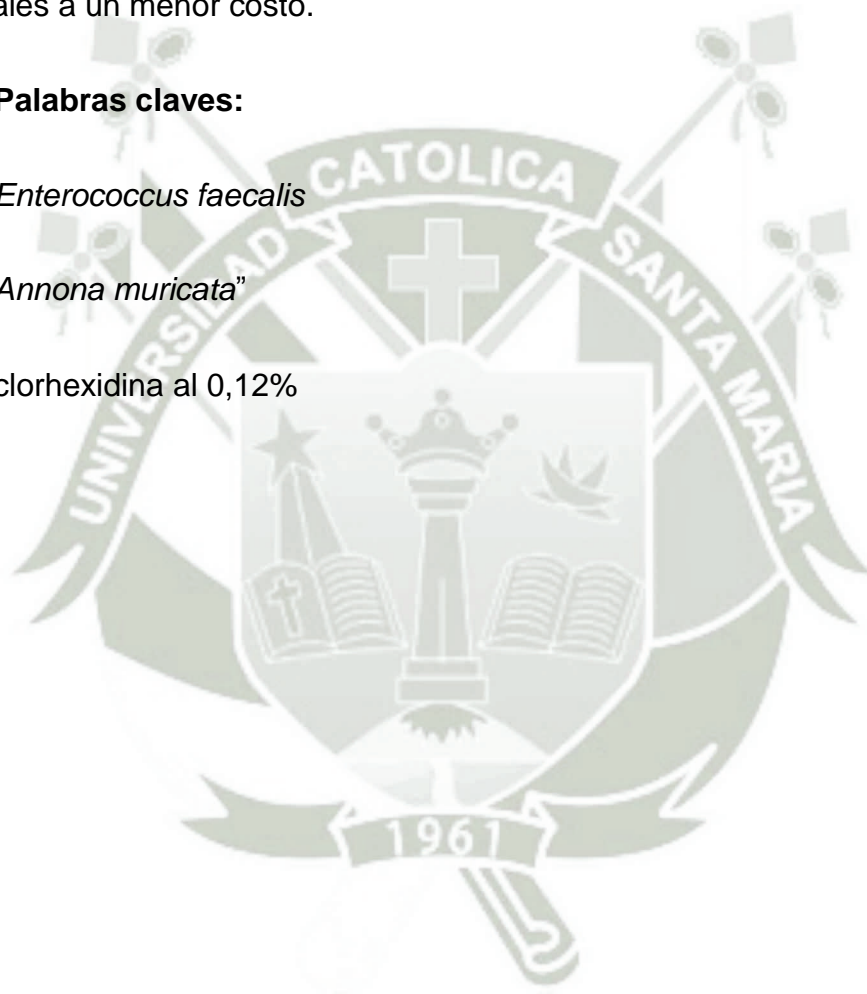
En conclusión cabe destacar que la eficacia del G. clorhexidina al 0,12% es superior a la del extracto acuso, sin embargo, se puede minimizar el riesgo de contraer enfermedades bucales mediante la inhibición bacteria con extractos naturales a un menor costo.

Palabras claves:

Enterococcus faecalis

Annona muricata

clorhexidina al 0,12%



ABSTRACT

Several countries such as Peru have used the extracts of *Annona muricata* for various diseases, their healing properties and the results in cancer. The author of this study has investigated the effect of *Annona muricata* extract on the oral microbiota, in particular on the *E. faecalis*.

Based on this information, the leaves of these plants were used as an extract in variable concentrations as an antibacterial agent against *E. faecalis*.

The objective was to determine the *in vitro* antimicrobial effect of "*Annona muricata*" in concentrations of 25%, 50% and 75% against *Enterococcus faecalis* of infected root canals in children.

Materials and methods: colonies of *E. faecalis* were isolated and identified. Aqueous extracts of *Annona muricata* leaves were prepared at concentrations of 25%, 50 and 75%. The antimicrobial efficacy was evaluated by the disc diffusion method against *Enterococcus faecalis*

Having as a result of maximum inhibition at 48 hours. That the concentrations of 25% were negative for the inhibition, however, for the samples of 50% the reached diameter is of 7.625mm as average of inhibition and for 75% the reached diameter is of 10.875mm as average of inhibition. It differs with the results of our control sample of G. of chlorhexidine at 0.12%, achieving a diameter of 16.25 on average.

observed in the *in vitro* tests that the aqueous extract of the *Annona muricata* 75% works to inhibit *E. Faecalis* that is to say that the target bacterium is susceptible in that concentration of the aqueous extract.

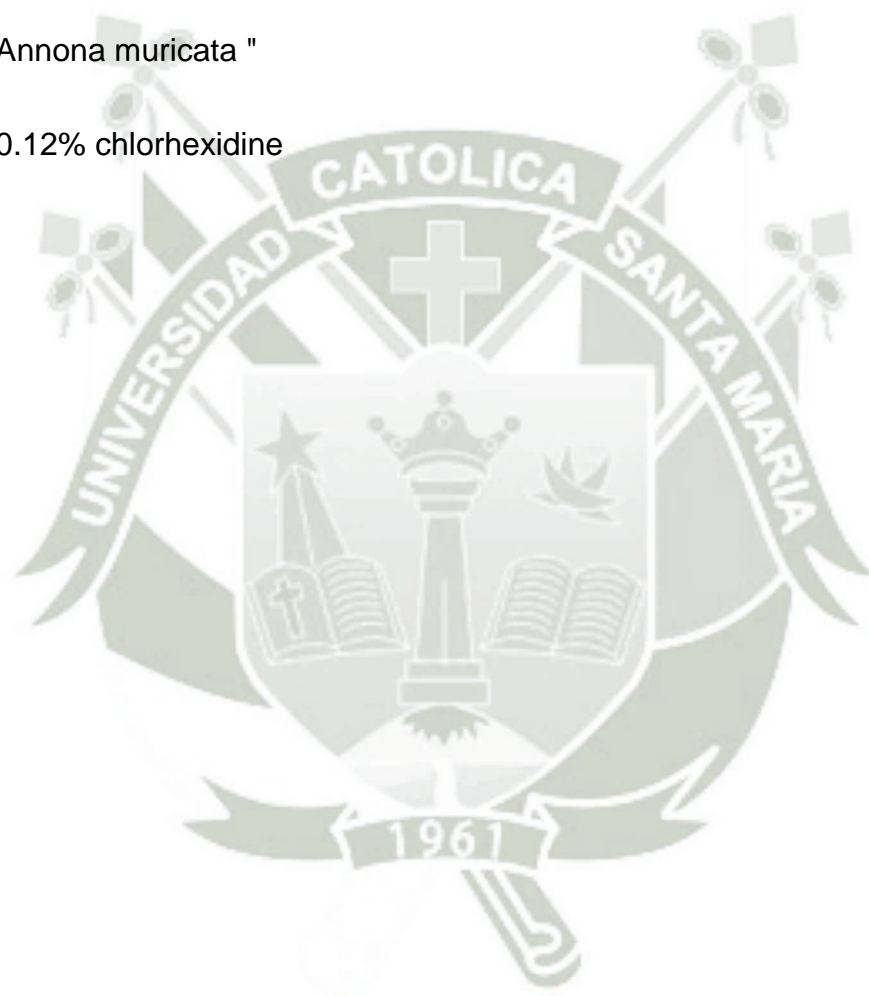
In conclusion it should be noted that the effectiveness of G. chlorhexidine at 0.12% is higher than that of the extract accus, however, the risk of contracting oral diseases can be minimized by inhibiting bacteria with natural extracts at a lower cost.

Keywords:

Enterococcus faecalis

Annona muricata "

0.12% chlorhexidine





CAPITULO I

PLANTEAMIENTO TEORICO

PROBLEMA DE INVESTIGACION

1.1 DETERMINACION DEL PROBLEMA

La caries dental es uno de los problemas de salud más habituales en los niños, que si no detenemos a tiempo esta avanzará de forma implacable desde la destrucción del esmalte hasta llegar al nervio que conlleva la aparición de una serie de síntomas, y consecuentemente necrosis pulpar, siendo propenso a infección odontogena causada por múltiples bacterias, que en ocasiones pone en riesgo la salud general del niño.

E. faecalis es una de las bacterias principales causantes de la infección dental, incluida su capacidad para competir con otros microorganismos, invadir los túbulos dentinales y resistir nutricionalmente y para su eliminación durante el tratamiento de conducto es de interés un desarrollo continuo de nuevos productos irrigantes de conductos.

Debido a que la *Annona muricata* en los últimos años ha sido centro de atención por sus propiedades anticancerígenas y antimicrobianas, es preciso determinar por técnicas *in vitro* la relevancia de los extractos de hojas de esta especie frente a uno de los mayores microorganismos presentes en los conductos radiculares infectados como es *E. faecalis*,

1.2 ENUNCIADO

Efecto antimicrobiano *in vitro* de la “*Annona muricata*” en *Enterococcus faecalis* de conductos radiculares infectados en niños de la ciudad de Arequipa, 2017.

1.3 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

a. Área del conocimiento.

- **Área General:** Ciencias Naturales
- **Área Específica:** Odontología
- **Especialidad:** Odontopediatría
- **Línea:** Microbiología

b. Análisis u operacionalización de variables.

VARIABLES	INDICADORES	SUBINDICADORES
V. Estimulo <i>A. Muricata</i>	Concentraciones	<ul style="list-style-type: none"> • AI 25% • AI 50% • AI 75%
V. Respuesta <i>Enterococcus faecalis</i>	Medición del halo inhibitorio	<ul style="list-style-type: none"> • Suceptible: > 11 mm • Intermedio: 5-10mm • Resistente hasta 4mm

c. Interrogantes básicas

c.1. ¿Cuál es efecto antimicrobiano *in vitro* de la “*Annona muricata*” al 25% en *Enterococcus faecalis* de conductos radiculares infectados en niños de la ciudad de Arequipa, 2017?

c.2. ¿Cuál es efecto antimicrobiano *in vitro* de la “*Annona muricata*” al 50% en *Enterococcus faecalis* de conductos radiculares infectados en niños de la ciudad de Arequipa, 2017?

c.3. ¿Cuál es efecto antimicrobiano *in vitro* de la “*Annona muricata*” al 75% en *Enterococcus faecalis* de conductos radiculares infectados en niños de la ciudad de Arequipa, 2017?

c.4 ¿Cuál es la diferencia del efecto antimicrobiano *in vitro* de la “*Annona muricata*” a diferentes concentraciones en *Enterococcus faecalis* de conductos radiculares infectados en niños de la ciudad de Arequipa, 2017?

d. Taxonomía de la investigación

ABORDAJE	TIPO DE ESTUDIO							
	POR LA TÉCNICA DE RECOLECCION	POR EL TIPO DE DATO	NUMERO DE MEDICIONES DE VARIABLE	NUMERO DE MUESTRA	POR EL AMBITO DE RECOLECCION	DISEÑO	NIVEL	
Cuantitativo	Laboratorio Campo	Prospectivo	Longitudinal	Comparativo	Observacional	Cuasi Experimental	Explicativo	

1.4 JUSTIFICACION

a. Relevancia Social

Este trabajo de investigación se basa en la aplicación de una solución desinfectante de origen natural que sea eficaz como irrigante en tratamientos de conductos radiculares infectados con *Enterococcus faecales*. Ya que siendo su componente principal extractos biodegradables, a base de unos compuestos orgánicos obtenidos de hojas de Guanábana y de fácil accesibilidad, este producto natural podría ser una alternativa natural beneficiara a una población más exigente como los niños.

b. Relevancia Científica

Ofrece un aporte esencial a la comunidad científica en áreas de odontología y microbiología, ofreciendo nuevas aplicaciones a un producto natural, a base de hojas de guanábana, que podría ser considerado como una nueva generación de desinfectantes orales, atacando principalmente al microorganismo más representativo en los conductos radiculares infectados como *E. faecalis*.

c. Viabilidad

Este trabajo es viable porque se trabajó en un laboratorio de microbiología del pabellón “H” de la universidad Católica de Santa María, a la par la investigadora contada con asesoría en microbiología y los recursos necesarios para todo el transcurso de la investigación.

2. OBJETIVOS

2.1. Determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* de la “*Annona muricata*” al 25% en *Enterococcus faecalis* de conductos radiculares infectados en niños de la ciudad de Arequipa, 2017.

2.2. Determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* de la “*Annona muricata*” al 50% en *Enterococcus faecalis* de conductos radiculares infectados en niños de la ciudad de Arequipa, 2017.

2.3. Determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* de la “*Annona muricata*” al 75% en *Enterococcus faecalis* de conductos radiculares infectados en niños de la ciudad de Arequipa, 2017.

2.4. Comparar el efecto antimicrobiano *in vitro* en diferentes concentraciones de la “*Annona muricata*” en *Enterococcus faecalis* de conductos radiculares infectados en niños de la ciudad de Arequipa, 2017.



3. MARCO TEÓRICO

3.1 Marco conceptual

A. *Annona muricata*

A.1. Taxonomía

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Magnoliales
Familia:	Annonaceae
Subfamilia:	Annonoideae
Género:	<i>Annona</i>
Especie:	<i>A. muricata</i>

A.2. Descripción botánica

La *Annona muricata* o más conocida como guanábana, graviola o sirsak, es un árbol tropical de hoja perenne de la familia de las *Annonaceae*, que produce frutos grandes de 0,9 a 1,0 kg de peso, presenta un dosel abierto, redondeado con hojas grandes, brillantes, de color verde oscuro, con cáscara espinosa y carne fibrosa amarga, que suele llevar más de cien semillas de 1-2 cm de longitud (figura 1). La *A. muricata* es nativa de las zonas tropicales más cálidas de América del Sur y Norteamérica y ahora está ampliamente distribuido en las partes tropicales y subtropicales del mundo, incluyendo Malasia y Nigeria ¹

¹ Adewole, S. O., & Caxton-Martins, E. A. (2006)

A.3. Usos en la medicina tradicional

Todas las partes del árbol de *A. muricata*, se utilizan ampliamente como medicamentos tradicionales contra una serie de enfermedades especialmente para el cáncer y las infecciones parasitarias. La fruta se utiliza como medicina natural para el dolor artrítico, la neuralgia, la artritis, la diarrea, la disentería, la fiebre, la malaria, los parásitos, el reumatismo, y también se come para elevar la leche materna después del parto.

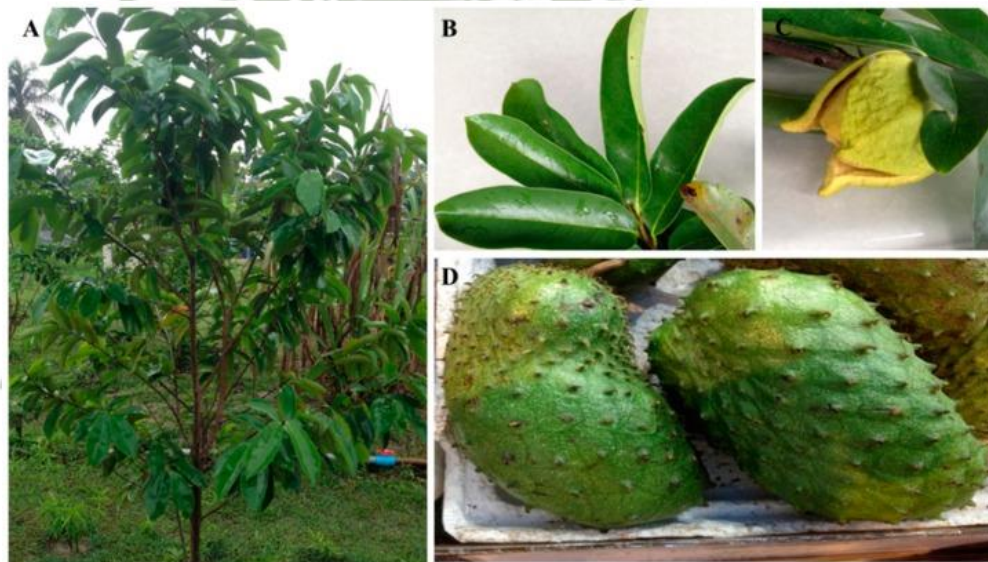


Figura N° 1: (A) En esta figura se aprecia el árbol de la *Annona muricata*; (B) hojas; (C) flores y (D) fruto.

Las hojas se emplean para tratar cistitis, diabetes, dolores de cabeza e insomnio. Por otra parte, la administración interna de la hoja de la decocción se cree que presentan efectos antirreumáticos, mientras que las hojas cocidas se utilizan tópicamente para tratar los abscesos

y el reumatismo^{2,3}. Se cree que las semillas trituradas tienen actividades antihelmínticas contra gusanos e parásitos externos e internos.

En África tropical, la planta se utiliza como un agente astringente, insecticida y para tratar la tos, el dolor y las enfermedades de la piel.

En la India, la fruta y la flor se emplean como remedios contra el catarro, mientras que la corteza de la raíz y las hojas se cree que tienen actividades antihelmínticas⁴. En Malasia, la mezcla de hojas machacadas de *A. muricata* se utiliza como jugo en la cabeza para proteger contra desmayos. En Sudamérica y África tropical, incluyendo Nigeria, las hojas de *A. muricata* se despliegan como una etnomedicina contra tumores y cáncer⁵.

Además, los efectos antiinflamatorios, hipoglucémicos, sedantes, relajantes musculares lisos, hipotensores y antiespasmódicos también se atribuyen a las hojas, cortezas y raíces de *A. muricata*. Además de los usos etnomedicinales, los frutos son ampliamente utilizados para la preparación de bebidas, dulces, helados, batidos y jarabes.^{6,7}

A.4. Composición química

² Mishra, S., Ahmad, S., Kumar, N., & Sharma, B. K. (2013).

³ De Sousa y Col. (2010).

⁴ Adewole, S., & Ojewole, J. (2009).

⁵ Ong, H. C., & Norzalina, J. (1999)

⁶ Jaramillo-Flores, M. E., & Hernandez-Sanchez, H. (2000).

⁷ Wu, F. E., Gu y col. (1995).

A.4.1. Fitoquímicos: Las extensas evaluaciones fitoquímicas en diferentes partes de la planta de *A. muricata* han demostrado la presencia de diversos fitoconstituyentes y compuestos, incluyendo alcaloides (ALC)⁸ megastigmanes (MGs)⁹, fenoles (FLs)¹⁰ ciclopéptidos (CP) y los aceites esenciales (Tabla 1)¹¹. Sin embargo, las especies de *Annona*, incluyendo *A. muricata*, se ha demostrado ser una fuente generalmente rica de compuestos de acetogeninas (AGE). La presencia de diferentes minerales como K, Ca, Na, Cu, Fe y Mg sugiere que el consumo regular de la fruta de *A. muricata* puede ayudar a proporcionar nutrientes esenciales y elementos al cuerpo humano.¹²

A.4.2. Acetogeninas: Los acetogeninas (AGEs) son una clase única de metabolitos secundarios C-35 C37 derivados de ácidos grasos de cadena larga (C-32/C34) en la ruta del policétido. Generalmente se caracterizan por una combinación de ácidos grasos con una unidad de 2-propanol en C-2 que forma una γ -lactona α , β -insaturada metil-sustituída¹³. Desde el descubrimiento de uvaricina de *Uvaria acuminata* en 1982, más de 500 AGEs han sido identificadas de diferentes partes de las plantas de la familia *Annonaceae*¹⁴.

⁸ Yang, C y col. (2015).

⁹ Matsushige, A y col. (2012).

¹⁰ Jiménez, V. M y col (2014)

¹¹ Kossouh, C y col (2007).

¹² Gyamfi, K y col. (2011).

¹³ Moghadamtousi, S. Z y col. (2015).

¹⁴ Alali, F. Q., Liu, X. X., & McLaughlin, J. L. (1999).

Debido a las estructuras especiales y a las actividades biológicas extensas, los AGEs han atraído el interés científico significativo en los últimos años. Varias actividades biológicas se han informado de AGE, incluyendo antipalúdico, antiparasitario y plaguicidas actividades¹⁵. Sin embargo, las actividades biológicas de AGEs se caracterizan principalmente por la toxicidad contra las células cancerosas y los efectos inhibitorios contra el complejo mitocondrial I (mitocondrial NADH: ubiquinona oxidorreductasa). Las investigaciones fitoquímicas y los estudios biológicos en diferentes partes de la planta de *A. muricata* resultaron en la identificación de una amplia gama de compuestos de AGE. Hasta el momento se han identificado alrededor de 100 acetogeninas.

Tabla 1: Composición fitoquímica de extractos de hojas en *A. muricata*

Fitoquímicos	<i>A. Muricata</i> (hojas)
Alcaloides	+
Polifenoles	+
Flavonoides	+
Antraquinonas	+
Taninos	+
Triterpenos	+
Esteroles	+
Saponinas	+

(+): presencia de fitoquímicos en extractos de metanol

Fuente: Dzotam y col. 2016.

¹⁵Zafra-Polo, M. C., Figadère, B., Gallardo, T., Tormo, J., & Cortes, D. (1998).

A.5 Actividad Biológica

A.5.1 Actividad antiartrítica: Un estudio *in vivo* en diferentes dosis (3, 10, 30 y 100 mg/kg) de extracto etanólico de hojas de *A. muricata* se han investigado para la actividad anti-artrítica en la artritis inducida con adyuvante completo de Freund (ACF) en ratas.

De acuerdo con los resultados, la administración oral del extracto redujo el edema de una manera dependiente de la dosis después de dos semanas de inyección. Debido a que el extracto a dosis más altas suprimió significativamente la expresión de TNF- α e IL-1 β en tejido local, la actividad anti-artrítica de las hojas de *A. muricata* contribuyó a la supresión de citocinas pro-inflamatorias. Por lo tanto, el potencial antiartrítico de *A. muricata* fue corroborado por los hallazgos de este estudio *in vivo*.¹⁶

A.5.2 Actividad anticancerígena: Muchos estudios informan de los efectos antiproliferativos significativos de diferentes extractos de la planta y aislados AGEs hacia diversas líneas celulares de cáncer; El extracto de hoja fue capaz de inducir la apoptosis en células de cáncer de colon y pulmón a través de la vía mediada por la mitocondria. Este efecto antiproliferativo se asoció con el ciclo celular de detención en la fase G1. Además, la migración e invasión de células de cáncer de colon fueron inhibidas significativamente por el extracto de hoja. Los estudios anticancerosos sobre *A. muricata* no sólo se limitaron a investigaciones *in vitro* e *in vivo*. Un estudio de caso de una mujer de 66 años de edad con un cáncer de mama metastásico informó que el consumo de las

¹⁶ Chan, P., Ah, R., & Mh, K. (2010).

hojas hervidas en agua dio lugar a la estabilización de la enfermedad. Estas substanciales actividades anticancerígenas y antitumorales mencionadas para las hojas de *A. muricata* dieron lugar a formulaciones en tabletas de la fracción soluble en acetato de etilo de las hojas, que contiene AGEs que pueden usarse como terapia adyuvante de cáncer.

A.5.3 Actividad anticonvulsiva: En los países africanos, la decocción de las hojas de *A. muricata* se utiliza tradicionalmente para controlar la fiebre y las convulsiones ¹⁷, investigaron el efecto del extracto etanólico de las hojas contra las convulsiones tónico-clónicas inducidas por pentilenotetrazol en ratones. El resultado mostró que el extracto de la planta a dosis de 100 y 300 mg/kg disminuyó significativamente la incidencia y la tasa de mortalidad de las convulsiones tónicas. La administración del extracto a los ratones también prolongó el inicio de las convulsiones clónicas. Este estudio mostró que una investigación subsiguiente guiada por bioensayo puede conducir al aislamiento de un compuesto bioactivo que se puede usar como un fármaco anticonvulsivo.

A.5.4 Actividad antioxidante: La generación inmoderada de especies de oxígeno reactivo (ROS) intracelular es un precursor del estrés oxidativo que posteriormente cataliza la deficiencia metabólica y la muerte celular a través de lesiones bioquímicas y fisiológicas. La identificación de antioxidantes a partir de productos naturales se ha

¹⁷ Okid, P. A. y col. (2013).

convertido en una cuestión de gran interés en estudios recientes por su notable papel en la anulación de los efectos destructivos de ROS^{18, 19}. Se encontró que la actividad antioxidante de las hojas de *A. muricata* era más fuerte que las especies *A. squamosa* y *A. reticulata*, como se muestra a través de diferentes modelos *in vitro*. Se dice que las semillas y hojas de la planta poseen antioxidantes enzimáticos, incluyendo catalasa y superóxido dismutasa, y antioxidantes no enzimáticos, incluyendo vitamina C y E. Padma y colaboradores demostraron que el extracto etanólico de la corteza del tallo de *A. muricata* provocó una reducción de la peroxidación lipídica inducida por el estrés de inmovilización en frío en el cerebro y el hígado de ratas, lo que indica el potencial adaptogénico de esta planta²⁰. Estos hallazgos sugieren fuertemente el uso potencial de *A. muricata* como una fuente natural de antioxidantes.

A.5.5 Actividad antiparasitaria: Las infecciones por protozoarios causan enfermedades debilitantes, como la leishmaniasis y la tripanosomiasis, que han afligido a una proporción notable de la población mundial. Como agente natural, *A. muricata* ha sido sometido a diversos parásitos patógenos para determinar sus efectos citotóxicos. El extracto de hoja en acetato de etilo de *A. muricata* se ensayó contra tres especies de *Leishmania* (PH8, M2903 y PP75) y *Trypanosoma cruzi*. La actividad prometedora se informó con IC50 valores inferiores a 25 µg/ml²¹. En otro estudio el extracto metanólico de las semillas de

¹⁸ Minari, J. B., & Okeke, U. (2014).

¹⁹ Eggadi, V. y col. (2014).

²⁰ N'gouemo, P., y col. (1997).

²¹ Liao, J. C., y col. (2012).

A. muricata mostró una actividad antiparasitaria significativa contra las larvas infecciosas de *Molinema temtae*, y esta actividad se contribuyó a sus acetogeninas aisladas ²².

A.5.6 Actividad antimicrobiana: En un estudio para determinar la eficacia antimicrobiana del extracto de hojas de *A. muricata* sobre patógenos orales, se observó que fueron eficaces para todos los organismos de prueba (*S. mutans*, *S. mitis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *candida albicans*) demostrando así que hasta cierto punto que el extracto de Guanábana cuando se usa contra la microbiota oral tiene suficiente propiedad antimicrobiana y fungicida ²³. En Brasil un grupo de investigadores evaluaron las actividades antibacterianas *in vitro* de los extractos en metanol de cinco plantas comestibles como *Colocasia esculenta*, *Triumfetta pentandra*, *Hibiscus esculentus*, *Canarium schweinfurthii* y *Annona muricata* contra un panel de 19 cepas bacterianas Gram negativas multirresistentes donde los resultados mostraron que el extracto de *Canarium schweinfurthii* mostró la mejor actividad con valores de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) oscilaron entre 64 y 1024 µg/l frente al 89,5% de las 19 cepas de bacterias ensayadas.

Los valores de CIM inferiores o iguales a 1024 µg/ml también se registraron con extractos de *Triumfetta pentandra*, *Annona muricata*, *Colocasia esculenta* y *Hibiscus esculentus* respectivamente contra 15/19 (78,9%), 11/19 (57,9%), 10/19 (52,6%) Y 10/19 (52,6%) de

²² Hamid, R. A., Foong, C. P., Ahmad, Z., & Hussain, M. K. (2012).

²³ Pai, B. M., Rajesh, G., Shenoy, R., & Rao, A. (2016).

bacterias ensayadas.²⁴

B. Conductos radiculares

La preservación de los dientes por la terapia endodóntica ha ganado mucha popularidad debido a la tasa de éxito aumentada y predecible de los procedimientos endodónticos, la razón de esto es la comprensión completa de la patología endodóntica y nuestra capacidad para combatir la misma. Esencialmente, la infección endodóntica es la infección del sistema de conducto radicular dental y el principal agente etiológico de la periodontitis apical (Figura 2)²⁵. Aunque diversos factores químicos y físicos pueden inducir inflamación perirradicular, la evidencia científica indica claramente que los microorganismos son esenciales para la progresión y perpetuación de diferentes formas de periodontitis apical²⁶. La justificación para el tratamiento endodóntico es erradicar la infección, para evitar que los microorganismos infecten o vuelvan a infectar la raíz y/o los tejidos perirradiculares (Tabla N°2). Así, una comprensión profunda de la microbiota endodóntica asociada con diferentes formas de enfermedad es la base para el éxito del tratamiento endodóntico.

B.1 Vías de infección microbiológica:

La presencia de la microbiota es un factor importante en la infección endodóntica, hay tantas maneras por las que los microorganismos

²⁴ Dzatam, J. K., Touani, F. K., & Kuete, V. (2016).

²⁵ Parirokh, M., Sadr, S., Nakhaee, N., Abbott, P. V., & Manochehrifar, H. (2014).

²⁶ Carvalho, C. N. y col. (2017).

llegan a la pulpa y es de suma importancia saber la planificación del tratamiento. Las diversas vías por las que los microorganismos alcanzan la pulpa son las siguientes: ²⁷

Tabla N°2: Microorganismos de importancia endodóntica

Anaerobios		Facultativos-Aerotolerantes- Microaerófilos	
Cocos Gram +	<i>Peptostreptococcus</i>	Cocos Gram -	<i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i>
Bacilos Gram +	<i>Actinomyces</i> <i>Eubacterium</i> <i>Propionibacterium</i>	Bacilos Gram +	<i>Actinomyces</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Corynebacterium</i>
Cocos Gram -	<i>Veillonella</i>	Cocos Gram -	<i>Neisseria</i>
Bacilos Gram -	<i>Porphyromonas</i> <i>Prevotella</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Selenomanas</i>	Bacilos Gram -	<i>Capnocytophaga</i> <i>Eikenella</i> <i>Campylobacter</i>
Espiroqueta	<i>Treponema</i>	Levadura	<i>Candida</i>

i. **Tubos dentinarios:** Después de una lesión cariosa o durante procedimientos dentales, los microorganismos pueden utilizar el camino en una dirección centrípeta para alcanzar la pulpa. Las bacterias acceden a la pulpa cuando la distancia de la dentina entre el

²⁷ Pinkham J. R. y col (1996).

borde de la lesión cariada y la pulpa es de 0,2 mm.

ii. **Cavidad abierta:** La exposición directa a la pulpa de origen traumático, como en la fractura coronaria o de naturaleza iatrogénica por procedimientos operativos, rompe la barrera física impuesta por las estructuras dentales y la pulpa este en contacto con el ambiente oral séptico.

iii. **Membrana periodontal:** Los microorganismos del surco gingival pueden llegar a la cámara pulpar a través de la membrana periodontal, utilizando un canal lateral o el foramen apical como vía. Esta vía se hace disponible para los microorganismos durante una profilaxis dental, debido a la luxación dental, y más significativamente, como resultado de la migración de la inserción epitelial al establecimiento de bolsas periodontales.

iv. **Flujo sanguíneo:** Una bacteriemia transitoria puede ocurrir por cualquier número de razones durante el día normal de un individuo sano. Las bacterias presentes en la sangre serían atraídas a la pulpa dental después de un traumatismo o procedimiento quirúrgico que producía inflamación sin causar exposición a la pulpa. Esta atracción a través de la sangre o la linfa se conoce como anacoresis, que sirve como un camino para la infección endodóntica.

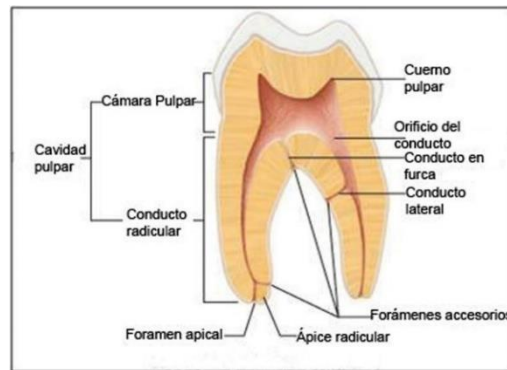


Figura N°2. Partes del diente: Se puede observar los conductos radiculares ²⁵

v. **Restauración defectuosa:** Los estudios han demostrado que la contaminación salivar desde el aspecto oclusal puede alcanzar el área periapical en menos de 6 semanas en canales obturados con sellador. Si el sello temporal se rompe o si la estructura del diente se fractura antes de la restauración final, o si la restauración final es inadecuada, las bacterias pueden tener acceso al tejido periapical y resultar en la infección.

vi. **Extensión:** Los microorganismos pueden alcanzar los canales principales y/o laterales que migran de un diente infectado a una pulpa sana como consecuencia de la contigüidad de los tejidos, extendiendo así la infección a un diente adyacente.

B.2 Fisiopatología: La microbiota comensal humana puebla la superficie mucosa de la cavidad oral, el tracto gastrointestinal, el tracto urogenital y la superficie de la piel. Esta microbiota comensal, que ha co-evolucionado con su huésped, ha adquirido los medios de sobrevivir

y tolerar los mecanismos de defensa del huésped ²⁸. El balance se altera cuando los microorganismos por cambios en el medio ambiente, proliferan exageradamente, causando patología como la caries dental sin comprometer la supervivencia del huésped.

Patogenicidad se refiere a la capacidad de un organismo para causar enfermedad en otro organismo. Estos organismos son conocidos como patógenos que incluyen bacterias, hongos, virus, protozoos y parásitos. Estos patógenos son capaces de adherirse, colonizar, sobrevivir, propagarse, al mismo tiempo evadiendo mecanismos de defensa del huésped tales como neutrófilos, complemento y anticuerpos. Además, pueden causar la destrucción de tejidos directa o indirectamente ²⁹.

La mayoría de las infecciones bacterianas de los maxilares son de origen odontogéno las que se manifiestan de una forma diferente, desde los procesos inocuos bien delimitados hasta los progresivos y difusos que pueden desarrollar complicaciones que lleven al paciente a un estado crítico con peligro incluso para la vida.³⁰.

B.3 Microbiología de las infecciones del canal radicular

La microflora bacteriana del conducto radicular está inicialmente dominada por aeróbicos y anaerobios facultativos³¹. A medida que avanza la enfermedad, la ecología dentro del sistema de conductos radicales cambia. Tales cambios pueden estar relacionados con la tensión del oxígeno cuando los conductos radiculares se abren durante

²⁸ Gomes, B. P., & Pinheiro, E. T. (2017)

²⁹ Cardenas Jaramillo Dario. (2003).

³⁰ Levi Alfonso J., (2007).

³¹ Bezerra da Silva (2008).

el tratamiento, el uso de agentes de irrigación del conducto radicular y cambios en el pH del canal debido a diversos materiales introducidos en el conducto radicular. Esto da lugar a cambios fenotípicos impulsado por el cambio genético de la población ³². La infección endodóntica puede ser primaria o secundaria. En general, la infección primaria implica inflamación de la pulpa y la infección del conducto radicular después de la invasión por microbios o subproductos microbianos, resultando eventualmente en inflamación de los tejidos de soporte, es decir, periodontitis apical. La infección secundaria (o infección post-tratamiento) ocurre bien como reinfección (adquirida o emergente), infección remanente (persistente) o recurrente (re-desarrollada en los dientes después de aparente cicatrización) en dientes previamente tratados con conducto radicular ³³. En las infecciones endodónticas primarias resaltan múltiples microbios como: ³⁴ son predominantemente: *Bacteroides*; *Prophyromonas*; *Prevotella*; *Fusobacterium*; *Treponema*; *Peptostreptococcus*; *Eubacterium* y *Camphylobacter*. Se cree que la persistencia de los microorganismos en el sistema del conducto radicular después del tratamiento es la principal causa de fracaso del tratamiento.

Las proporciones de los microbios en las infecciones primarias podrían ser diferentes después del tratamiento del conducto radicular, así como un cambio en la propagación y cantidad de las especies. La flora microbiana que se encuentra en las infecciones secundarias, por lo

³² Zakaria, M. N y col, (2015).

³³ Mandlik, J., Shah, N., Sharma, A., & Desai, M. (2016).

³⁴ Lamont, R. J., Hajishengallis, G. N., & Jenkinson, H. F. (2014).

general, son capaces de sobrevivir condiciones severas, como un amplio rango de pH y condiciones limitadas de nutrientes. Hay un contraste definido en los fenotipos microbianos en las infecciones primarias en comparación con la infección secundaria, siendo esta última predominante por las bacterias Gram-positivas ³⁵. Los estudios han demostrado la prevalencia de ciertas especies en los dientes con infección post-tratamiento, tales como *Enterococcus*, *Streptococcus Lactobacillus*, *Actinomyces* y hongos (como *Candida*). En particular, una alta proporción de *Enterococcus fecalis* en los casos con periodontitis apical persistente se observaron en algunos estudios ³⁶. Las infecciones mixtas son más comunes que los aislados de un solo organismo. Además, la gran variedad de organismos que se encuentran en los canales radiculares puede estar parcialmente relacionada con los principales intereses y técnicas de cultivo de diferentes investigadores. Los aislamientos de la pulpa expuesta son similares a la flora oral en la que predominan los cocos Gram-positivos y aproximadamente el 25% de los aislamientos son anaerobios. Los organismos asociados a brotes (que son condiciones de emergencia caracterizadas por dolor y/o hinchazón) parecen compartir una composición similar a la de los conductos asintomáticos³⁷. Estos son generalmente cambios fenotípicos debido a cambios ecológicos. Organismos cultivados a partir de canales infectados elaborar una

³⁵ Siqueira, J. F., & Rôças, I. N. (2013).

³⁶ Pladisai, P., Ampornaramveth, R. S., & Chivatxaranukul, P. (2016).

³⁷ Olivi, G. y col. (2014).

variedad de enzimas invasivas, pero no está claro si se puede equiparar con la patogenicidad³⁸.

B.4 Resistencia a drogas: El uso a largo plazo de drogas conduce al desarrollo de resistencia entre los microorganismos debido a la alteración de la expresión génica y la transferencia de los genes de resistencia, por lo que el agente antimicrobiano resulta ser ineficaz³⁹. La matriz extracelular de sustancias poliméricas (EPS) en las células bacterianas actúa como una barrera, atrapando las enzimas extracelulares tales como β -lactamasa y por lo tanto inactiva antibióticos β -lactámicos. Debido al agotamiento de los nutrientes, las bacterias se ven forzadas a estar en un estado inactivo y por lo tanto protegidas de ser asesinadas fácilmente⁴⁰. Otro mecanismo responsable de la tolerancia antimicrobiana es la localización selectiva de nichos anaeróbicos en el interior de la comunidad de biofilm (biopelículas), ya que el oxígeno puede ser completamente agotado por las bacterias en la superficie del biofilm⁴¹.

a. Detección *Quorum*: Es un sistema de comunicación célula a célula bacteriana⁴². Mediante el uso de moléculas de señalización química, las bacterias son capaces de comunicarse entre sí. Por ejemplo, moléculas tales como el péptido estimulante de competencias (PEC) son

³⁸ Niazi, S. A., Al-Ali, W. M., Patel, S., Foschi, F., & Mannocci, F. (2015).

³⁹ Zaruba, M. y col (2016).

⁴⁰ Montagner, F. y col. (2014).

⁴¹ de Paz, L. E. C., Sedgley, C. M., & Kishen, A. (Eds.). (2015).

⁴² Neelakantan, P. y col. P. (2017).

importantes para coordinar la expresión génica. La detección de quórum permite a las bacterias monitorear el ambiente para otras bacterias y permitir la alteración de su comportamiento a escala poblacional. Los microorganismos funcionan de forma menos eficaz como individuos en comparación con los grupos coherentes⁴³. La agrupación de la actividad de un quórum de células puede mejorar la persistencia exitosa de las bacterias. La detección de quórum se sabe que está involucrada en la formación de biofilms y para hacer frente a las tensiones ambientales. Las características de una cepa específica de microbio determinan su capacidad para coexistir. Esta asociación se ha demostrado entre *E. fecalis*, *Streptococcus gordonii* y *Lactobacillus salivarius*³⁶. Una razón para esto podría ser la resistencia a la inanición diferencial de *E. fecalis* en biofilms mono-especies y multi-especies, dependiendo de qué microorganismo estén asociados. La producción de proteasa en ambientes de biofilm parece tener una influencia en la capacidad de coexistencia entre las bacterias, ya que está relacionado con la virulencia de las bacterias. También se han implicado genes sensores de quórum específicos en la capacidad de formación de biofilm de *E. fecalis* (por ejemplo, S-ribosilhomocisteina liasa [luxS]).⁴⁴

C. Características de la *Enterococcus faecalis*

Son cocos Gram positivos de acuerdo con su respuesta al procedimiento de tinción de Gram. Christian Gram, quien desarrollo el procedimiento de tinción, depende de la capacidad para retener un complejo de cristal

⁴³ Sundqvist, G. (1992).

⁴⁴ Mohmmed, S. A y col (2017).

violeta y yodo después de un lavado leve con alcohol y acetona. Así, las bacterias grampositivas aparecen como violetas bajo el microscopio. Los enterococcus faecalis pueden vivir individualmente, en parejas, o como cadenas cortas. Son anaerobios facultativos, que poseen la capacidad de crecer en presencia o ausencia de oxígeno⁴⁵. *Enterococcus* son especies que viven en grandes cantidades (10⁵ -10⁸ unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de heces) en el lumen intestinal humano y en la mayoría de las circunstancias no causan ningún daño a sus anfitriones. Son catalasa negativo, pero si se siembran en agar sangre son pseudocatalasa, es decir reaccionar débilmente al peróxido de hidrógeno. También están presentes en los tractos genitales femeninos humanos y en la cavidad oral en menor número⁴⁶. Catabolizan una variedad de fuentes de energía incluyendo carbohidratos, glicerol, lactato, malato, citrato, arginina, y muchos cetoácidos⁴⁷. Los enterococos sobreviven ambientes muy duros incluyendo el pH alcalino extremo (9.6) y las concentraciones salinas. Resisten sales biliares, detergentes, metales pesados, etanol, azida y desecación. Pueden crecer en el intervalo de 10 a 45 ° C y sobrevivir a una temperatura de 60 ° C durante 30 min. Actualmente hay 23 especies de *Enterococcus* y éstas se dividen en cinco grupos basándose en su interacción con manitol, sorbosa y arginina. *E. faecalis* pertenece al mismo grupo que *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. mundtii* y *E. gallinarum*.

⁴⁵ Geo F. Karen C y col. *Microbiología Médica* (2008).

⁴⁶ Kline, K. A., y col. (2009).

⁴⁷ Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G., & Tsakalidou, E. (2001).

Estas cinco especies forman ácido en caldo de manitol e hidrolizan arginina; Sin embargo, no forman ácido en caldo de sorbosa⁴⁸. Después de establecer que el coco gram-positivo es un miembro de uno de los cinco grupos en el género *Enterococcus* (Tabla 3)⁴⁹, varias pruebas convencionales se utilizan para identificar las especies específicas. En el grupo 2, *E. faecalis* puede ser identificado normalmente mediante pruebas adicionales con arabinosa, telurita y piruvato. *E. faecalis* es arabinosa negativa y con excepción de algunas variantes atípicas, es el único miembro del grupo que utiliza el piruvato y tolera la telurita. Más recientemente, se han desarrollado técnicas moleculares que tienen la capacidad de identificar con rapidez y precisión las especies de *Enterococcus*. Para fines taxonómicos se han utilizado técnicas que implican hibridación ADN-ADN, secuenciación de los genes 16S rRNA, análisis de proteínas de células completas (PCC) y cromatografía de ácidos grasos por gas líquido. La mayoría de estos métodos son basados en ácido nucleico que implican ensayos de amplificación por PCR que son seguidos por análisis electroforético de los productos de PCR, sondeo, secuenciación o ambos⁵⁰. Análisis aleatorio de ADN polimórfico amplificado (RAPD) y análisis de campo de pulso Electroforesis en gel (PFGE) son técnicas que se han utilizado para determinar variaciones en las secuencias de ADN y se han empleado en la determinación de varios subtipos de *E. faecalis*. De hecho, la Colección de Bacteriología de la ATCC (American Type Culture

⁴⁸ Torres, C., & Cercenado, E. (2010).

⁴⁹ Stuart, C. H., Schwartz, S. A., Beeson, T. J., & Owatz, C. B. (2006).

⁵⁰ Evaluation of detachment methods for the enumeration of *Bacteroides fragilis* in sediments via propidium monoazide quantitative PCR,

Collection) en la actualidad lista 69 aislamientos de *E. faecalis* que están disponibles comercialmente. Cada uno de estos aislados tiene un número ATCC y una designación diferente. El nivel de bioseguridad varía de 1 a 2 y las condiciones de crecimiento difieren entre los subtipos⁵¹

Tabla 3: Categorización de las especies de *Enterococcus* y dos Cocos gram-positivos fisiológicamente relacionados basados en características fenotípicas

Grupo	Especies
Grupo I (+) Formación de ácido en caldo de manitol (+) Formación de ácido en caldo de sorbosa (-) Arginina hidrólisis	<i>E. avium</i> <i>E. gilvus</i> <i>E. malodoratus</i> <i>E. pallens</i> <i>E. raffinosus</i> <i>E. saccharorolyticus</i>
Grupo II (+) Formación de ácido en caldo de manitol (-) Formación de ácido en caldo de sorbosa (+) Arginina hidrólisis	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. mundtii</i> <i>Lactococcus sp.</i>
Grupo III (-) Formación de ácido en caldo de manitol (-) Formación de ácido en caldo de sorbosa (+) Arginina hidrólisis	<i>E. dispar</i> <i>E. durans</i> <i>E. hirae</i> <i>E. porcinus</i>

⁵¹ Sung, K., y col.(2015)

	<i>E. ratti</i>
Grupo IV	<i>E. asini</i>
(-) Formación de ácido en caldo de manitol	<i>E. cecorum</i>
(-) Formación de ácido en caldo de sorbosa	<i>E. sulfureus</i>
(-) Arginina hidrólisis	
Grupo V	<i>E. columbae</i>
(+) Formación de ácido en caldo de manitol	<i>Vagococcus sp.</i>
(-) Formación de ácido en caldo de sorbosa	
(-) Arginina hidrólisis	

La atención se ha dirigido hacia los enterococos desde la década de 1970, cuando fueron reconocidos como patógenos nosocomiales importantes que causan bacteriemia, endocarditis, meningitis bacteriana, tracto urinario y otras infecciones. Las fuentes de las bacterias en estas infecciones han sido reportadas como provenientes de las manos de los trabajadores de la salud, desde los instrumentos clínicos o de un paciente a otro. Estudios han demostrado que las infecciones nosocomiales no son causadas por la propia flora prehospitalaria del paciente⁵². Las infecciones enterocócicas ahora representan aproximadamente el 12% de las infecciones nosocomiales en los Estados Unidos, siendo la mayoría causadas por *E. faecalis* (más del 80%) y *E. faecium* responsables de la

⁵² Kalina, A. P. (1970).

mayoría de las infecciones restantes⁵³. Estudios muestran que *E. faecalis* es capaz de trasladarse desde el sistema de conductos hasta los ganglios linfáticos submandibulares de ratones libres de gérmenes, lo que sugiere que esta vía de infección puede jugar un papel en la patogénesis de las infecciones oportunistas en los pacientes. Las infecciones enterocócicas del tracto urinario y de los tejidos blandos se tratan generalmente con un solo fármaco, a menudo con penicilina o vancomicina⁵⁴. Hay evidencia emergente de resistencia a la vancomicina entre especies de *Enterococcus* y uso rutinario de recomendaciones previamente estándar para el tratamiento de enterococos ya no se puede esperar que las infecciones proporcionen resultados óptimos. Las cepas enterocócicas, en particular aquellas que causan endocarditis, deben ser seleccionadas para definir los patrones de resistencia a los antimicrobianos.⁵⁵

C.1 Prevalencia en las infecciones secundarias del canal radicular

E. faecalis es un habitante normal de la cavidad oral. La prevalencia de *E. faecalis* se incrementa en las muestras de enjuague oral de los pacientes que reciben tratamiento endodóntico inicial, los que se encuentran a mitad del tratamiento y los pacientes que reciben retratamiento endodóntico en comparación con aquellos sin historia endodóntica⁵⁶.

E. faecalis se asocia con diferentes formas de enfermedad perirradicular, incluyendo infecciones endodónticas primarias e infecciones persistentes.

⁵³ Edmond, M. B., y col.. (1999).

⁵⁴ KAFIL, H. S., & ASGHARZADEH, M. (2014).

⁵⁵ KAFIL, H. S., & ASGHARZADEH, M. (2014).

⁵⁶ Love, R. M. (2001).

En la categoría de infecciones endodónticas primarias, *E. faecalis* se asocia con lesiones perirradiculares crónicas asintomáticas significativamente más a menudo que con periodontitis perirradicular aguda o abscesos perirradiculares agudos. *E. faecalis* se encuentra en 4 a 40% de las infecciones endodónticas primarias. Se ha demostrado que la frecuencia de *E. faecalis* encontrada en las lesiones perirradiculares persistentes es mucho mayor. De hecho, los casos fallidos de tratamiento de conducto radicular tienen nueve veces más probabilidades de contener *E. faecalis* que las infecciones endodónticas primarias⁵⁷. Los estudios que investigan su ocurrencia en los dientes radiculares con lesiones perirradiculares han demostrado una prevalencia que oscila entre el 24 y el 77%. El amplio rango de prevalencia de *E. faecalis* entre los estudios pueden atribuirse a diferentes técnicas de identificación, diferencias geográficas o tamaño de la muestra. En algunos casos, *E. faecalis* se ha encontrado como el único organismo (cultivo puro) presente en los dientes de raíz con lesiones perirradiculares⁵⁸. La mayoría de estos estudios se han realizado utilizando técnicas de cultivo.

C.2 Factores de supervivencia: *E. faecalis* posee ciertos factores de virulencia incluyendo enzimas líticas, citolisina, sustancia de agregación, feromonas y ácido lipoteicoico. Se ha demostrado que se adhieren a las células huésped, expresan proteínas que le permiten competir con otras células bacterianas, y alterar las respuestas del huésped. *E. faecalis* es capaz de suprimir la acción de los linfocitos, contribuyendo

⁵⁷ Du, T., Wang, Z., Shen, Y., Ma, J., Cao, Y., & Haapasalo, M. (2014)

⁵⁸ Barbosa-Ribeiro, M., De-Jesus-Soares (2016).

potencialmente a la falla endodóntica. *E. faecalis* no se limita a su posesión de varios factores de virulencia. También es capaz de compartir estos rasgos de virulencia entre las especies, lo que contribuye a su supervivencia y la capacidad de causar enfermedades⁵⁹.

Estos factores pueden contribuir o no a las características innatas de *E. faecalis* para causar la enfermedad. Debido a que *E. faecalis* es menos dependiente de los factores de virulencia, se basa más en su capacidad para sobrevivir y persistir como un patógeno en los canales radiculares de los dientes. *E. faecalis* supera los retos de la supervivencia dentro del sistema de conductos radiculares de varias maneras. Se ha demostrado que exhiben amplios polimorfismos genéticos. Posee serina proteasa, gelatinasa y proteína de unión al colágeno, que le ayudan a unirse a la dentina. Es lo suficientemente pequeño como para invadir y vivir adecuadamente dentro de los túbulos dentinarios. Tiene la capacidad de soportar periodos prolongados de hambre hasta que se disponga de un suministro nutricional adecuado. Una vez disponibles, las células hambrientas son capaces de recuperarse utilizando suero como fuente nutricional. El suero, que se origina en el hueso alveolar y el ligamento periodontal, también ayuda a que *E. faecalis* se una al colágeno tipo I. Se ha demostrado que *E. faecalis* en los túbulos dentinarios resiste los vendajes intracanales de hidróxido de calcio durante más de 10 días. *E. faecalis* es capaz de formar un biofilm que ayuda a resistir la destrucción al permitir que las bacterias se vuelvan 1000 veces más resistentes a la fagocitosis, anticuerpos y antimicrobianos. Se ha demostrado que el

⁵⁹ Alve., Zaia, A. A., Ferraz, C. C., Almeida, J. F., & Gomes, B. P. (2016).

hidróxido de calcio, un medicamento intracanal comúnmente utilizado, es ineficaz para matar a *E. faecalis* por sí solo, especialmente cuando no se mantiene un pH alto). Se han propuesto las siguientes razones para explicar por qué *E. faecalis* es capaz de sobrevivir al tratamiento intracanal con hidróxido de calcio: (a) *E. faecalis* mantiene pasivamente la homeostasis del pH. Esto ocurre como resultado de los iones que penetran la membrana celular, así como la capacidad de amortiguación del citoplasma. (b) *E. faecalis* tiene una bomba de protones que proporciona un medio adicional para mantener el pH de la homeostasis, esto se logra mediante el "bombeo" de protones en la célula para reducir el pH interno. (c) a un pH de 11.5 o mayor, *E. faecalis* es incapaz de sobrevivir⁶⁰.

Sin embargo, como resultado de la capacidad de amortiguamiento de la dentina, es muy improbable que un pH de 11,5 pueda mantenerse en los túbulos dentinarios con las técnicas actuales de utilización de hidróxido de calcio. Los estudios realizados con el modelo de dentina en polvo han demostrado que la presencia de dentina tiene un efecto inhibitorio sobre diversas concentraciones de medicamentos en canales radiculares, incluyendo hidróxido de calcio, hipoclorito de sodio, clorhexidina y yoduro de potasio. Diversos componentes de la dentina, incluyendo la matriz dentinaria, el colágeno tipo I, la hidroxiapatita y el suero son responsables de alterar los efectos antibacterianos de estos medicamentos⁶¹. La Tabla 4 resume los factores de supervivencia y virulencia asociados con *E.*

⁶⁰ Weckwerth, P. H. y col. (2013).

⁶¹ Cristea, A. D. y col (2015).

faecalis.

TABLA 4. Factores de supervivencia y virulencia de *E. faecalis*

Factores de supervivencia y virulencia de <i>E. faecalis</i>
<ul style="list-style-type: none"> ● Sufre períodos prolongados de privación nutricional ● Se liga a la dentina y invade con competencia los túbulos dentinarios ● Altera las respuestas del host ● Suprime la acción de los linfocitos ● Posee enzimas líticas, citolisina, sustancia de agregación, Feromonas y ácido lipoteicoico ● Utiliza el suero como fuente nutricional ● Resiste los medicamentos intracanales (es decir, $\text{Ca}(\text{OH})_2$) <ul style="list-style-type: none"> ▪ Mantiene la homeostasis del Ph ▪ Producciones de la dentina disminuyen el efecto del hidróxido calcio ● Compite con otras células ● Forma un biofilm

C.3 Métodos de erradicación: Muchos estudios se han dirigido a encontrar una manera efectiva de erradicar y/o prevenir que *E. faecalis* tenga acceso al espacio del conducto radicular. *E. faecalis* puede entrar en el sistema del conducto radicular durante el tratamiento, entre las citas o incluso después de que el tratamiento se haya completado. El 3% del hipoclorito sodio de máxima

potencia, si se usa en cantidades adecuadas y se intercambia regularmente, tiene la capacidad de destruir *E. faecalis* en el conducto radicular ⁶². El hipoclorito de sodio es un irrigante eficaz para todas las presentaciones de *E. faecalis* incluyendo su existencia como biofilm. EDTA tiene poca actividad antibacteriana, pero es importante en su capacidad para eliminar la porción inorgánica de la capa de frotis permitiendo así que otros irrigantes tengan acceso a los túbulos dentinarios. Una solución de ácido cítrico al 10% eliminará la capa de frotis y, como EDTA, tiene poco efecto contra *E. faecalis*. Una solución de benzoato de sodio al 0,1% añadida al ácido cítrico al 10% aumentará las posibilidades de matar a *E. faecalis*. El hidróxido de calcio es relativamente ineficaz contra *E. faecalis* debido a las consideraciones mencionadas anteriormente. El yoduro de yodo y potasio puede ser un agente intracanal más eficaz que el hidróxido de calcio. La clorhexidina, en una concentración de gel o líquido de 2%, es eficaz para reducir o eliminar por completo *E. faecalis* del espacio del conducto radicular y de los túbulos dentinarios. Se puede utilizar un enjuague de 2 minutos de líquido de clorhexidina al 2% para eliminar *E. faecalis* de las capas superficiales de los túbulos dentinarios hasta 100 μ m. El 2% gel de clorhexidina es eficaz para eliminar por completo *E. faecalis* de los túbulos dentinarios por hasta 15 días⁶³. Esto se puede atribuir en parte a su actividad antimicrobiana sustancial. Es cuestionable si el 0,12% de clorhexidina es más eficaz que el hidróxido de calcio. Algunos estudios sugieren que es más eficaz, pero tampoco erradicaría completamente *E. faecalis*. Otro estudio sugiere que el 10% de hidróxido

⁶² Souza, M., y col. (2016).

⁶³ Rojas, C., & Rodrigo, L. (2016).

cálcico solo es más eficaz cuando se calienta a 46 ° C, tanto la clorhexidina al 0,12% como el hidróxido de calcio al 10% tienen mayores efectos antimicrobianos contra *E. faecalis* que a la temperatura corporal normal ⁶⁴. Otro irrigante que pueden ser eficaces para eliminar *E. faecalis* incluyen agua ozonizada. Se ha demostrado que el agua ozonizada tiene la misma eficacia antimicrobiana que el hipoclorito de sodio al 2,5%. También se han estudiado combinaciones de irrigantes para eliminar *E. faecalis*. en un estudio, una combinación de hidróxido de calcio mezclado con alcanfor eliminó completamente *E. faecalis* dentro de los túbulos dentinarios. Metapex, una pasta de hidróxido de calcio a base de aceite de silicona que contiene yodoformo al 38%, en los túbulos dentinarios más efectivamente desinfectados infectados con *E. faecalis* que el hidróxido de calcio solo⁶⁵. Las concentraciones de 1 a 2% de clorhexidina combinadas con hidróxido de calcio también han demostrado eficacia al matar *E. faecalis*. La clorhexidina combinada con hidróxido de calcio resultará en una mayor capacidad de matar *E. faecalis* que el hidróxido de calcio mezclado con agua⁶⁶. El gel de clorhexidina al 2% combinado con hidróxido de calcio alcanza un pH de 12,8 y puede eliminar completamente *E. faecalis* dentro de los túbulos dentinarios. Sin embargo, es importante señalar que la clorhexidina sola ha demostrado proporcionar una acción antimicrobiana tan buena o incluso mejor contra *E. faecalis* que las combinaciones de hidróxido de calcio/clorhexidina ⁶⁷.

⁶⁴ Pupo Marrugo, S., col. (2014).

⁶⁵ Cwikla, S. J. y col.(2005).

⁶⁶ Bozza, F. L y col.(2005).

⁶⁷ Valera, M. C. y col. (2016)

D. Ensayos in vitro

D.1 Método de difusión: La difusión del disco es uno de los métodos más antiguos de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana (PSA) y sigue siendo uno de los métodos PSA más utilizados en los laboratorios de microbiología clínica de rutina. El método es versátil ya que es adecuado para probar la mayoría de los patógenos bacterianos, incluyendo las bacterias más exigentes, casi todos los agentes antimicrobianos pueden ser probados y no requiere equipo especial. Cuando se realiza de acuerdo con las recomendaciones, la difusión del disco es un método reproducible y preciso para PSA⁶⁸.

Varios de los comités nacionales europeos de puntos de interrupción antimicrobianos, entre ellos BSAC en el Reino Unido⁶⁹, CA-SFM en Francia⁷⁰, DIN en Alemania⁷¹ y SRGA en Suecia⁷², desarrollaron sus propios métodos de difusión de disco para PSA, pero no hubo un método común calibrado a los puntos de interrupción europeos. Tras la armonización de los puntos de interrupción europeos de la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) por el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (EUCAST), inició el desarrollo de un método estandarizado de difusión en disco calibrado a los puntos de interrupción CIM armonizados. Al igual que la mayoría de las técnicas de difusión en disco, el método EUCAST se basa en los principios definidos en el informe del Estudio internacional de colaboración

⁶⁸ Cowan, M. M. (1999)

⁶⁹ Andrews, J. M. (2008).

⁷⁰ SFM Antibiogram Committee. (2003).

⁷¹ Kümmerer, K., Al-Ahmad, A., & Mersch-Sundermann, V. (2000).

⁷² Olsson-Liljequist, B., y col. (1997).

sobre las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos ⁷³ y en la experiencia de grupos de expertos de todo el mundo. Se puede encontrar la descripción de la metodología de difusión en disco de EUCAST es un resumen de la metodología detallada en un manual en el sitio web de EUCAST.

3.2 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Tema: “Eficacia antimicrobiana del extracto de hojas de guanábana (*Annona muricata*) sobre patógenos orales: un estudio *in vitro* -2016”

Autor: Pai, B. M., Rajesh, G., Shenoy, R., & Rao, A.

RESUMEN: Se evaluó la eficacia antimicrobiana de la extirpación de hojas de guanábana (*Annona muricata*) en *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Candida albicans* usando el método de difusión en disco. Se observó que todas las concentraciones de extractos fueron efectivas en la microbiota excepto para *P. intermedia*. El extracto de Guanábana era efectivo en especie de *Cándida*, con todas las concentraciones que exhibían la propiedad bactericida y fungicida. Los extractos a diferentes concentraciones fueron eficaces cuando se compararon con los controles estándar de oro y el efecto fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$).

⁷³ Kahlmeter, G., y col. (2003).

Tema: “Actividad antibacteriana del extracto foliar de *Annona muricata* y *Simarouba glauca* en *Enterococcus faecalis*.”

Autor: Mathew, J., George, R., Theruvil, R., Padavil, T. C., Tomy, L., & Kurian, A.

RESUMEN: Se determinó el efecto antimicrobiano de los extractos acuosos de hojas de *Annona muricata* y *Simarouba glauca* sobre *Enterococcus faecalis* mediante el método de difusión en agar. colocaron aproximadamente 10 µl de cada extracto en placas de agar tripticasa y se incubaron durante la noche. Se utilizaron hipoclorito de sodio al 1% y agua destilada como controles positivos y negativos. El extracto foliar de *A. muricata* mostró una eficacia similar a la del hipoclorito de sodio. El éxito del tratamiento endodóntico depende de la desinfección completa de los canales radiculares. En este estudio se compararon los extractos foliares de *A. muricata* y *S. glauca* con el hipoclorito de sodio por su efectividad contra *E. faecalis*, el patógeno más común encontrado en los conductos radiculares.

4. HIPOTESIS

Dado que los extractos acuosos a diferentes concentraciones de las hojas de *Annona muricata* son compuestos orgánicos, y presentan antecedentes de ser un agente antimicrobiano:

Es probable que la *Annona muricata* actúe como bactericida en *Enterococcus faecalis* extraídos de muestras de conductos radiculares infectados.



CAPITULO II

PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

1.- TÉCNICA, INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACIÓN

1.1. TÉCNICA

a. Identificación de la técnica

Se realizó la medición del crecimiento bacteriano mediante la observación como se muestra en el siguiente cuadro.

b. Esquematización

Variable Investigativa	Técnica	Instrumento
Variable estímulo <ul style="list-style-type: none"> • Extracto acuoso de hojas de <i>Annona muricata</i> • Glucanato de clorhexidina 	Observación	Ficha de laboratorio
Variable respuesta <ul style="list-style-type: none"> • Sensibilidad del <i>Enterococcus faecalis</i> in vitro 	Observación Laboratorial y medición	

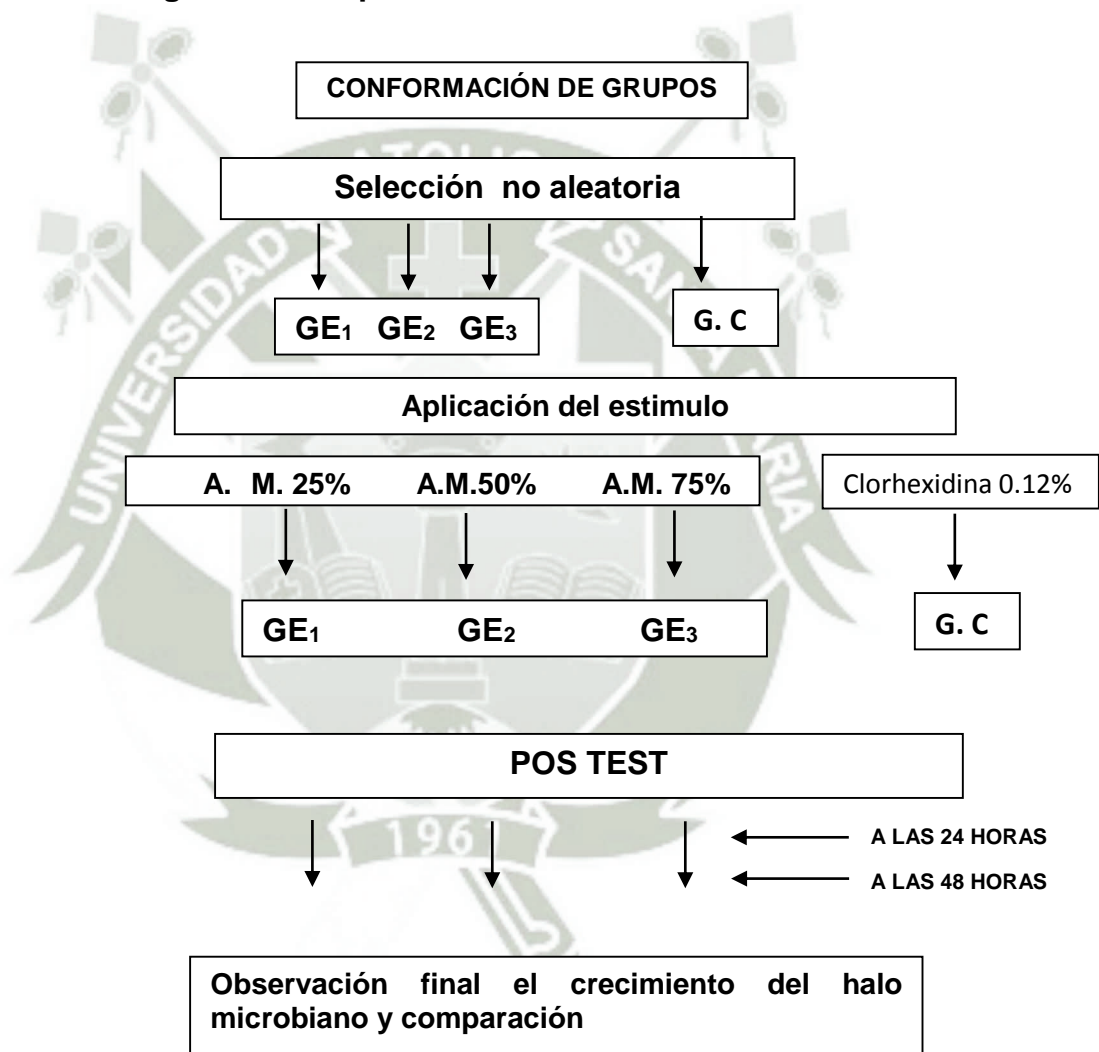
c. Diseño investigativo

c.1 Tipo: Ensayo laboratorial randomizado emparejado entre sujeto

c.2 Esquema básico

GE ₁	A.M. 25%	O ₂	O ₃
GE ₂	A.M. 50%	O ₂	O ₃
GE ₃	A.M. 75%	O ₂	O ₃
GE _c	G.C.	O ₂	O ₃

c.3 Diagramación Operativa



c.4 Descripción de la técnica

- **Selección de pacientes**

Se seleccionaron sin discriminar sexo pacientes entre 5 a 9 años de edad, de la clínica odontológica de la Universidad Católica Santa María,

previo consentimiento de sus padres o apoderados (anexo 1). Los pacientes no fueron incluidos en el estudio si algunos de los siguientes criterios estaban presentes: (1) enfermedades sistémicas graves, (2) uso de antibióticos en los últimos 30 días, (3) niños menores de 5 años y mayores de 9 años.

- **Extracción de muestras de conductos radiculares**

Previamente a la extracción, se esterilizaron en tubos de ensayo con tapa rosca limas de endodoncia en el autoclave del laboratorio de microbiología del pabellón "H". Una vez obtenidas las limas estériles se procedió a la extracción de muestras de los pacientes seleccionados de conductos radiculares. En total se trabajó con 5 pacientes de los cuales se extrajeron 2 muestras por cada uno.

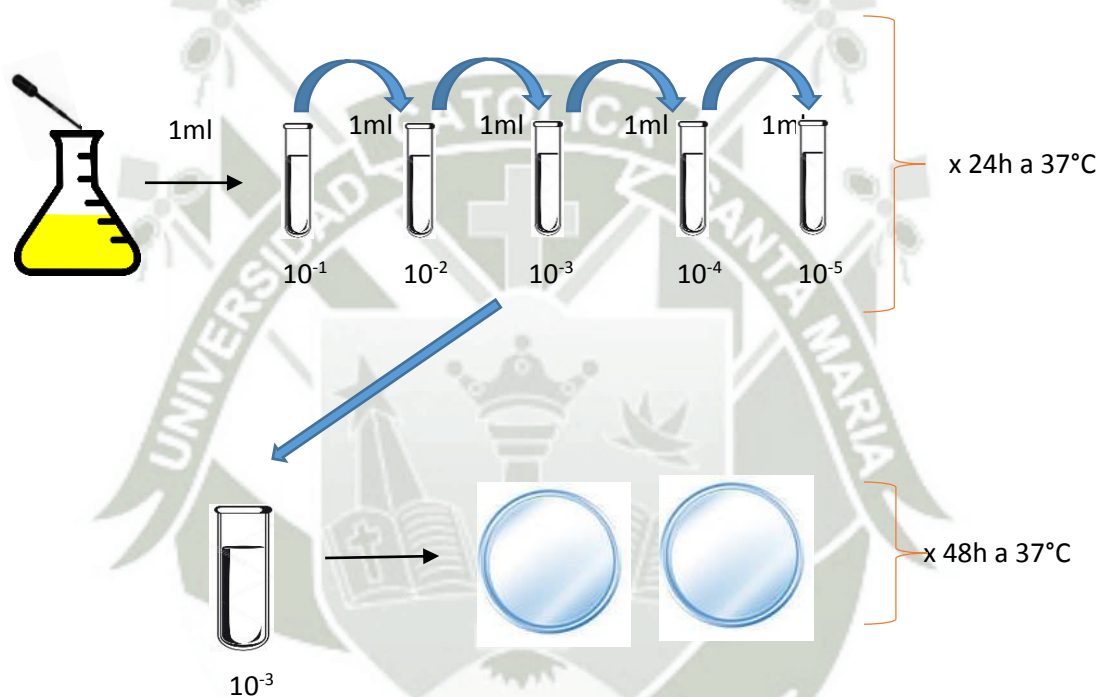
- **Aislamiento de *Enterococcus faecalis***

Las muestras extraídas de los pacientes fueron sembradas en caldo peptonado al 1%, donde se realizaron diluciones seriadas hasta el 10^{-5} . Se esperó 24 horas a 37 °C para su crecimiento en el caldo, pasadas las 24 horas se escogieron las diluciones de 10^{-3} , debido a que su grado de turbidez era el ideal para nuestras siembras en placa. Debido a que se trabajó con muestras nativas de los pacientes y no muestras de ATCC, se buscó exhaustivamente un medio para el aislamiento e identificación rápida y simple para *Enterococcus faecalis*, por lo que, se usó el Agar Hipertónico; este medio es utilizado para evaluar tolerancia a la sal de cocos Gram positivos. Se hizo la siembra por aislamiento en

cada placa con agar hipertónico con cada muestra en caldo peptonado al 10^{-3} a 48 horas por $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

El Agar Hipertónico está compuesto por: 25 gr de Caldo de Cerebro Corazón; 1 gr de glucosa; 60 gr de cloruro de sodio y 0.016 gramos de púrpura bromocresol para 1L.

Diagrama de aislamiento para *E. faecalis*.



- **Pruebas bioquímicas para la Identificación morfológica de *Enterococcus faecalis***

Después de la siembra de nuestras muestras en el agar hipertónico por unas 48 horas se visualizó diferentes tipos de colonias según las muestras obtenidas, para este tipo de agar la identificación de las colonias de *E. faecalis* se identifican por ser colonias blancas con apariencia gomosa.

Para la Identificación bioquímica se realizaron las pruebas de: (A) Tinción Gram, (B) catalasa, (C) Agar TSI.

- **Coloración Gram:** Esta coloración nos permitió identificar si la bacteria es Gram positiva o Gram negativa. Para ello se realizó los siguientes pasos para la tinción gram:

- Se realizó un extendido en un portaobjeto
- Se fijó la muestra con metanol durante un minuto
- Se agregó azul metileno por 1 minuto.
- Se enjuago con agua
- Se agregó lugol por 1 minuto
- Se agregó alcohol acetona y se esperará entre 5 y 30 segundos
- Se enjuago con agua.
- Se agregó safranina por 1 minuto.
- Se lavó con agua
- Se procedió a observar al microscopio a 100X con aceite de inmersión

Esta fue la primera identificación que nos permitió aceptar o rechazar las muestras de las placas en el microscopio se pudo observar, colonias Gram positivas en pares con coloración azul, colonias que suelen presentarse para este tipo de agar hipertónico en *E. faecalis*.

- **Catalasa:** La catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias, descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, para esta prueba se procedió a colocar una pequeña

muestra de material a identificar sobre un portaobjetos y luego se le adiciono con ayuda de una pipeta pasteur una a dos gotas de agua oxigenada. El desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno indica que la prueba es positiva. Para el caso de *Enterococcus faecalis* no se observó reacción alguna, ya que esta bacteria es catalasa negativa.

- **Agar TSI:** (Agar Hierro Triple Azúcar) para identificar *E.faecalis* esta fue una prueba importante ya que nos permito gracias a su composición observar el metabolismo de nuestra bacteria. según: (1) Fermenten o no glucosa. (2) Fermenten o no lactosa o sacarosa, (3) Produzcan o no ácido sulfhídrico (4) Produzcan o no gas. La *Enterococcus faecalis* es una bacteria fermentadora de glucosa, por lo que acidifico el medio haciendo variar a amarillo el indicador del fondo del tubo, también es fermentadora de sacarosa por lo que la superficie cambio del color rojo a amarillo. Para *Enterococcus faecalis* pudimos ver que todo el tubo cambio de color rojo a color amarillo, lo que nos indicó que es fermentadora de glucosa y sacarosa. En el ensayo no se observó un desplazamiento del medio hacia arriba que nos indica que es productora de gas ni cambio de color a negro que productora de ácido sulfhídrico, si hubiera ocurrido esto entenderemos que no se trata de nuestra bacteria objetivo.

Teniendo todas estas identificaciones tanto morfológicas como bioquímicas de las muestras tomadas de cinco pacientes de la clínica odontológica de la Universidad Católica de Santa María de niños entre 6 a 9 años, se llegó a aislar e identificar del paciente M2 muestra A,

mayor cantidad de colonias de *Enterococcus faecalis* a diferencia de los otros pacientes. Estas muestras fueron identificadas ya que, según referencias bibliográficas, es una bacteria Gram positiva, crece en pares de colonias, catalasa negativa, tolerante a medios salinos, degradadora de glucosa y sacarosa.

Posterior a la identificación de la bacteria objetivo, se volvió a cultivar la bacteria ya identificada en caldo peptonado al 1% por 24 horas a 37 °C, para así poder sembrar *Enterococcus faecalis* en el agar Mueller Hilton para la identificación de halos inhibidores.

- **Preparación de extractos**

Para la preparación de los extractos se trabajó con hojas de guanábana secas compradas en el mercado San Camilo. Se pesaron 10 gramos de las hojas y se diluyeron en 100 ml agua destilada estéril, se procedió a calentar la muestra hasta que, de un par de hervores, previamente el recipiente también fue esterilizado.

Los matraces se taparon y se retiraron del calor y se dejaron enfriar durante 45 minutos. Después de enfriar, el contenido de los matraces se filtró con papel de filtro para eliminar las impurezas.

Se esperó a que enfríe la muestra la cual luego se diluyó en concentraciones de 25 %, 50 % y 75 %.

Los extractos se almacenaron por separado en recipientes estériles herméticos al aire y esmerilados. Se utilizó un control positivo de Gluconato de Clorhexidina (0,12%), con controles comparativos de antimicrobianos estándar en la difusión de discos para comparación.

Todas las muestras se almacenaron en un refrigerador a 4 ° C hasta que se realicen los análisis.

- **Determinación de la sensibilidad antimicrobiana por medio de los halos de inhibición.**

Para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana se realizó la siembra siguiendo la técnica de Kirby Bauer con la bacteria *Enterococcus faecalis* en el agar Mueller Hilton, luego se colocó los discos de papel filtro previamente esterilizados impregnados con la solución de extractos de *Annona muricata* a las diferentes concentraciones establecidas, también se trabajó con Gluconato de clorhexidina al 0.12% como muestra control de inhibición. Todas las muestras fueron incubadas a 37°C, por 24 y 48 horas.

Pasadas las 24 horas y 48 horas se procedió a la observación y medición de las muestras, finalmente se medirán los diámetros de las zonas de inhibición e interpretaremos los resultados.

1.2 INSTRUMENTOS

a. Instrumento documental

a.1 Especificación.

Se utilizará un solo instrumento de tipo estructurado denominado, ficha de observación microbiológica en las que se registran las medidas de los halos de inhibición de la *Annona muricata* en distintas concentraciones 25%, 50% y 75% a las 24 horas y 48 horas.

a.2 Estructura.

VARIABLES	INDICADORES		SUBINDICADORES	MEDICION
crecimiento bacteriano de:	Halo inhibitorio Medición del halo inhibitorio	(2)	2.1. Suceptible > 16 mm 2.2 Intermedio 9 a 15mm	24 Horas 48 Horas

b. Instrumento Mecánico.

- Autoclave
- Balanza eléctrica
- Cámara de anaerobiosis
- Cámara de bioseguridad
- Cocina eléctrica
- Incubadora
- Estufa
- Mechero
- Refrigeradora
- Balón
- Embudo
- Matraces
- Probeta graduadas
- Tubos de ensayo

1.3. MATERIALES.

- Extracto Acuoso de hojas de guanábana
- Bacterias

- Agar Mueller Hilton
- Algodón
- Alcohol 70°
- Agua destilada
- Campo de trabajo
- Discos de papel
- Gasa
- Agar hipertónico
- Tinción gram

2. CAMPO DE VERIFICACION

2.1 UBICACIÓN ESPACIAL

La investigación se llevará a cabo en la Universidad Católica de Santa María, en el laboratorio de microbiología H-401

2.2 UBICACIÓN TEMPORAL

Se llevará a cabo entre los meses de agosto a diciembre del 2017

2.3 UNIDADES DE ESTUDIO

a. Opción

Se elige la alternativa de grupos.

b. Manejo metodológico

c. b.1 Identificación de los grupos

Se trabajará con 3 grupos experimental de (*Annona muricata*) al 25% , 50% y 75% y un grupo control que recibirá el gluconato de clorhexidina.

b.2 criterios para igualar grupos**b.2.1. criterio de inclusión**

- Niños sin enfermedades sistémicas graves
- Niños que no estén usando antibióticos en los últimos 30 días
- entre 6 a 9 años de edad
- No importará el sexo del paciente
- Consentimiento informado firmado por tutor o padre..

b.2.2 criterio de exclusión

- Enfermedades sistémicas graves
- Uso de antibióticos en los últimos 30 días
- Niños menores de 6 años y mayores de 9 años

b.2.3 criterio de eliminación

- Niños sin conductos infectados.

b.3 Tamaño de grupos

GE₁	—————→	4 R
GE₂	—————→	4 R
GE₃	—————→	4 R
GC	—————→	1 R

3. ESTRATEGIAS DE RECOLECCION

3.1 Organización.

Se informará al tutor o padre sobre la investigación que se llevará a cabo, Se pedirá el consentimiento informado a los padres de los niños. También se presentará una solicitud de autorización para el uso de los laboratorios y posteriormente se aplicará la investigación. Con los datos recolectados se procederá para el análisis estadístico de los datos.

3.2 Recursos.

a. Recursos humanos.

Investigador: C.D. Brigida Quispe Sanca

Asesor: Dr. Alberto Figueroa Banda

Guía de laboratorio: Ing biotecnología: Cristal Danae Mixcan Martinez

b. Recursos Físicos

- Infraestructura: uso de la clínica y ambientes de laboratorio de Microbiología de la UCSM, uso de la biblioteca de UCSM
- Internet
- Pacientes niños.

c. Recursos Económicos.

- Autofinanciado por la investigadora

d. Recursos institucionales

- Universidad Católica de Santa María, facultad de odontología
- Clínica odontológica de la UCSM

4. ESTRATEGIA PARA MANEJAR LOS RESULTADOS

4.1 Plan de procesamiento de los datos

a. Tipo de procesamiento

El procesamiento será de tipo manual y computarizado a través del programa Excel 2016 con la “prueba t para medias de dos muestras emparejadas”

b. Plan de operaciones

b.1 Plan de clasificación

La información obtenida será ordenada en una matriz de registro y control.

b.2 Plan de codificación

Si se utilizará de acuerdo de las variables e indicadores

b.3 Plan de recuento

Usando matrices de conteo y el esquema tabulación.

b.4 Plan de tabulación

Se elaborará tablas de tipo numérico, de simple y doble entrada.

b.5. Plan de traficación

Dependiendo de los resultados optaremos probablemente por las gráficas.

4.2. Plan de análisis de datos

a. Tipo: Cuantitativo multifactorial univariado

b. tratamiento estadístico

Variable	Tipo estadística	Halo de medición	Estadística descriptiva	Estadística inferencial
<i>Enterococcus faecalis</i>	Cuantitativa continua	Proporcional	Medidas de tendencia central y variabilidad	T de Student





CAPITULO III

RESULTADOS

Tabla N°01

**Efecto antimicrobiano *in vitro* de la “*Annona muricata*” al 50% en
Enterococcus faecalis. a las 24 y 48 horas, UCSM, Según
muestras observadas**

Arequipa - 2017

Extractos acuosos de <i>Annona muricata</i> al 50 %	24 horas	48horas
Media del halo de inhibición	7	7.625
Desviación Estándar	0	0.4787
Valor mínimo	7	7
Valor máximo	7	8

Fuente: ficha de observación microbiológica.

Elaboración: investigadora

INTERPRETACION

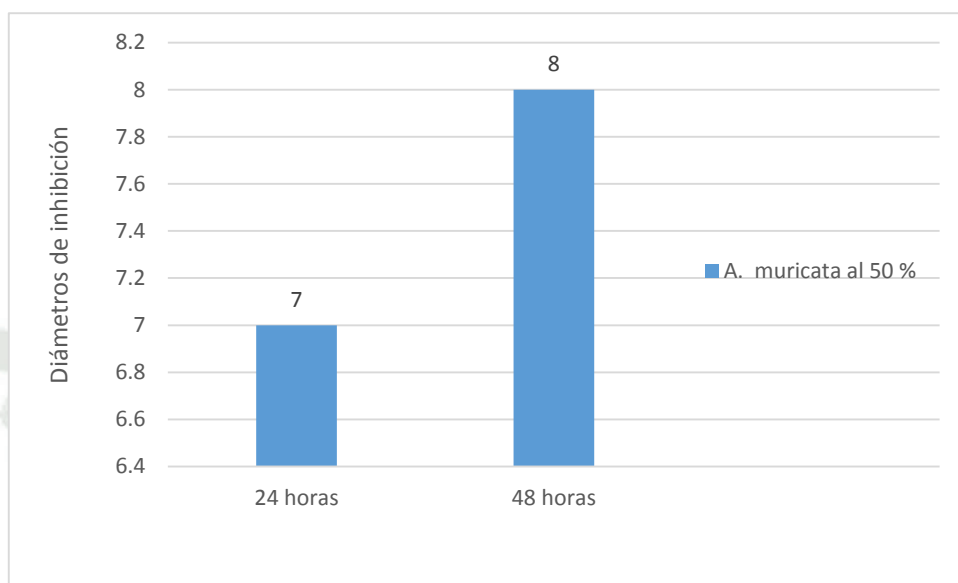
En el Tabla N° 01 podemos observar que Los diámetros de inhibición en los extractos acuosos del *Annona muricata* al 50 % a las 24 horas fueron de 7mm en promedio y a las 48 horas fueron de 7.625 mm, lo cual evidencia un poder medio inhibitorio frente a *E. faecalis*

Obteniendo la desviación estándar a las 48 horas tenemos 0.4787 lo que significa que los datos obtenidos, se alejan o se acercan con 0.4787 puntos respecto al promedio que es de 7.625 mm.

Grafico N° 01

Efecto antimicrobiano *in vitro* de la “*Annona muricata*” al 50% en *Enterococcus faecalis*. a las 24 y 48 horas, UCSM, Según muestras observadas

Arequipa - 2017



Fuente: tabla N°01

Elaboración: investigadora

Tabla N°02

**Efecto antimicrobiano *in vitro* de la “*Annona muricata*” al 75% en
Enterococcus faecalis. a las 24 y 48 horas, UCSM, Según
muestras observadas**

Arequipa - 2017

Extractos acuosos de <i>Annona muricata</i> al 75 %	24 horas	48horas
Media del halo de inhibición	9	10.875
Desviación Estándar	0	0.25
Valor mínimo	9	10.5
Valor máximo	9	11

Fuente: ficha de observación microbiológica.

Elaboración: investigadora

INTERPRETACION

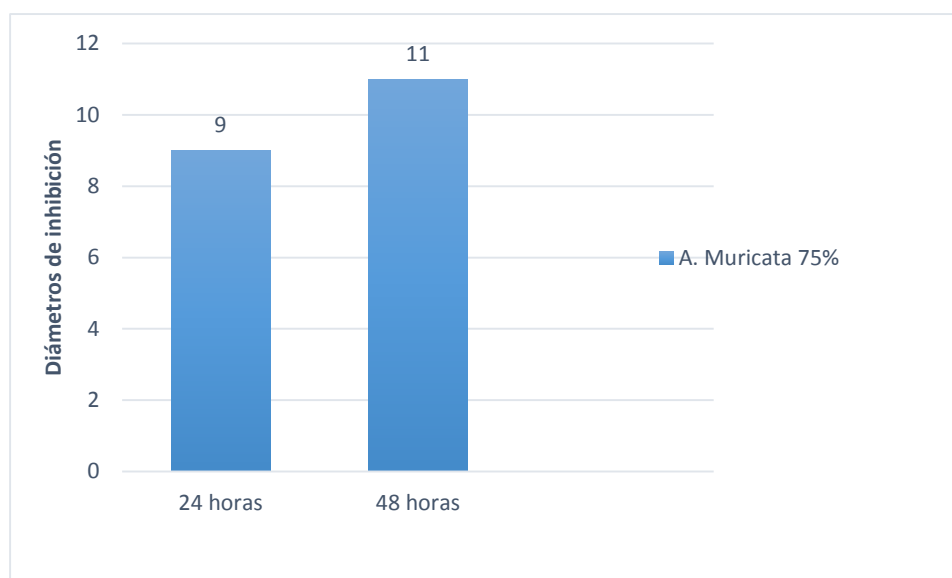
En el Tabla N° 02 podemos observar que Los diámetros de inhibición en los extractos acuosos de la *Annona muricata* al 75 % a las 24 horas fueron de 9mm en promedio y a las 48 horas fueron de 10.875 mm, lo cual evidencia un poder medio inhibitorio frente a *E. faecalis*

Obteniendo la desviación estándar a las 48 horas tenemos 0.25 lo que significa que los datos obtenidos, se alejan o se acercan con 0.4787 puntos respecto al promedio que es de 7.625 mm.

Grafico N 02°

**Efecto antimicrobiano *in vitro* de la “*Annona muricata*” al 75% en
Enterococcus faecalis. a las 24 y 48 horas, UCSM, Según
muestras observadas**

Arequipa - 2017



Fuente: tabla N°02.

Elaboración: investigadora

Tabla N°03

Efecto antimicrobiano *in vitro* de Gluconato de clorhexidina al 0.12% en *Enterococcus faecalis*. a las 24 y 48 horas, UCSM, Según muestras observadas

Arequipa - 2017

Gluconato de clohexidina al 0.12%	24 horas	48horas
Medida del halo de inhibición	13.5	16.25
Desviación Estándar	0.577	0.5
Valor mínimo	13	16
Valor máximo	14	17

Fuente: ficha de observación microbiológica

Elaboración: investigadora

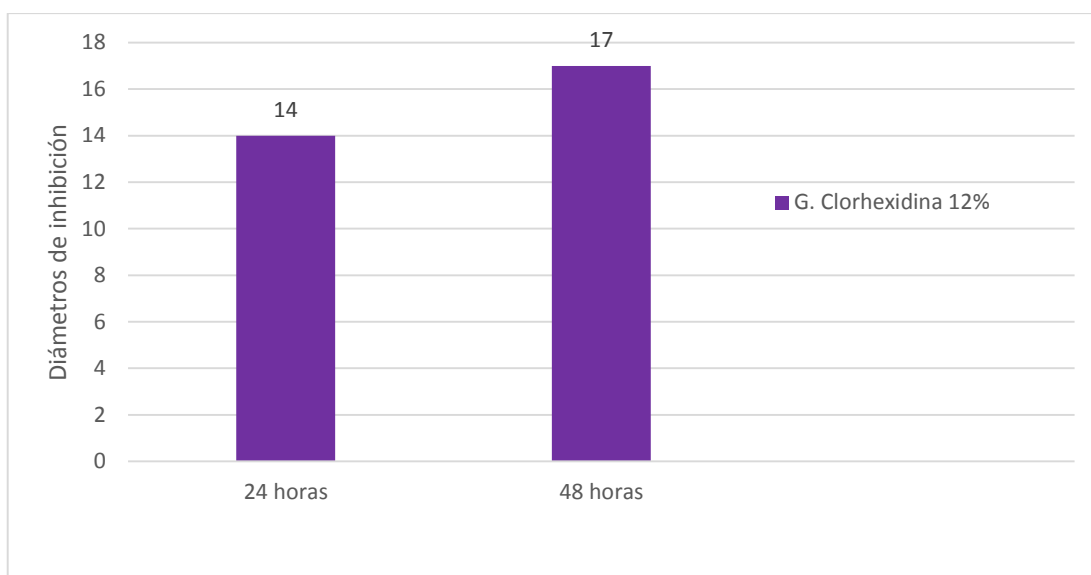
INTERPRETACION

Como se puede observar en la tabla N°03 el diámetro alcanzado a las 24 horas fue de 14 mm y el diámetro de las 48 horas fue de 16 mm, demostrando propiedades antibacterianas y continuando su liberación con el tiempo posterior a la instrumentación, tanto así que puede servir como medicación intraconducto, es por esta razón que se usó el gluconato como prueba control y con el cuál se evidenció su poder inhibitorio frente a *E. faecalis* a las 24 y 48 horas.

Grafico N° 03

Efecto antimicrobiano *in vitro* de Gluconato de clorhexidina al 0.12% en *Enterococcus faecalis*. a las 24 y 48 horas ,UCSM, Según muestras observadas

Arequipa - 2017



Fuente: tabla N°03

Elaboración: investigadora



Tabla N°04

Efecto antimicrobiano *in vitro* de la “*Annona muricata*” en diferentes concentraciones y Gluconato de clorhexidina al 0.12%, a las 24 y 48 horas en *Enterococcus faecalis*. UCSM, Según muestras observadas

Arequipa - 2017

Tiempo	Soluciones	Halo de inhibición promedio	Desviación estándar
24 horas	<i>A. muricata</i> 25% Clohexidina 0.12%	0 13.5	0 0.577
	<i>A. muricata</i> 50% Clohexidina 0.12%	7 13.5	0 0.577
	<i>A. muricata</i> 75% Clohexidina 0.12%	9 13.5	0 0.577
48 horas	<i>A. muricata</i> 25% Clohexidina 0.12%	0 16.25	0 0.5
	<i>A. muricata</i> 50% Clohexidina 0.12%	7.625 16.25	0.4787 0.5
	<i>A. muricata</i> 75% Clohexidina 0.12%	10.875 16.25	0.25 0.5

Fuente: ficha de observación microbiológica.

Elaboración: investigadora.

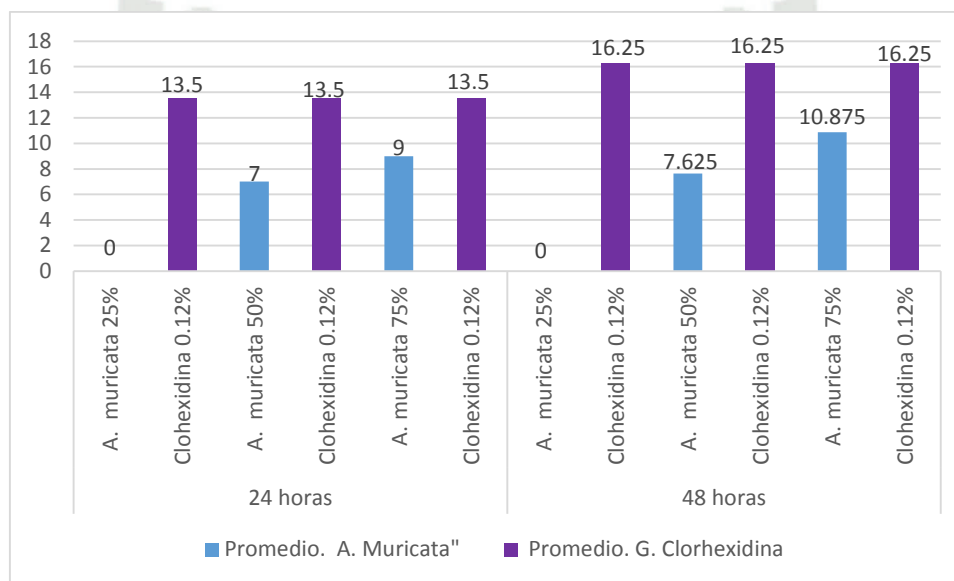
INTERPRETACION

En la tabla N°04 Para los extractos acuosos de *Annona muricata*, se pudo observar que las concentraciones de 25% fueron negativas para la inhibición, sin embargo, para las muestras de 50% el diámetro alcanzado es de 7.625mm como promedio de inhibición y para 75% el diámetro alcanzado es de 10.875mm como promedio de inhibición.

Grafico N°04

Efecto antimicrobiano *in vitro* de la “*Annona muricata*” en diferentes concentraciones y Gluconato de clorhexidina al 0.12%, a las 24 y 48 horas en *Enterococcus faecalis*. UCSM, Según muestras observadas

Arequipa - 2017



Fuente: tabla N°04.

Elaboración: investigadora

Tabla N°05

Análisis de la prueba T Student de gluconato de clorhexidina al 0.12% y *Annona muricata* al 75% a las 48 horas. UCSM, Según muestras observadas

Arequipa - 2017

	<i>Gluconato de clorhexidina 0.12%</i>	<i>Annona muricata al 75%</i>
Media	16.25	10.875
Varianza	0.25	0.06
Observaciones	4	4
Coeficiente de correlación de Pearson	0.33	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	3	
Estadístico t	22	
P(T<=t) una cola	0	
Valor crítico de t (una cola)	2	
P(T<=t) dos colas	0	
Valor crítico de t (dos colas)	3	

Fuente: ficha de observación microbiológico.

Elaboración: investigador

INTERPRETACION

En la tabla N°05 se observa el análisis de la prueba T, para medias de dos muestras emparejadas donde: la media del gluconato de clorhexidina 0.12% es de 16.25mm y el de la *Annona muricata* al 75% fue de 10.875mm

Se consideró para este análisis estadístico los valores mayores, que fueron a las 48 horas en *Annona muricata* al 75% comparado con

nuestra muestra control el gluconato de clorhexidina al 0.12%, ya que se observó una mayor eficacia en ambos casos.

Se puede concluir con estos datos que el valor crítico “3” que es menor al t estadístico “22” que es mejor usar el antibiótico en términos de efectividad que el extracto de *Annona muricata* al 75% como posible inhibidor de la *E. faecalis* en conductos radiculares. Sin embargo, se observó en las pruebas *in vitro* que el extracto acuoso de la *Annona muricata* al 75% funciona para inhibir *E. Faecalis* es decir que la bacteria objetivo es susceptible en esa concentración del extracto acuoso.



DISCUSION

A partir de los hallazgos obtenidos los extractos acuosos las hojas de *Annona muricata* actúa como bactericida frente a *Enterococcus faecalis* extraídos de muestras de conductos radiculares infectados en niños de la ciudad de Arequipa.

Estos resultados guardan relación con los que sostienen Autor: Mathew, J., George y col “Actividad antibacteriana del extracto foliar de *Annona muricata* y *Simarouba glauca* en *Enterococcus faecalis*.” (2016) Se determinó el efecto antimicrobiano de los extractos acuosos de hojas de *Annona muricata* y *Simarouba glauca* sobre *Enterococcus faecalis* mediante el método de difusión en agar. colocaron aproximadamente 10 µl de cada extracto en placas de agar tripticasa y se incubaron durante la noche. Se utilizaron hipoclorito de sodio al 1% y agua destilada como controles positivos y negativos. El extracto foliar de *A. muricata* mostró una eficacia similar a la del hipoclorito de sodio. En este estudio se compararon los extractos foliares de *A. muricata* y *S. glauca* con el hipoclorito de sodio por su efectividad contra *E. faecalis*, el patógeno más común encontrado en los conductos radiculares. Ello es acorde a lo que en este estudio se halla.

También coinciden con el estudio de Pai, B. M., Rajesh, “Eficacia antimicrobiana del extracto de hojas de guanábana (*Annona muricata*) sobre patógenos orales: un estudio *in vitro* -2016”

Se evaluó la eficacia antimicrobiana de la extirpación de hojas de guanábana (*Annona muricata*) en *Streptococcus mutans*,

Streptococcus mitis, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Candida albicans* usando el método de difusión en disco. Se observó que todas las concentraciones de extractos fueron efectivas en la microbiota excepto para *P. intermedia*. El extracto de Guanábana era efectivo en especie de *Cándida*, con todas las concentraciones que exhibían la propiedad bactericida y fungicida. Los extractos a diferentes concentraciones fueron eficaces cuando se compararon con los controles estándar de oro y el efecto fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$). lo que corrobora los hallazgos previos de Jonny et al., Y Donati M et al.. La actividad antimicrobiana de los extractos de Guanábana nunca se ha evaluado en microorganismos orales; por lo tanto, es difícil comparar su eficacia con la de cualquier otro extracto; por lo tanto, se utilizó un control positivo de gluconato de clorhexidina, como una escala efectiva para comparar el mismo. La concentración más efectiva de extracto de Guanábana fue del 20%, los efectos de este extracto fueron mucho menores que los del control estándar dorado en ambos casos (es decir, Ciprofloxacina para bacterias y fluconozol para *Candida*), pero fueron casi similares a los de Chlorhexidine Gluconato, que allana el camino para un posterior análisis del mismo a mayor concentración

CONCLUSIONES

PRIMERA:

El efecto antimicrobiano *in vitro* de la “*Annona muricata*” al 25% en *Enterococcus faecalis* de conductos radiculares infectados en niños de la ciudad de Arequipa no presentó reacción inhibitoria por lo que se descarta la concentración de este extracto acuoso como inhibidor bacteriano.

SEGUNDA:

El efecto antimicrobiano *in vitro* de la “*Annona muricata*” al 50% en *Enterococcus faecalis* de conductos radiculares infectados en niños de la ciudad de Arequipa, presentó inhibición intermedia alcanzando un valor máximo de 8mm de diámetro.

TERCERA:

El efecto antimicrobiano *in vitro* de la “*Annona muricata*” al 75% en *Enterococcus faecalis* de conductos radiculares infectados en niños de la ciudad de Arequipa presento inhibición microbiana máxima a las 48 horas, alcanzando un valor máximo de 11 mm lo que nos indica que este extracto sería el adecuado si se quiere susceptibilidad de la bacteria.

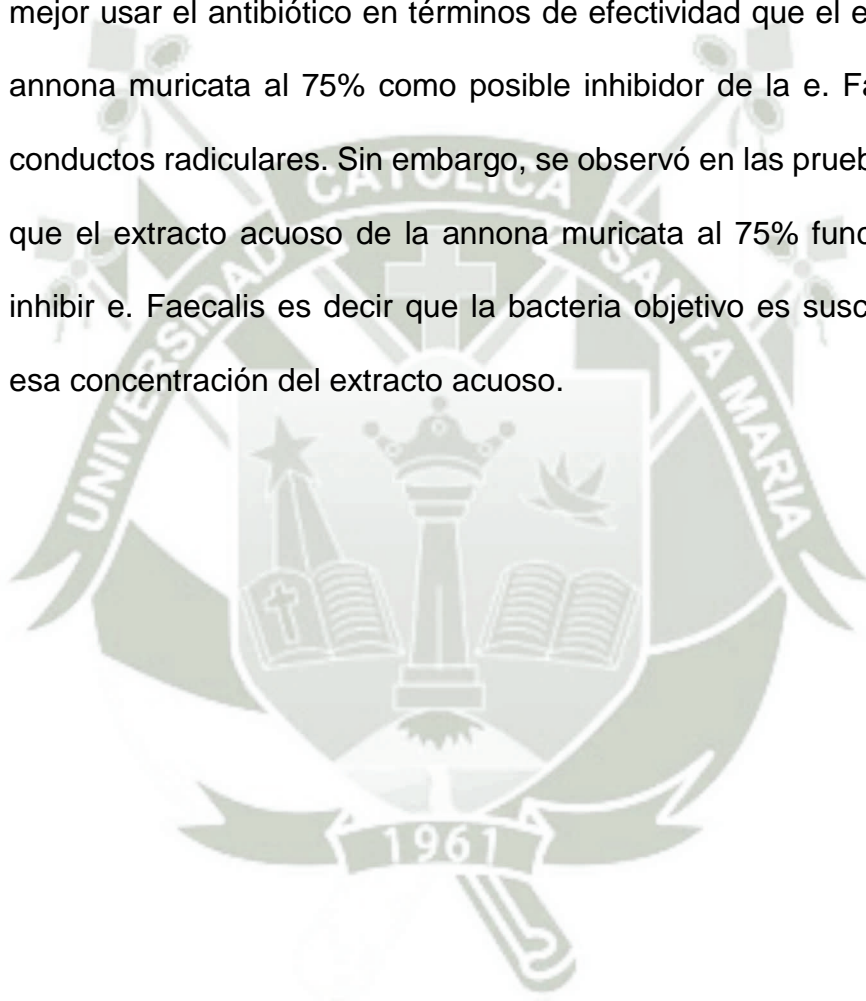
CUARTA:

La diferencia del efecto antimicrobiano *in vitro* de la “*Annona muricata*” a diferentes concentraciones en *Enterococcus faecalis* de conductos radiculares infectados en niños de la ciudad de Arequipa, presentó una respuesta buena comparada con su prueba control del gluconato de clorhexidina al 0.12%. Cabe destacar que la eficacia del antibiótico es

superior a la del extracto acuoso, sin embargo, se puede minimizar el riesgo de contraer enfermedades bucales mediante la inhibición bacteria con extractos naturales a un menor costo.

QUINTA

Según la prueba estadística de la t student se puede concluir con estos datos que el valor crítico “3” que es menor al t estadístico “22” que es mejor usar el antibiótico en términos de efectividad que el extracto de *annona muricata* al 75% como posible inhibidor de la *e. Faecalis* en conductos radiculares. Sin embargo, se observó en las pruebas in vitro que el extracto acuoso de la *annona muricata* al 75% funciona para inhibir *e. Faecalis* es decir que la bacteria objetivo es susceptible en esa concentración del extracto acuoso.



RECOMENDACIONES

PRIMERO:

Se sugiere seguir con estudios antimicrobianos de flora bucal con extractos de *Annona muricata*, en diferentes solventes orgánicos para poder determinar su eficacia como bactericida en microorganismos de conductos radiculares infectados en el área de odontopediatría.

SEGUNDO:

Se sugiere seguir con la investigación de extractos acuosos de la *Annona muricata* en otras especies bacterianas bucales, ya que existen reportes científicos de su poder germicida para muchos patógenos.

TERCERO:

Se sugiere utilizar extractos acuosos de la *Annona muricata* como medicina alternativa o el riesgo de contraer enfermedades bucales mediante la inhibición bacteria con extractos naturales a un menor costo, que abarca su diversidad y flexibilidad de uso, su disponibilidad y asequibilidad en la región y principalmente para reducir las reacciones adversas.

QUARTA:

Se sugiere utilizar extractos acuosos de la *Annona muricata* como enjuagatorios bucales para disminuir la carga bacteriana fundamentalmente en niños al alto índice de caries o con procesos infecciosos. Puede ayudar a la terapia empírica, podrían ser las soluciones temporales aprovechando los recursos que están disponibles en mercados.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- **BIBLIOGRAFÍA**

BROOKS G., CARROL K., BUTEL J., MORSE S. Manual Moderno de Microbiología Medica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 19ª ed. 2008, 19-20.

BEZERRA DA SILVA.L. A. tratado de odontopediatria tomo 2 1ª Ed. 2008 pg. 674

CARDENAS JARAMILLO D. Fundamentos de la odontología “Odontología pediátrica” 3ª Ed 2003, pg 46.

CRISTEA, A. D., Popa, M., Chirifiuc, M. C., Marutescu, L., Lazar, V., Suciu, I, & Perlea, P. (2015). The antimicrobial efficiency of endodontic irrigation solutions on bacterial biofilm. A literature review. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 5(4)

ESCOBAR MUÑOZ F. Odontología Pediátrica 2ª Edición 2004 pg 217

GOMES, B. P., & Pinheiro, E. T. (2017). Extraradicular Endodontic Infections. *Endodontic Microbiology*, 129-148.

JARAMILLO-Flores, M. E., & Hernandez-Sanchez, H. (2000). Thermal diffusivity of soursop (*Annona muricata* L.) pulp. *Journal of Food Engineering*, 46(2), 139-143.

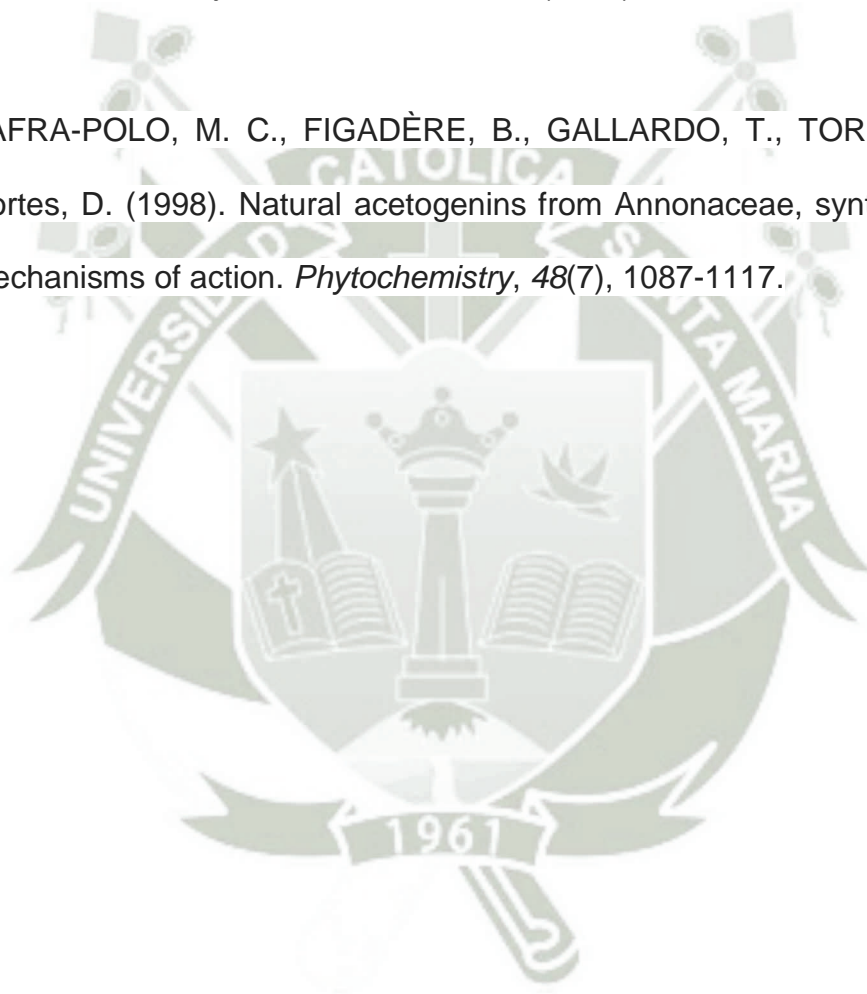
PINKHAM J. R, STEVEN M. A. ANDERSON J. y col Odontología pediátrica, 2ª Ed. Pg 169

LEVI ALFONSO. J. cirugía maxilofacial pediátrica ciencias médicas 3^a

Ed.2007 pg. 60

TORRES, C., & Cercenado, E. (2010). Lectura interpretada del antibiograma de cocos gram positiva. *Enfermedades Infecciosas y microbiología clínica*, 28(8), 541-553. Kim, M., Gutiérrez-Cacciabue, D., Schriewer, A., Rajal, V. B., & Wuertz, S. (2014).

ZAFRA-POLO, M. C., FIGADÈRE, B., GALLARDO, T., TORMO, J., & Cortes, D. (1998). Natural acetogenins from Annonaceae, synthesis and mechanisms of action. *Phytochemistry*, 48(7), 1087-1117.



- **HEMEROGRAFIA**

ADEWOLE, S. O., & CAXTON-MARTINS, E. A. (2006). Morphological changes and hypoglycemic effects of *Annona muricata* linn.(annonaceae) leaf aqueous extract on pancreatic β -cells of streptozotocin-treated diabetic rats. *African Journal of Biomedical Research*, 9(3).

ADEWOLE, S., & OJEWOLE, J. (2009). Protective effects of *Annona muricata* Linn.(Annonaceae) leaf aqueous extract on serum lipid profiles and oxidative stress in hepatocytes of streptozotocin-treated diabetic rats. *African journal of traditional, complementary and alternative medicines*, 6(1).

ALALI, F. Q., Liu, X. X., & McLAUGHLIN, J. L. (1999). Annonaceous acetogenins: recent progress. *Journal of Natural products*, 62(3), 504-540.

ALVE., ZAIA, A. A., Ferraz, C. C., Almeida, J. F., & Gomes, B. P. (2016). Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolates from teeth with failure of the endodontic treatment. *Journal of endodontics*, 42(7), 1022-1028

A. G. A., & DUARTE, M. A. H. (2013). In vitro alkaline pH resistance of *Enterococcus faecalis*. *Brazilian dental journal*, 24(5), 474-476.

ANDREWS, J. M. (2008). BSAC standardized disc susceptibility testing

method (version 7). *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 62(2), 256-278.

BARBOSA-Ribeiro, M., De-Jesus-Soares (2016) Characterization of virulence genes of *Enterococcus faecalis* isolates teeth.

BOZZA, F. L., MOLGATINI, S. L., PÉREZ, S. B., TEJERINA, D. P., PÉREZ TITO, R. I., & Kaplan, A. E. (2005). Antimicrobial effect in vitro of chlorhexidine and calcium hydroxide impregnated gutta-percha points. *Acta Odontol Latinoam*, 18(2), 51-6.

CARVALHO, C. N., GRAZZIOTIN-SOARES, R., de MIRANDA CANDEIRO, G. T., MARTINEZ, y col. (2017). Micro Push-out Bond Strength and Bioactivity Analysis of a Bioceramic Root Canal Sealer. *Iranian Endodontic Journal*, 12(3), 343.

CWIKLA, S. J., BÉLANGER, M., GIGUÈRE, S., y col (2005). Dentinal tubule disinfection using three calcium hydroxide formulations. *Journal of endodontics*, 31(1), 50-52.

COWAN, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.

CHAN, P., Ah, R., & Mh, K. (2010). Anti-arthritis activities of *Annona muricata* L. leaves extract on complete Freund's adjuvant (CFA)-induced arthritis in rats. *Planta Medica*, 76(12), P166.

DE SOUSA, O. V., VIEIRA, G. D. V., DE PINHO, y col (2010). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanol extract of *Annona muricata* L. leaves in animal models. *International journal of molecular sciences*, 11(5), 2067-2078

DZOTAM, J. K., TOUANI, F. K., & KUETE, V. (2016). Antibacterial activities of the methanol extracts of *Canarium schweinfurthii* and four other

Cameroonian dietary plants against multi-drug resistant Gram-negative bacteria. *Saudi journal of biological sciences*, 23(5), 5

DU, T., WANG, y col. (2014). Effect of long-term exposure to endodontic disinfecting solutions on young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. *Journal of endodontics*, 40(4), 509-514.

DE PAZ, L. E. C., SEDGLEY, C. M., & Kishen, A. (Eds.). (2015). *The Root Canal Biofilm* (Vol. 9). Springer.

EDMOND, M. B., WALLACE, S. E., MCCLISH, D. K., PFALLER, M. A., JONES, R. N., & WENZEL, R. P. (1999). Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clinical infectious diseases*, 29(2), 239-244.

EGGADI, V., GUNDAMEDI, S., SHESHAGIRI, S. B. B., Revoori, S. K., Jupally, V. R., & Kulandaivelu, U. (2014). Evaluation of anticancer activity of *Annona muricata* in 1, 2-dimethyl hydrazine induced colon cancer. *World Appl Sci J*, 32(3), 444-450.

HAMID, R. A., FOONG, C. P., AHMAD, Z., & HUSSAIN, M. K. (2012). Antinociceptive and anti-ulcerogenic activities of the ethanolic extract of *Annona muricata* leaf. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(3), 630-641.

GYAMFI, K., Sarfo, D., Nyarko, B., Akaho, E., Serfor-Armah, Y., & Ampomah-Amoako, E. (2011). Assessment of elemental content in the fruit of graviola plant, *Annona muricata*, from some selected communities in Ghana by instrumental neutron activation analysis. *Elixir Food Sci*, 41, 5671-5675.

JIMÉNEZ, V. M., Gruschwitz, M., Schweiggert, R. M., Carle, R., & Esquivel,

- P. (2014). Identification of phenolic compounds in soursop (*Annona muricata*) pulp by high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization mass spectrometric detection. *Food Research International*, 65, 42-46.
- KAFIL, H. S., & ASGHARZADEH, M. (2014). Vancomycin-resistant enterococcus enterococcus faecalis isolated from education hospital of iran. *Maedica*, 9(4), 323.
- KAHLMETER, G., BROWN, D. F., y col (2003). European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 52(2), 145-148.
- KALINA, A. P. (1970). The taxonomy and nomenclature of enterococci. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 20(2), 185-189.
- KLIN, K. A., KAU, A. L., y col. (2009). Mechanism for sortase localization and the role of sortase localization in efficient pilus assembly in *Enterococcus faecalis*. *Journal of bacteriology*, 191(10), 3237-3247.
- KOSSOUOH, C., MOUDACHIROU, M y col, G. (2007). Essential oil chemical composition of *Annona muricata* L. leaves from Benin. *Journal of Essential Oil Research*, 19(4), 307-309.
- KÜMMERER, K., Al-Ahmad, A., & Mersch-Sundermann, V. (2000). Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. *Chemosphere*, 40(7), 701-710
- LIAO, J. C., DENG, J. S., CHIU, C. S., HUANG, S. S., HOU, W. C., Lin, W. C., & Huang, G. J. (2012). Chemical compositions, anti-inflammatory,

antiproliferative and radical-scavenging activities of *Actinidia callosa* var. *ephippioides*. *The American journal of Chinese medicine*, 40(05), 1047-1062.

LAMONT, R. J., HAJISHENGALLIS, G. N., & JENKINSON, H. F. (2014). *Oral microbiology and immunology* (No. Ed. 2). ASM press.

LOVE, R. M. (2001). *Enterococcus faecalis*—a mechanism for its role in endodontic failure. *International endodontic journal*, 34(5), 399-405.

MATSUSHIGE, A., MATSUNAMI, y col. (2012). Three new megastigmanes from the leaves of *Annona muricata*. *Journal of natural medicines*, 66(2), 284-291.

MANDLIK, J., SHAH, N., SHARMA, A., & DESAI, M. (2016). Microbial identification in endodontic infections with an emphasis on molecular diagnostic methods: a review. *lioab journal*, 7(6), 60-70.

MISHRA, S., Ahmad, S., Kumar, N., & Sharma, B. K. (2013). *Annona muricata* (the cancer killer): a review. *Glob J Pharma Res*, 2(1), 1613-1618.

MINARI, J. B., & OKEKE, U. (2014). Chemopreventive effect of *Annona muricata* on DMBA-induced cell proliferation in the breast tissues of female albino mice. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 15(4), 327-334.

MOHMMED, S. A., Vianna, M. E., Penny, M. R., Hilton, S. T., Mordan, N., & Knowles, J. C. (2017). Confocal laser scanning, scanning electron, and transmission electron microscopy investigation of *Enterococcus faecalis* biofilm degradation using passive and active sodium hypochlorite irrigation within a simulated root canal model. *MicrobiologyOpen*.

MOGHADAMTOUSI, S. Z., FADAEINASAB, M., NIKZAD, S., MOHAN, G., Ali, H. M., & Kadir, H. A. (2015). *Annona muricata* (Annonaceae): a review

of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. *International journal of molecular sciences*, 16(7), 15625-15658.

MONTAGNER, F., JACINTO, R. C., SIGNORETTI, F. G. C., DE MATTOS, V. S., GRECCA, F. S., & de Almeida Gomes, B. P. F. (2014). Beta-lactamic resistance profiles in *Porphyromonas*, *Prevotella*, and *Parvimonas* species isolated from acute endodontic infections. *Journal of endodontics*, 40(3), 339-344.

N'GOUEMO, P., Koudogbo, B., Tchivounda, H. P., Akono-Nguema, C., & Etoua, M. M. (1997). Effects of ethanol extract of *Annona muricata* on pentylenetetrazol-induced convulsive seizures in mice. *Phytotherapy Research*, 11(3), 243-245.

NEELAKANTAN, P., ROMERO, M., VERA, J., DAOOD, U., KHAN, A. U., YAN, A., & CHEUNG, G. S. P. (2017). Biofilms in Endodontics—Current Status and Future Directions. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), 1748.

NIAZI, S. A., Al-Ali, W. M., PATEL, S., FOSCHI, F., & MANNOCCI, F. (2015). Synergistic effect of 2% chlorhexidine combined with proteolytic enzymes on biofilm disruption and killing. *International endodontic journal*, 48(12), 1157-1167.

OKID, P. A., ARTANTI, y col. (2013). *Annona muricata* linn leaf induce apoptosis in cancer cause virus. *Journal of Cancer Therapy*, 4(7), 1244.

OLIVI, G., DIVITO, E., PETERS, O., KAITASAS, V., ANGIERO, F., SIGNORE, A., & BENEDICENTI, S. (2014). Disinfection efficacy of photon-induced photoacoustic streaming on root canals infected with *Enterococcus faecalis*: an ex vivo study. *The Journal of the American*

Dental Association, 145(8), 843-848.

OLSSON-LILJEQUIST, B., LARSSON, P., WALDER, M., & MIÖRNER, H. (1997). Antimicrobial susceptibility testing in Sweden. III. Methodology for susceptibility testing. *Scandinavian journal of infectious diseases. Supplementum*, 105, 13-23.

PAI, B. M., RAJESH, G., RAO, A. (2016). Anti-microbial Efficacy of Soursop Leaf Extract (*Annona muricata*) on Oral Pathogens: An In-vitro Study. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 10(11), ZC01.

PARIROKH, M., SADR, S., NAKHAE, y col (2014). Comparison between prescription of regular or on-demand ibuprofen on postoperative pain after single-visit root canal treatment of teeth with irreversible pulpitis. *Journal of endodontics*, 40(2), 151-154.

PLADISAI, P., AMPORNARAMVETH, R. S., & CHIVATXARANUKUL, P. (2016). Effectiveness of different disinfection protocols on the reduction of bacteria in *Enterococcus faecalis* biofilm in teeth with large root canals. *Journal of endodontics*, 42(3), 460-464.

SARANTINOPOULOS, P., Kalantzopoulos, G., & Tsakalidou, E. (2001). Citrate metabolism by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 229. *Applied and environmental microbiology*, 67(12), 5482-5487.

SIQUEIRA, J. F., & RÔÇAS, I. N. (2014). Present status and future directions in endodontic microbiology. *Endodontic topics*, 30(1), 3-22.

SUNDQVIST, G. (1992). Associations between microbial species in dental root canal infections. *Molecular Oral Microbiology*, 7(5), 257-262.

STUART, C. H., SCHWARTZ, S. A., BEESON, T. J., & OWATZ, C. B.

(2006). *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *Journal of endodontics*, 32(2), 93-98.

SUNG, K., KHAN, S., MARASA, B., MIN, S., KWEON, O., NAWAZ, M., & CERNIGLIA, C. (2015). Genomic sequence of a clinical vancomycin-resistant reference strain, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299. *Genome announcements*, 3(6), e01495-15.

VALERA, M. C., OLIVEIRA, y col. (2016). Action of Chlorhexidine, Zingiber officinale, and Calcium Hydroxide on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, and Endotoxin in the Root Canals. *J Contemp Dent Pract*, 17(2), 114-8.

WU, F. E., GU, Z. M., ZENG, y col. (1995). Two new cytotoxic monotetrahydrofuran Annonaceous acetogenins, anomuricins A and B, from the leaves of *Annona muricata*. *Journal of natural products*, 58(6), 830-836.

YANG, C., Gundala, S. R., Mukkavilli, R., Vangala, S., Reid, M. D., & Aneja, R. (2015). Synergistic interactions among flavonoids and acetogenins in *Graviola* (*Annona muricata*) leaves confer protection against prostate cancer. *Carcinogenesis*, 36(6), 656-665.

ZAKARIA, M. N., TAKESHITA, T., SHIBATA, Y., (2015). Microbial community in persistent apical periodontitis: a 16S rRNA gene clone library analysis. *International endodontic journal*, 48(8), 717-728.

- **WEBGRAFIA**

<https://www.Online.library.Wiley.Com>, book.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, PubMed. Factors and Antimicrobial Strategies in Dental Pulp Regeneration. *Journal of Endodontics*.

www.Jendodon.com, article, references

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> Antibiogram Committee. (2003).

International journal of antimicrobial agents.



ANEXOS





FICHA DE OBSERVACION MICROBIOLÓGICA

FICHA N°.....

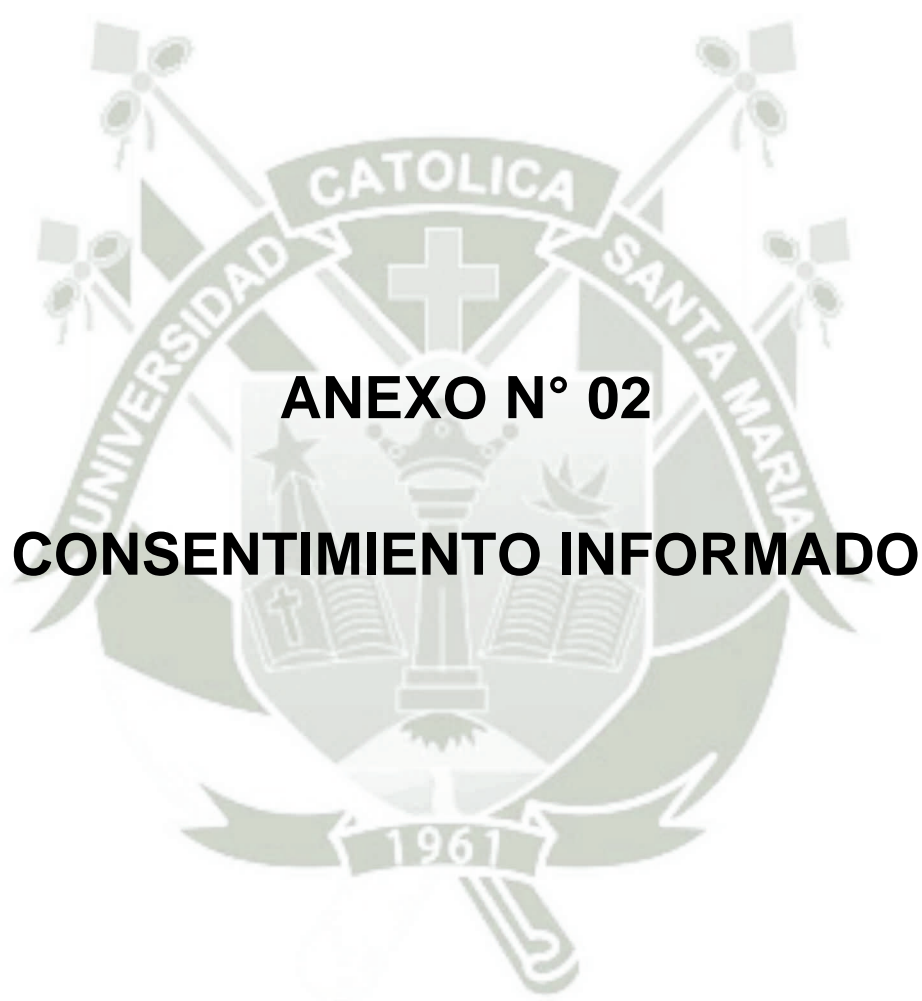
N° de placa

1) Concentraciones de la Annona muricata.

24 horas						48 horas					
A.M.	Clorhexidina	A.M.	Clorhexidina	A.M.	Clorhexidina	A.M.	Clorhexidina	A.M.	Clorhexidina	A.M.	Clorhexidina
25%	0.12%	50%	0.12%	75%	0.12%	25%	0.12%	50%	0.12%	75%	0.12%

2) Halo de inhibición

	24 horas			48 horas		
	25%	50%	75%	25%	50%	75%
2.1 Susceptible > 11mm						
2.2 Intermedio 5-10 mm						
2.3 Resistente hasta 4 mm						

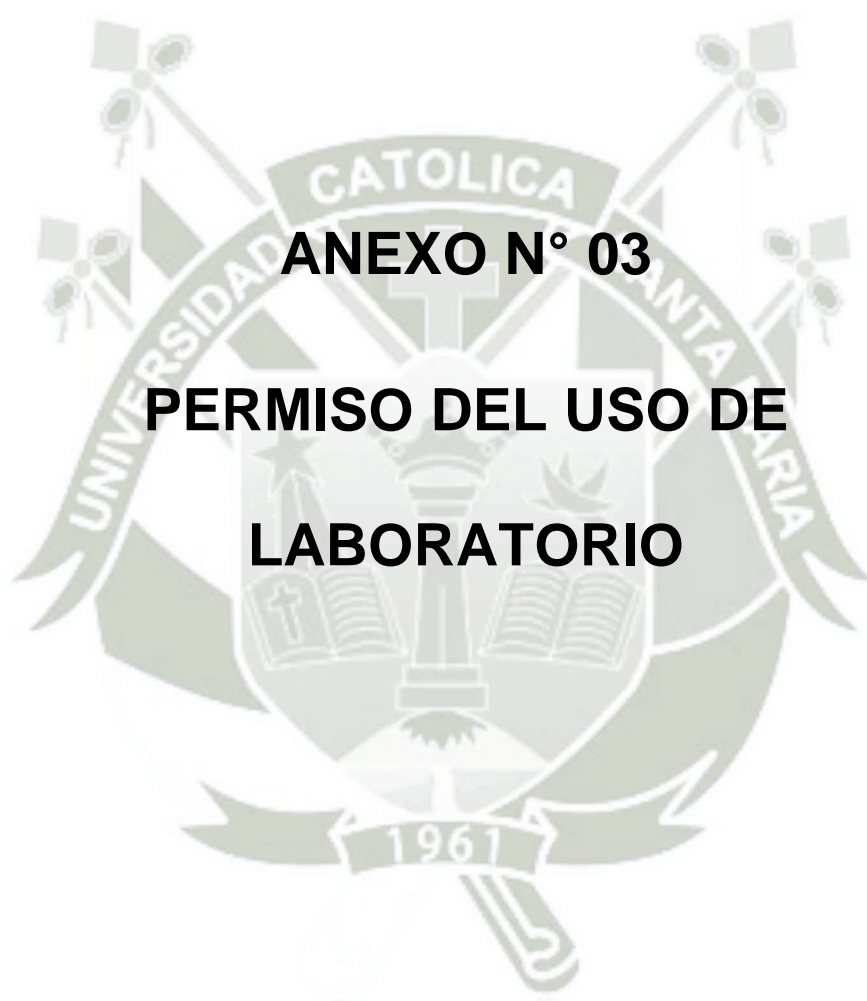


CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo,.....identificado con DNI N°..... acepta y da su consentimiento para que su menor hijo(a) sea unidad de estudio en esta investigación conducida por la C.D. Brigida Quispe Sanca, estudiante de la segunda especialidad en Odontopediatria de la facultad de Odontologia, de la Universidad Catolica de Santa Maria titulada “ Efecto antimicrobiana In Vitrio De La *Annona Muricata* frente a *Enterococcus Faecalis* de conductos radiculares infectados en niños asistentes a la clínica odontológica de UCSM de la ciudad de Arequipa 2017” que tiene por objetivo determinar el efecto antimicrobiano de la “*annona muricata*” frente a los *enterococcus faecalis*.

Declaro como padre o apoderado del menor, he sido informado(a) claramente acerca del procedimiento, así mismo he realizado preguntas que considere necesarias las cuales han sido absueltas de forma clara y aceptables, por tanto en forma consciente y voluntaria doy mi consentimiento, para que se realice el recojo de muestras correspondientes.

.....
Firma



ANEXO N° 03
PERMISO DEL USO DE
LABORATORIO



Universidad Católica de Santa María

(51 54) 382038 Fax:(51 54) 251213 ✉ ucsm@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe Apartado: 1350

AREQUIPA - PERÚ

EXPEDIENTE 2017000038956.

UCSM-COORD.LAB - 029 - 2017

QUISPE SANCA BRIGIDA

Arequipa, 2017 agosto, 21

Pase a los Asistentes de Laboratorio:

Sra. Rocío Rodríguez

Se autoriza el uso del Laboratorio, *H-402*,
A la señorita indicada, de acuerdo al expediente 2017000038956. A fin de desarrollar el proyecto de Tesis "EFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DE ENTEROCOCCUS FAECALIS DE CONDUCTOS RADICULARES INFECTADOS EN NIÑOS DE LA CIUDAD DE AREQUIPA, 2017", previa coordinación de horario

Desde *28-08-2017* Hasta *28-09-2017*

Horario: *Jueves 17.00-20.00*

Miércoles, viernes 17.00-20.00

Sábado 11.00-13.00

Atentamente, *7 - 11 am*

JMZS/CLyG
rtr

J. Zambrano S.
Dra. JESÚS MARÍA ZAMBRANO SALAS DE CALLE
COORDINADORA DE LABORATORIOS
Y GABINETES
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

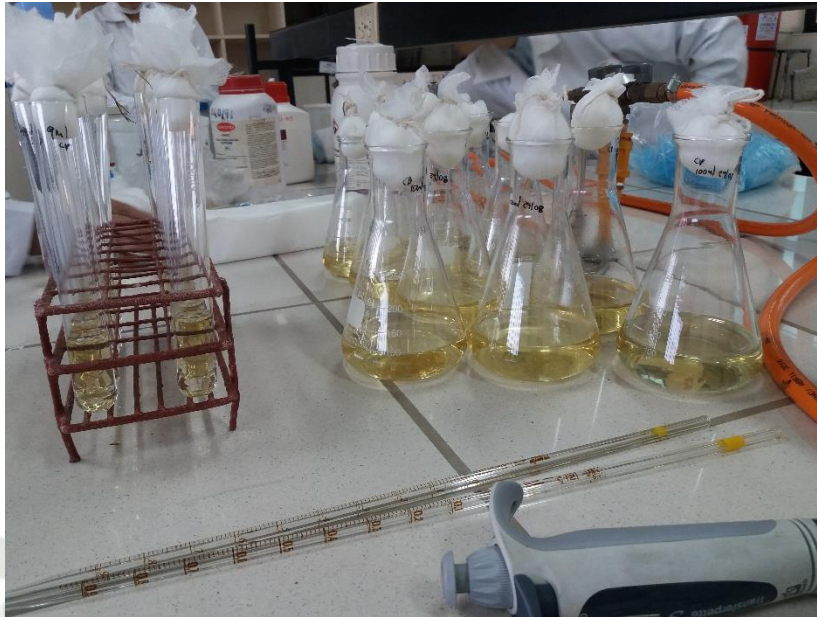


ANEXO N° 04
SECUENCIA FOTOGRAFICA

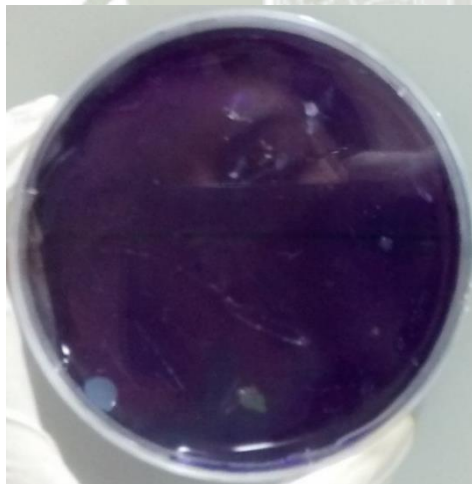
EXTRACCIÓN DE MUESTRAS DE CONDUCTOS RADICULARES DE PACIENTES SELECCIONADOS.



AISLAMIENTO PARA E. FAECALIS

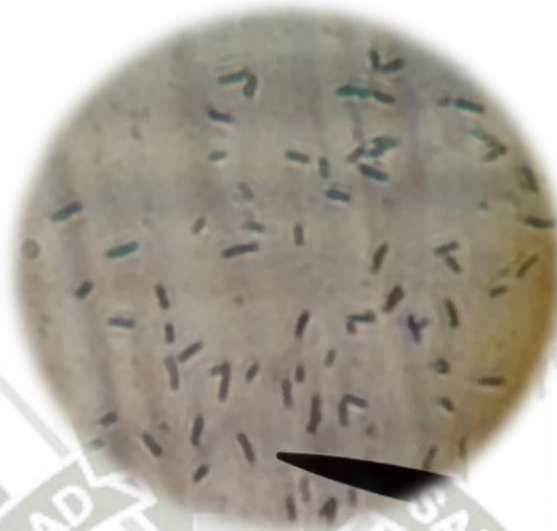


MUESTRAS REPRESENTATIVAS, PASADAS LAS 48H PUEDEN OBSERVAR DOS TIPOS DE COLONIAS, UNAS MÁS PEQUEÑAS Y OTRAS MÁS GRANDES Y GOMOSAS



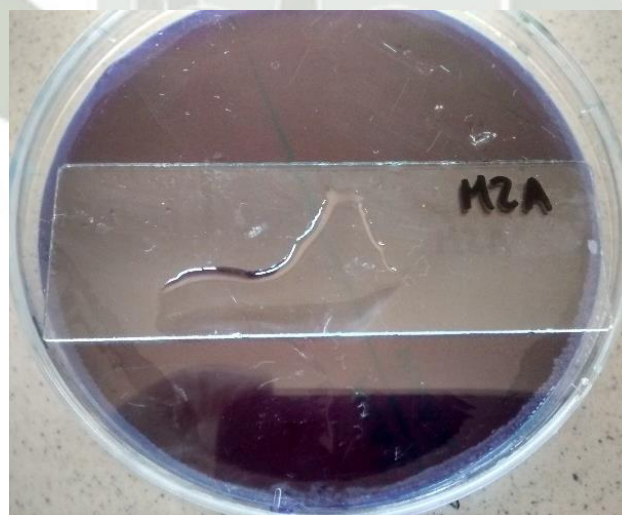
IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE ENTEROCOCCUS FAECALIS

PRUEBA DE GRAM



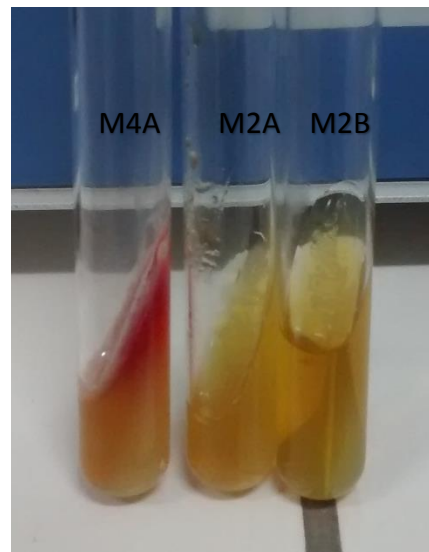
Colonias Gram positivas en pares, colonias que suelen presentarse para este tipo de agar hipertónico en *E. faecalis*. Esta foto corresponde al paciente M2

PRUEBA CATALASA



Se puede observar que en la muestra del paciente M2A dio como resultado a la prueba de catalasa negativo, ya que no se observa las burbujas procedentes de la reacción con el peróxido de hidrógeno

PRUEBA AGAR TSI



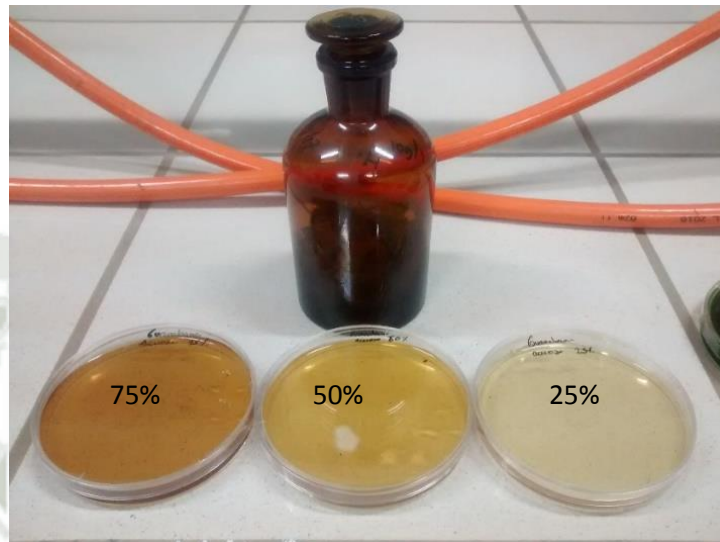
Se puede observar la diferenciación de fermentación en muestras diferentes, en la primera muestra (M4A) nos indica que es fermentador de glucosa y no fermentado de sacarosa por lo que el color rojo está presente en la parte superior, en el caso de las muestras del paciente M2, se puede observar el tubo completamente amarillo el cual demuestra que es fermentador de glucosa y sacarosa.

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS



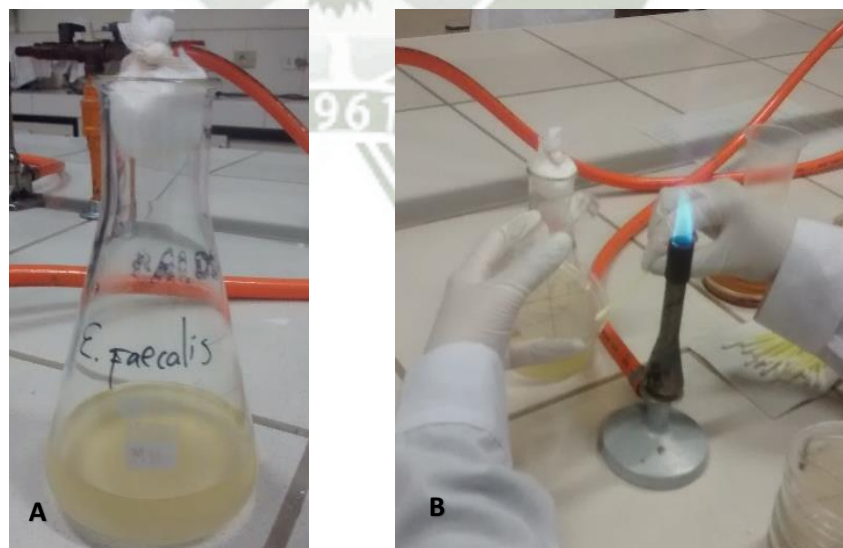
Hojas de Guanábana calentándose en un beaker.

DILUCIONES DEL EXTRACTO DE GUANÁBANA A DIFERENTES CONCENTRACIONES

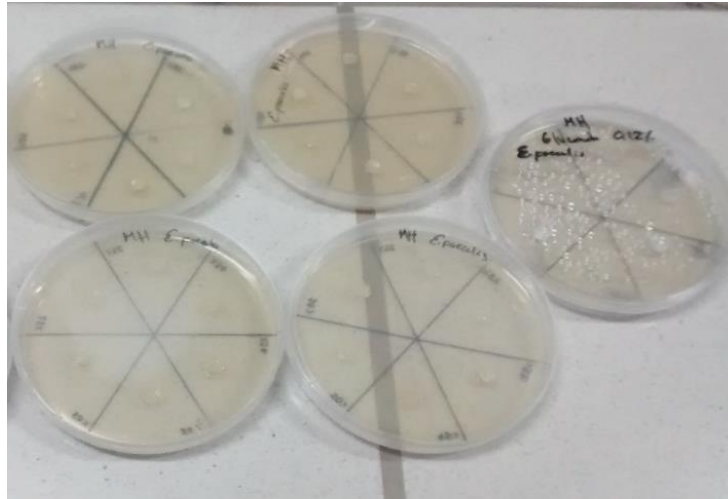


Se puede observar la degradación de colores de acuerdo a las concentraciones.

DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR MEDIO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN.

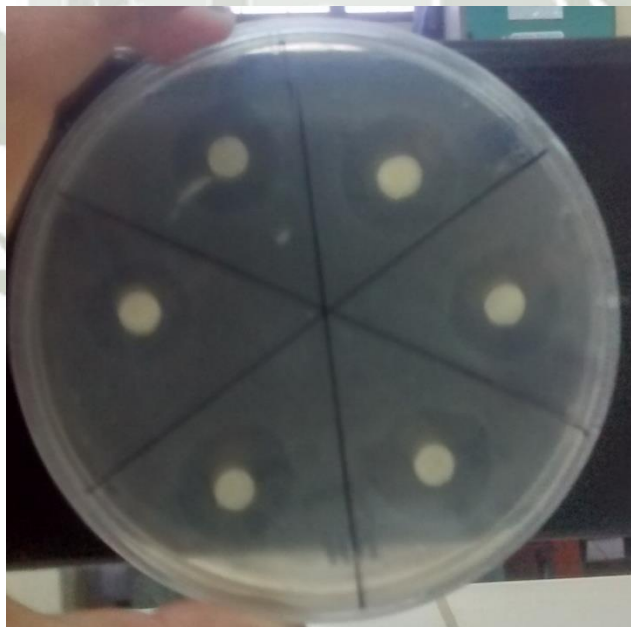


(A) Cultivo de *E. faecalis*, (B) siembra por la técnica de Kirby Bauer



Distribución de los discos empapados con *Annona muricata* a diferentes concentraciones de 25%, 50% y 75% en medio acuoso, y discos con Gluconato de clorhexidina al 0.12%.

INHIBICIÓN DE E. FAECALIS CON GLUCONATO DE CLORHEXIDINA AL 0.12% A LAS 48 HORAS.



Inhibición de *E. faecalis* con Gluconato de clorhexidina al 0.12% a las 48 horas.

**INHIBICIÓN DE *E. FAECALIS* CON EXTRACTOS ACUOSOS A DIFERENTES
CONCENTRACIONES (25%, 50% Y 75%) A LAS 48 HORAS.**

