

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CIUDAD JUÁREZ**  
**INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA**



**"EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE  
PROPÓLEO EN COMBINACIÓN CON  
NANOPARTÍCULAS DE PLATA CONTRA  
ENTEROCOCCUS FAECALIS"**

**TESIS**

QUE PRESENTA:

**C.D Karen Lizeth Burciaga Schietekat**

**PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN  
ENDODONCIA**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. LEÓN FRANCISCO ESPINOSA  
CRISTÓBAL**

# ÍNDICE

1. Introducción.....	4
1.1 Marco teórico.....	4
1.1.1 Irrigantes.....	4
1.1.2 Medicamentos intraconducto.....	5
1.1.3 Enterococcus faecalis.....	6
1.1.4 Propóleo.....	6
1.1.5 Nanopartículas de plata.....	7
1.2. Planteamiento del problema.....	7
1.3. Antecedentes.....	8
1.4 Justificación.....	8
1.4. Hipótesis.....	9
1.4.1 Hipótesis de trabajo ( $H_1$ ).....	9
1.4.2 Hipótesis nula ( $H_0$ ).....	9
1.4.3 Hipótesis alterna ( $H_A$ ).....	9
1.5. Objetivo general.....	9
1.6. Objetivos específicos.....	9
2. Materiales y Métodos.....	10
2.1 Diseño del estudio.....	10
2.2 Variables.....	10
2.3. Criterios de Selección.....	11
2.3.1 Criterios de inclusión.....	11
2.3.2 Criterios de exclusión.....	11
2.4. Grupos de estudio.....	11
3. Procedimientos.....	12
3.1 Lugares de obtención.....	12

3.2 Síntesis y caracterización de AgNPs.....	12
3.3 Preparación de soluciones de prueba.....	12
3.4 Realización de concentrado bacteriano.....	13
3.5 Suspensiones bacterianas.....	13
3.6 Determinación de CMI.....	14
3.7 Prueba de sustantividad.....	14
3.8 Prueba de halo de inhibición.....	14
5. Resultados.....	15
5.1 Caracterización de AgNPs por Dispersión de Luz Dinámica (DLS).....	15
5.2 Caracterización de AgNPs por Dispersión de Luz Dinámica (DLS).....	16
5.3 Prueba de concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	16
5.3 Prueba de sustantividad.....	19
5.4 Prueba de difusión en agar.....	20
6.Discusión.....	22
7.Conclusiones.....	25
8.Referencias.....	25

# 1. Introducción

El tratamiento de conductos es una alternativa conservadora a la extracción dental ante la invasión bacteriana en la pulpa dental, que la gran mayoría de las veces se extiende hasta el periápice, produciendo primero pulpitis, necrosis pulpar y, posteriormente, enfermedades periapicales. Este tratamiento consiste en varias etapas, en las cuales el conducto es ensanchado, limpiado y desinfectado para posteriormente ser obturado. (1) Es importante realizar las diferentes etapas del tratamiento para que el medio intraconducto quede libre de bacterias, en la medida que sea posible, con ayuda de diferentes sustancias irrigantes y medicamentos antibacterianos, para que el tratamiento sea efectivo y evitar reinvasión bacteriana. (2)

## 1.1 Marco teórico

### 1.1.1 Irrigantes

La irrigación es una parte crucial del tratamiento de conductos ya que en ella se realiza la limpieza química del tejido dental en aquellas zonas donde no es posible hacer una instrumentación mecánica, como en los conductos accesorios. Existen sustancias que cumplen con algunos o la mayoría de los requisitos que debe tener una sustancia irrigante como el hipoclorito de sodio, la clorhexidina y el EDTA. (3)

#### 1.1.1.1 Hipoclorito de sodio

El hipoclorito de sodio (NaOCl) es un compuesto halogenado utilizado como irrigante debido a sus propiedades antibacteriales, proteolíticas y de desbridamiento al ser utilizado en un rango de concentración que va del 0.5% al 6%. Su acción

antibacteriana radica en la interrupción de la síntesis del ADN de las bacterias. Además, el NaOCl tiene la capacidad de disolver el tejido pulpar y restos de tejido dentinario. (3,4,5)

#### 1.1.1.2Gluconato de clorhexidina

La clorhexidina es una de las sustancias irrigantes de mayor uso por detrás del hipoclorito de sodio, siendo una alternativa para este por ser poseer actividad antimicrobiana de amplio espectro y ser menos citotóxico. Normalmente es utilizado en una concentración de 2% para obtener efectos bactericidas, si se emplea a una menor concentración solo provee un efecto bacteriostático. Sin embargo, la clorhexidina no diluye restos orgánicos a diferencia del hipoclorito de sodio. (5,6)

#### 1.1.1.3 EDTA

El ácido etilendiaminotetraacético es un agente quelante que se utiliza en conjunto con NaOCl, ya que este último no remueve por completo la capa de barrillo dentinario y requiere de un auxiliar, además el EDTA promueve la lubricación del conducto y la reducción de microorganismos de este. (7)

### 1.1.2Medicamentos intraconducto

La instrumentación y la irrigación del conducto radicular en el tratamiento de conductos no es suficiente para eliminar el tejido infectado y las bacterias, por lo que el uso de medicamentos intraconducto son recomendados. El estándar de oro como medicamento es el hidróxido de calcio por sus propiedades antibacterianas, antiinflamatorias y analgésicas. (8,9)

#### 1.1.2.1Hidróxido de calcio

Fue presentado en 1920 por Hermann como recubrimiento pulpar y desde entonces su uso ha sido muy extendido por sus propiedades antimicrobianas, debido a su pH

alto; su capacidad para disolver material orgánico, inhibir la reabsorción dental, formar tejido duro, y en endodoncia es conocido por promover una cicatrización perirradicular con pocos efectos adversos. A pesar de ser un agente antibacteriano se ha reportado que, de las bacterias evaluadas, la enterococcus faecalis es la que tiene mayor resistencia frente al hidróxido de calcio, lo que la hace menos susceptible a este medicamento y por lo tanto nos enfrentamos a un mayor riesgo de fracaso del tratamiento endodóntico. (9,10)

### 1.1.3 Enterococcus faecalis

La enterococcus faecalis es una bacteria oportunista, Gram-positiva, anaerobia facultativa que está asociada a enfermedades perirradiculares persistentes postratamiento, pues se ha encontrado en un 22 a 77 % de los casos de tratamientos endodónticos fallidos y compone la mayor parte de la flora bacteriana encontrada en conductos ya tratados. Su habilidad para vivir en situaciones adversas es debida a la capacidad de formar un biofilm y adherirse a los túbulos dentinarios, lo que la hace resistente a la fagocitosis, anticuerpos y agentes antimicrobianos. Por lo anterior, esta bacteria representa un gran reto para la endodoncia en el éxito de sus tratamientos. (10,11)

### 1.1.4 Propóleo

El propóleo es una sustancia muy compleja fabricada por las abejas, las cuales recolectan resina y cera de flores, árboles y hojas y la mezclan con su saliva para crear un agregado pegajoso. Las abejas o utilizan para alisar las paredes y sellar las grietas de su colmena. Entre los componentes el propóleo, además de la cera y resina, están el polen, fenoles, hidrocarburos, terpenos, vitaminas y minerales. Al propóleo se le ha dado uso en la medicina y en la odontología debido a sus propiedades en la terapéutica ya que son antiinflamatorias, cicatrizantes, analgésicas y, por supuesto, antibacterianas. (11,12) En la endodoncia ha comenzado a estudiarse su uso como irrigante y medicamento intracanal ya que sus efectos han sido comparables a las sustancias convencionales como el hipoclorito de sodio, la clorhexidina y el hidróxido de calcio. (12)

### 1.1.5 Nanopartículas de plata

La nanotecnología surgió en este siglo y trajo consigo un paradigma para la ciencia, y la odontología no se queda atrás. Las nanopartículas son aquellas que miden de 1-100 nm y existen en la naturaleza o se sintetizan por procedimientos químicos. Debido a sus propiedades antibacterianas han llamado la atención de médicos y odontólogos. Su mecanismo de acción radica en la alteración de la membrana celular y se han utilizado diferentes metales en forma de nanopartículas, entre los que encontramos el oro, el cobre, el zinc y la plata. Este último ha sido reconocido como uno de los mejores agentes antimicrobianos, al actuar sobre una variedad de bacterias. Es por ello que en endodoncia se ha buscado emplear las nanopartículas de plata como una alternativa a los irrigantes, selladores de conductos y productos farmacéuticos intraconducto. (5,12)

## 1.2. Planteamiento del problema

A pesar de que se han aplicado y estudiado diversas sustancias antibacterianas para el tratamiento de enfermedades pulpares y periapicales, estas realmente no son tan efectivas contra la *E. Faecalis*, pues se siguen presentando fracasos en los tratamientos de conductos, y tal es el caso de las soluciones convencionales como el hipoclorito de sodio y el hidróxido de calcio. Es necesario buscar nuevas alternativas que nos ofrezcan una mejora en los tratamientos. Sustancias naturales como el propóleo brindan una esperanza para usarse en el tratamiento de conductos, pues ha demostrado actividad antimicrobiana contra la *E. faecalis*. Las nanopartículas de plata han demostrado una alta actividad antibacteriana frente a dicha bacteria. Sin embargo, hay muy poca información disponible sobre los efectos antibacteriales de la combinación del propóleo con nanopartículas de plata sobre la *E. faecalis* y no hay una comparación entre el efecto antimicrobiano del propóleo y las nanopartículas de plata por separado.

### 1.3. Antecedentes

El propóleo ha sido estudiado para su aplicación endodóntica, en estudios recientes se ha sugerido su uso debido a su alta actividad contra la enterococcus faecalis, la cual ha sido comparable con el hipoclorito y la clorhexidina. Pero sigue estando por debajo de este último. (11,14) Incluso en otro estudio ha sido comparable con el MTA y el hidróxido de calcio para la creación de tejido duro y se ha destacado una de sus principales ventajas al ser un material biocompatible al ser menos citotóxico que el  $\text{Ca(OH)}_2$ . (15,16).

En otro estudio de Parolia (2020) el propóleo se ha combinado con nanopartículas de quitosán, en el cual se evalúa la actividad antibacteriana contra el biofilm producido por Enterococcus faecalis y se obtuvieron resultados equiparables a la clorhexidina al 2%. Por lo que el propóleo en combinación con otros compuestos puede acercarse al efecto antibacteriano de la clorhexidina, agente antimicrobiano por excelencia. (17)

Las nanopartículas de plata, por su parte, en un estudio reciente se destaca su eficacia antimicrobiana contra bacterias endo-perio, tales como la Porphyromona gingivalis y E. faecalis. (18)

Existen pocos estudios que analizan la actividad antibacteriana del propóleo combinado con nanopartículas de plata, y son enfocados sobre todo al ámbito médico. En uno de ellos se aplica en suturas de seda y se destaca su actividad antibacteriana contra Staphylococcus aureus y Escherichia coli y su biocompatibilidad. (19) En otro estudio muestra la actividad antimicrobiana de esta combinación en vendas frente a diversas bacterias tales como E. faecalis, S. aureus, Staphylococcus epidermidis, E. coli, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans, entre otros. (20)

### 1.4 Justificación

El estudio del propóleo en combinación con nanopartículas de plata como un material potencialmente efectivo en el combate de los fracasos endodónticos



derivados de una infección persistente por la bacteria *E. faecalis*, va a abrir el panorama para la creación de nuevos medicamentos intraconducto e irrigantes económicos, de origen natural y biocompatibles. Se reduciría el número de retratamientos endodónticos por lo que disminuiría considerablemente el gasto económico y desgaste físico y emocional de los pacientes y de los clínicos. Además, esto brindará información para futuras investigaciones en el ámbito de la odontología y especialmente en la endodoncia.

## 1.4. Hipótesis

### 1.4.1 Hipótesis de trabajo ( $H_1$ )

El propóleo en combinación con nanopartículas de plata tiene una mayor actividad antibacteriana frente a la *E. faecalis* que el propóleo y las nanopartículas de Ag por sí mismas.

### 1.4.2 Hipótesis nula ( $H_0$ )

El propóleo en combinación con nanopartículas de plata no tiene una mayor actividad antibacteriana frente a la *E. faecalis* que el propóleo y las nanopartículas de Ag por sí mismas.

### 1.4.3 Hipótesis alterna ( $H_A$ )

El propóleo en combinación con nanopartículas de plata tiene mayor actividad antibacteriana frente a *Fusobacterium nucleatum*.

## 1.5. Objetivos

### 1.5.1 Objetivo general

Determinar el nivel antimicrobiano del propóleo combinado con nanopartículas de plata con la *E. faecalis*.

### 1.5.2 Objetivos específicos

- Sintetizar las nanopartículas de plata y combinarlas con propóleo.
- Cultivar a la bacteria *E. faecalis*

- Comparar el efecto antibacteriano con nanopartículas de plata y propóleo en combinación y por separado contra la *E. faecalis*.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Diseño del estudio

Se realizará un estudio experimental, transversal y comparativo y se recolectará la muestra bacteriana de *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212 mediante un muestreo no probabilístico de conveniencia en el laboratorio de Microbiología de la UACJ.

### 2.2 Variables

Independientes

Nombre	Tipo	Subtipo	Conceptual	Operacional
Propóleo	Cuantitativa continua	Razón	Sustancia fabricada por las abejas compuesta por resina y cera de flores, hojas y árboles.	µg/mL
Nanopartículas de plata	Cuantitativa continua	Razón	Partículas que miden entre 1-100nm	µg/mL
Propóleo con Nanopartículas de plata	Cuantitativa continua	Razón	Solución de propóleo y nanopartículas de plata	µg/mL
CaOH	Cuantitativa continua	Razón	Sustancia alcalina obtenida de la reacción de óxido de calcio con agua. Se utiliza como principal medicamento intraconducto.	µg/mL

Dependientes

Nombre	Tipo	Subtipo	Conceptual	Operacional
Concentración mínima Inhibitoria	Cuantitativa	Razón	Concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de determinada bacteria.	µg/ml
Halo de inhibición	Cuantitativa	Razón	Zona alrededor de un disco de antibiótico en el que no se produce crecimiento microbiano.	mm
Densidad óptica	Cuantitativa	Razón	Cantidad de luz que absorbe la muestra (absorbancia).	UA

## 2.3. Criterios de Selección

### 2.3.1 Criterios de inclusión

- Muestra de bacteria *Enterococcus faecalis*

### 2.3.2 Criterios de exclusión

- Muestras contaminadas

## 2.4. Grupos de estudio

1. AgNPs
2. PPS
3. PPS-AgNPs
4. PPS- CaOH
5. Control – (SF)

## 6. Control + (CaOH)

### 3. Procedimientos

#### 3.1 Lugares de obtención

La obtención y caracterización de nanopartículas de plata y la solución de propóleo se realizará en un laboratorio del Instituto de Ciencias Biomédicas.

La obtención de muestras bacterianas se realizará en laboratorio de del Instituto de Ciencias Biomédicas.

La muestra de absceso alveolar agudo en paciente con tratamiento endodóntico previo se obtendrá de la clínica de Odontología del Instituto de Ciencias Biomédicas.

#### 3.2 Síntesis y caracterización de AgNPs

Se disolvió  $\text{AgNO}_3$  0,01 M en 100 ml de agua desionizada durante 5 min con agitación magnética en un vaso de precipitado de 250 ml. Después se agregó a la solución 10 mL de agua desionizada con 0,1 g de ácido gálico; luego, el pH se ajustó inmediatamente usando NaOH 1,0 M elevándolo a 11.

Para la caracterización de las AgNPs se utilizó la dispersión de luz dinámica (DLS, Nanoparticle Analyzer, Nanoparticle SZ-100 series, HORIBA Scientific, Ltd., Nueva Jersey, EE. UU.) operando con un láser DPSS a una longitud de onda de 532 nm usando un ángulo de dispersión de 90 grados. Se realizó a una temperatura de 25 °C y una viscosidad del medio de dispersión de 0,895 mPa/s durante 60 segundos para cada muestra para evaluar el tamaño y el potencial zeta.

#### 3.3 Preparación de soluciones de prueba

Se preparó una solución de 4 ml con concentración 1:1 de propóleo con nanopartículas de plata de tamaño pequeño en un tubo de ensayo de 10 ml.

El hidróxido de calcio se preparó en una concentración de 100000 ppm en 4 ml de agua desionizada y se preparó otra solución con propóleo y CaOH en concentración de 1:1. Para la combinación de PPS/AgNPs se mezclaron soluciones 1:1. Las mezclas anteriores se colocaron en tubos Falcon.

### 3.4 Realización de concentrado bacteriano

Se solicitó la bacteria *E. faecalis* ATCC 29212 liofilizada al laboratorio de Química del Instituto de Ciencias Biomédicas de la UACJ, se tomó un gránulo con un asa previamente esterilizado y se incubó en 5 mL de agar Mueller Hinton (MH, BD™ Difco™, Estados Unidos) a 37 grados Centígrados durante 24 horas. Transcurrido el tiempo se inocularon ahora cuatro tubos con 5mL de agar MH y con 100 µl de la bacteria inoculada un día antes y se incubaron por 24 horas. Posteriormente los tubos se sometieron a centrifugación y con lo separado de este proceso se realizó un concentrado de la bacteria en una mezcla de medio agar MH y glicerol en tres tubos Eppendorf. Estos tubos se llevaron al ultracongelador para su conservación.

### 3.5 Suspensiones bacterianas

Para las pruebas de concentración mínima inhibitoria (CMI), sustentividad y halo de inhibición se utilizaron suspensiones bacterianas.

Se inocularon 5µL de la muestra de *E. faecalis* en un tubo con 5mL de caldo MH y se incubó por 24 horas. Pasado este tiempo, se dispersaron 100µl de bacteria en 3mL de solución buffer de fosfato (PBS por sus siglas en inglés, pH 7,4). La preparación anterior se analizó en un espectrofotómetro (EppendorfBioPhotometer Plus, Alemania) configurado a una longitud de onda de 550 nm para estandarizar la concentración de la bacteria ( $1.3 \times 10^8$  UFC/mL) a una densidad óptica de 0.126 UA de acuerdo a la escala de McFarland.

### 3.6 Determinación de CMI

Para investigar concentración mínima inhibitoria de AgNPs, PPS, PPS/AgNPs, CaOH, CaOH/PPs, en dos placas de 96 pocillos y se agregaron 200  $\mu$ L de soluciones prueba por triplicado en la primera fila (control negativo). Se colocaron 100 $\mu$ l de medio (caldo MH) a partir de la segunda columna. Se hicieron microdiluciones con micropipetas de la columna 1 a la columna 11. La columna 12 fue el control positivo. Se colocaron 100 $\mu$ l de bacteria estandarizada a  $1.5 \times 10^8$  en todas las filas. Se incubaron las placas en un recipiente con humedad a 37 grados centígrados durante 24 horas.

### 3.7 Prueba de sustantividad

En 24 tubos de ensayo de 10 mL se colocaron 4ml de caldo agar MH. Se reservaron cuatro de los tubos ya mencionados para el grupo control. Al resto de los tubos se les coloco 20  $\mu$ L de cada tratamiento (PPS, AgNPs, CaOH, PPS/AgNPs y PPS/CaOH). Eligió en cada uno de los grupos un tubo blanco a los que no se les proporcionó muestra bacteriana, al resto se les colocó 100 $\mu$  L de una suspensión estandarizada ( $1.3 \times 10^8$ CFU/mL) de *E. faecalis*. Todos los tubos fueron incubados a 37°C y analizados usando un espectrofotómetro UV-Vis para determinar los cambios en la densidad óptica a 550 nm después de 30 minutos, una hora, 3 horas, 6 horas, 8 horas, 10 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas. La actividad de sustantividad se determinó con los cambios en los valores de absorbancia según la inhibición del crecimiento de la bacteria expuesta y no expuestas a las sustancias antimicrobianas. Cada grupo se analizó por triplicado, teniendo así cuatro tubos por tratamiento (uno blanco, y tres con muestra bacteriana).

### 3.8 Prueba de halo de inhibición

En placas Petri con agar Infusión Cerebro- Corazón (BHI) se inocularon con 100  $\mu$ L de muestra bacteriana estandarizada con un asa micológica-bacteriologica. Se

colocaron cuatro discos de difusión apilados por cada tratamiento en cada caja (PPS, AgNPs, CaOH, PPS/AgNPs, PPS/CaOH, NaOCL y Solución Fisiológica (SF). Los discos fueron embebidos en muestra antibacteriana y colocados de la manera más distribuida posible. Se incubaron cuatro cajas Petri a 37 grados C durante 24 horas. Se midieron los halos de inhibición con la fórmula  $(Di - Dd) / 2$ .

### 3.9 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos de todas las pruebas que se realizaron, se utilizó el software SPSS (IBM ®SPSS® Statistics, Versión 22.0, 2013).

## 4. Resultados

### 4.1 Caracterización de AgNPs por Dispersión de Luz

#### Dinámica (DLS)

En el cuadro 1 se observan las características de las nanopartículas sintetizadas y después caracterizadas por Dispersión de luz dinámica (DLS por sus siglas en inglés). Se obtuvieron AgNPs de tamaño pequeño ( $6.6 \pm 0.8$  nm)(Figura 1) y con un potencial Zeta que mostró cargas negativas estables y definidas ( $-35 \pm 3.3$  mV). Con las características ya mencionadas, se asegura que se obtuvo un material nanoestructurado a base de plata y por su carga eléctrica se propone un buen comportamiento en una solución acuosa.

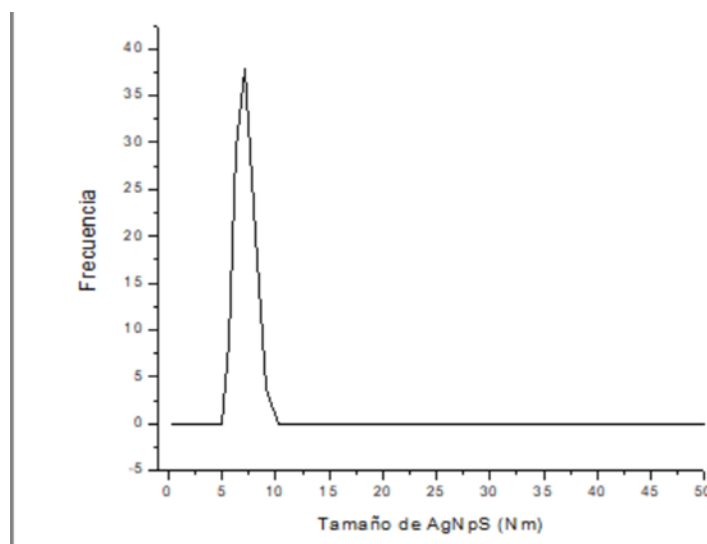


Fig. 1 Distribución del tamaño de AgNPs sintetizadas por DLS

Cuadro 1. Caracterización de AgNPs

AgNPs	Diámetro (DLS) (nm)	Concentración inicial (µg/mL)	Potencial Z (mV)
Pequeñas	6.6 ± 0.8	1070	-35 ± 3.3

## 4.2 Caracterización de AgNPs por Dispersión de Luz

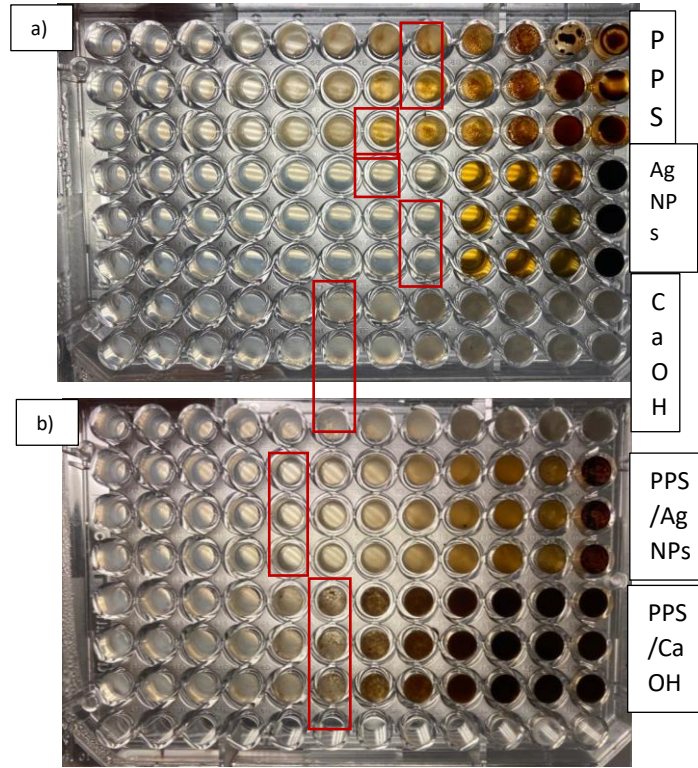
### Dinámica (DLS)

Se sintetizaron AgNPs de tamaño pequeño ( $6.6 \pm 0.8$  nm) y de potencial Zeta que mostró cargas negativas estables y definidas ( $-35 \pm 3.3$  mV). Con las características ya mencionadas, se asegura que se obtuvo un material nanoestructurado a base de plata y por su carga eléctrica se propone un buen comportamiento en una solución acuosa.

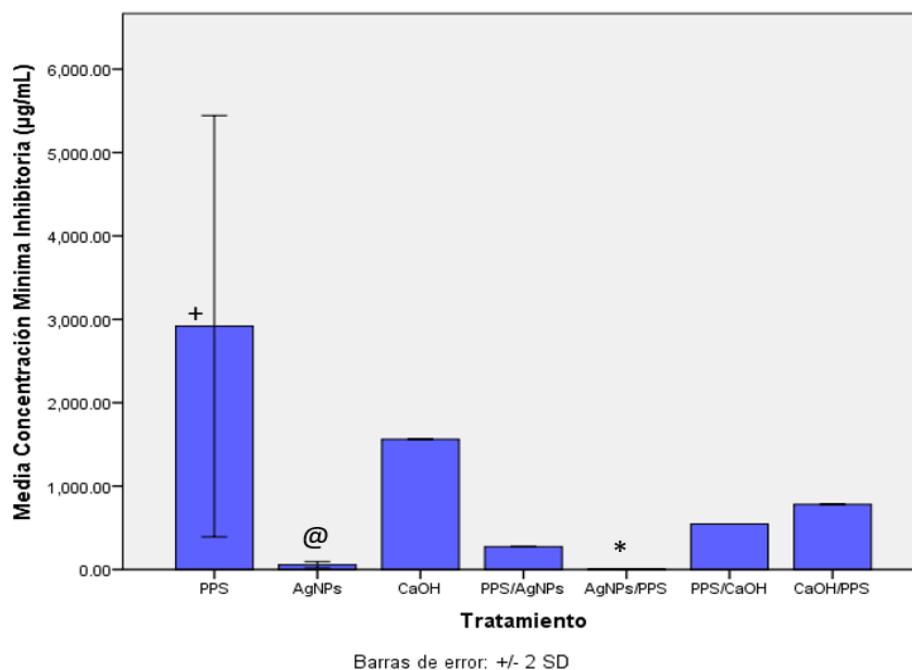
### 4.3 Prueba de concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

En la figura 2 y 3 y en el cuadro 2, se muestran los resultados de la prueba de concentración mínima inhibitoria de diferentes tratamientos contra la bacteria *E. faecalis*. En general, la distribución de las concentraciones fue muy variada. Particularmente, las AgNPs en combinación PPS mostraron un efecto inhibitorio mayor a comparación del resto de los tratamientos. Por otro lado, en el PPS el efecto inhibitorio es menor, requiriendo una mayor concentración para inhibir el crecimiento bacteriano ( $2916.66 \pm 1262.95$  µg/mL). Tanto AgNPS/PPS, PPS y AgNPs mostraron una actividad bactericida estadísticamente significativa frente a los otros grupos. Dicho lo anterior, las AgNPs combinadas mostraron en esta prueba tener un buen efecto antibacteriano a la menor concentración ( $4.179 \pm 0$  µg/mL) que el resto de los tratamientos empleados.





**Fig. 2. Placas de 96 pocillos donde se realizó prueba de CMI**  
**Cuadro rojos indican zonas donde se inhibió crecimiento bacteriano**



**Figura 3. Prueba de Concentración Mínima Inhibitoria**

PPS=Propóleo, AgNPs =Nanopartículas de Plata, CaOH= Hidróxido de calcio  
 Los signos +, @ y \* indican diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) con todos los grupos

**Cuadro 2. Concentración Mínima Inhibitoria**

Tratamiento	Concentración Mínima Inhibitoria (µg/mL)*
PPS	2916.66 ± 1262.95
AgNPs	55.72 ± 19.305
CaOH	562.5 ± 0
PPS/AgNPs	273.43 ± 0
AgNPs/PPS	4.17 ± 0
PPS/CaOH	546.875 ± 0
CaOH/PPS	785.25 ± 0
Control	0 ± 0
<i>Valor p</i>	0.003

\*Valores mostrados de promedio y desviación estándar

### 4.3 Prueba de sustantividad

En la figura 3 se observa la cinética de actividad antibacteriana de los tratamientos aplicados en la bacteria *E. faecalis* a través del tiempo (inicial, 0.5, 1, 3, 6, 8, 24, 48 y 72 horas). De manera general, se aprecia una actividad variable entre un tratamiento y otro. Específicamente, el grupo de PPS mostró una actividad antibacteriana la mayor parte del tiempo y, en comparación del grupo control ( Sin tratamiento), tuvo un crecimiento bacteriano muy bajo. Por su parte las AgNPs mostraron un crecimiento bacteriano muy a la par del grupo control. Lo anterior sugiere que PPS tienen un efecto antibacteriano prolongado (72 hrs) frente a la *E. faecalis*. Sin embargo, esta prueba no fue concluyente para el resto de los grupos, CaOH, PPS/AgNPs y PPS/CaOH ya que hubo inconvenientes técnicos para medir la turbidez.

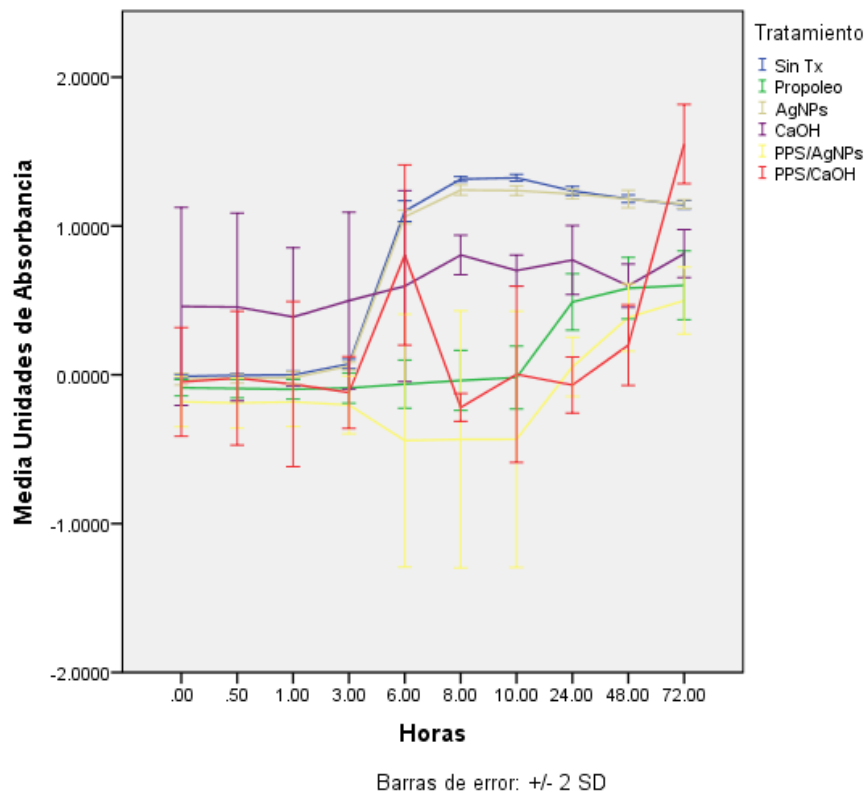


Figura 4. Prueba de sustantividad

#### 4.4 Prueba de difusión en agar

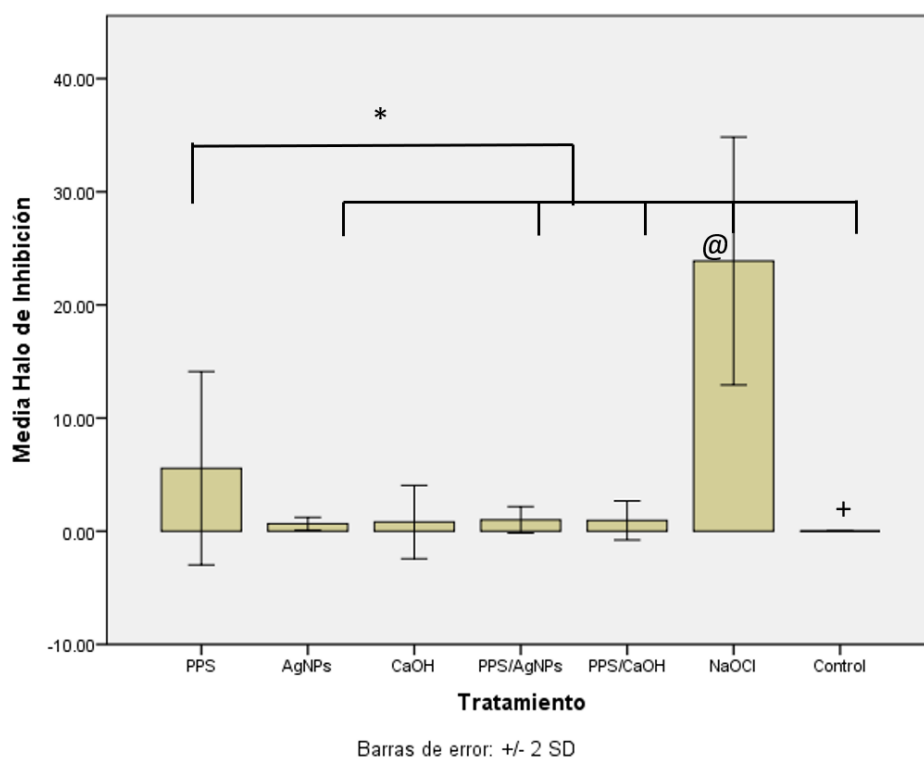
En el cuadro 3 y figuras 5 Y 6 se muestran las medidas promedios de los halos de inhibición en agar de los diferentes tratamientos. NaOCl y PPS presentaron estadísticamente mayor inhibición en comparación con el resto de los tratamientos. La combinación de PPS/AgNPs mostró un halo de inhibición más grande que las AgNPs, pero menor que el propóleo. En esta prueba se mostró que PPS/AgNPs tuvieron un mayor efecto antibacteriano que el de las AgNPs, sin embargo fue menor que el del PPS.



Figura 5. Cajas Petri donde se realizó prueba de halos de inhibición

**Cuadro 3. Resultados de halos de inhibición**

Tratamiento	Halo de Inhibición (mm)
<b>PPS</b>	5.57 ± 4.27
<b>AgNPs</b>	0.66 ± 0.28
<b>CaOH</b>	0.81 ± 1.62
<b>PPS/AgNps</b>	1 ± 0.58
<b>PPS/CaOH</b>	0.96 ± 0.43
<b>NaOCl</b>	23.89 ± 5.48
<b>Control</b>	0 ± 0
<b>Valor p</b>	0.003



**Figura 6. Resultados de halos de inhibición**

Los signos +, @ y \* indican diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) con todos los grupos

## 5. Discusión

En este estudio se evidenció que la combinación PPS/AgNPs tiene efectos bactericidas eficientes para mantener los niveles bajos de crecimiento de la bacteria *E. faecalis*. También, el efecto antimicrobiano se vio aumentada en la combinación de PPS con CaOH, mientras que cada uno de ellos tiene una actividad antibacteriana menor por separado. Estos hallazgos ayudarán a promover la búsqueda de fórmulas antimicrobianas que auxilien en el combate de las enfermedades endodónticas persistentes en las que se ve involucrada la bacteria *E. faecalis*, teniendo mayor éxito en los tratamientos de endodoncia.

Se han realizado estudios similares al presente, en los que se han comparado el efecto antibacteriano de diversas sustancias con la bacteria *E. faecalis*, entre los que se destacan el propóleo, las AgNPs y el CaOH (21-24). Un estudio evaluó el efecto antimicrobiano del propóleo en soluciones alcohólicas y el aloe vera frente a la bacteria *E. faecalis*, y este último también se puso a prueba contra *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*. Las CMI para los extractos etanólicos de propóleo, gel de aloe vera y extracto acuoso de propóleo (0% alcohol) fueron 313 µg/ml, 750 µg/ml, 2250 µg/ml y  $\geq 500$  µg/ml respectivamente, mucho más altas que las de clorhexidina. En la prueba de contacto directo, a diferencia del Aloe vera, los tres extractos de propóleo mostraron efectos antibacterianos sobre *E. faecalis*. El gel de aloe vera también mostró un efecto antibacteriano significativo sobre *S. aureus* y *S. mutans*. Los extractos hidroalcohólicos de propóleo y gel de Aloe vera tuvieron efectos antibacterianos sobre *E. faecalis*, sin embargo, el propóleo es más potente que el Aloe vera (21). En otro estudio se examinó el efecto bactericida de Pasta Doble Antibiótica (DAP), AgNPs y biovidrio multiporoso amorfo a medida

(TAMP-BG) en biofilm de tres semanas de desarrollo de *E. faecalis*, en donde los resultados mostraron que 1 mg/ml de DAP o AgNP al 0,02 % proporcionaron efectos antibiofilm significativos en en 24 horas y en 7 días (22). En un estudio se comparó el efecto del CaOH, Pasta Triple Antibiótica y Bromelina, en el cual se midió la densidad óptica (DO) de las virutas de dentina de dientes extraídos utilizando un espectrofotómetro, y se encontró que la eficiencia antimicrobiana de la bromelina es más efectiva que la pasta de Ca (OH) 2 y comparable a la de TAP contra *E. faecalis*. En el presente estudio se observó una actividad antibacteriana importante del propóleo y de la AgNPs, en donde se obtuvo inhibición de crecimiento bacteriano en ambos casos. Sin embargo, las AgNPs fueron más eficientes que el PPS, ya que la concentración requerida para inhibir a la *E. faecalis* fue menor. Lo anterior puede explicarse, ya que las AgNPs poseen un mecanismo de acción en el que su carga positiva interactúa con las paredes celulares bacterianas con carga negativa, se adhiere y penetra en la célula bacteriana, lo que provoca la pérdida de la integridad y permeabilidad de la pared celular. Las AgNP exhiben actividad antibacteriana potencial contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluidas cepas resistentes a múltiples fármacos(24). El CaOH, por su parte, en este estudio no demostró alta eficiencia en cuanto a actividad antibacteriana, tal y como se compara en el estudio descrito.

Se realizaron estudios en donde se combinaron diferentes sustancias de manera similar al presente para obtener una mayor acción antibacteriana contra diversas bacterias (17,19,25,26). En un estudio se evaluó la combinación de CaOH con PPS y el CaOH por si solo por la actividad antimicrobiana contra cultivos polimicrobianos recolectados de 16 conductos radiculares necróticos y fístulas en molares primarios de niños de 4 a 8 años de ambos sexos. La asociación entre propóleo e hidróxido de calcio resultó eficaz para controlar las infecciones dentales in vitro (25). Existen también reportes donde el PPS se combina con nanopartículas de diferentes materiales. En un estudio se realizaron nanopartículas de propóleo con quitosano y se evaluó su efecto antimicrobiano frente a *E. faecalis* en diferentes concentraciones, siendo el de 250 µL el que mostró mayor efectividad a comparación del PPS solo y una actividad antibacteriana comparable a la CHX al

2%(17). En otro estudio se midió el resultado de suturas recubiertas de propóleo y BioAgNPs al entrar en contacto con diferentes bacterias, las cuales mostraron una potente actividad antibacteriana contra bacterias patógenas gramnegativas y grampositivas, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente.(19) En nuestro estudio, la combinación de PPS /AgNPs mostró buena actividad antimicrobiana contra *e. faecalis*. Se sugiere que existe una sinergia al combinarse PPS y AgNPs. El propóleo, entre sus componentes, contiene flavonoides que pueden causar daño a la pared celular e inhibición de la función de la membrana, junto con una reducción de la producción de ATP y una disminución de la movilidad bacteriana. También se han determinado numerosos componentes químicos responsables de la actividad antibacteriana del propóleo, como pinocembrina, naringenina, pb-3-o-ac y galangina.(26).

Se pueden resaltar distintas fortalezas, en lo que se refiere al tema de investigación, ya que se encuentran reportados muy pocos artículos en los que se aplique PPS con AgNPs. También se puede destacar la fortaleza de la parte metodológica al incluir dos métodos para evaluar el efecto antimicrobiano de diferentes sustancias contra la *E. faecalis*. Asimismo las limitaciones del estudio fueron identificadas primordialmente con la ausencia de toma de muestra clínica de pacientes con alguna condición endodóntica. Además no se pudo concluir la prueba de sustentividad debido a la excesiva turbidez que mostraron los grupos de PPS/AgNPs y PPS/CaOH. Para agregar, este estudio puede recomendar el desarrollo de otros estudios que incluyan evaluaciones microbiológicas en pacientes con diagnóstico de por lo menos absceso apical crónico con o sin tratamiento de endodoncia previo, y que posteriormente se evalúen efectos antibacterianos a largo plazo, citotóxicos, biocompatibles, cicatrizantes, teratogénicos, histopatológicos, entre otros asociados al estar en contacto con las PPS/AgNPs. Aunque este estudio podría recomendar el uso potencial de PPS/AgNPs para el tratamiento del desarrollo de bacterias como *E. faecalis* en tratamientos de endodoncia realizados, principalmente; es necesario proponer protocolos de investigación que evalúen el uso seguro de las PPS/AgNPs como auxiliar en la prevención de enfermedades en piezas dentales previamente tratadas.



## 6. Conclusiones

La combinación de PPS/AgNPs utilizada en este estudio demostró actividades antimicrobianas aceptables contra la bacteria *Enterococcus faecalis*. Así mismo, se identificó una posible sinergia que potencialice el efecto antimicrobiano de las AgNPs y del PPS al combinarse entre sí que al actuar de manera individual. Hasta nuestro conocimiento, es este el primer estudio que evaluó la actividad bactericida de la combinación PPS/AgNPs contra la *E. faecalis*. Aunque PPS/AgNPs puede ser una opción complementaria para el tratamiento de enfermedades en piezas previamente tratadas endodónticamente, pps, es recomendable continuar con el desarrollo de nuevas investigaciones utilizando diferentes y mejores modelos de simulación de los conductos radiculares en condiciones clínicas para proponer manejos más predecibles y seguros.



Agradecimientos institucionales



## 7. Referencias

1. Society Of Cariology And Endodontology CS. Guidelines for Root Canal Therapy. Chin J Dent Res. 2015;18(4):213-6
2. Siqueira Junior JF, Rôças IDN, Marceliano-Alves MF, Pérez AR, Ricucci D. Unprepared root canal surface areas: causes, clinical implications, and therapeutic strategies. Braz Oral Res. 2018 Oct 18;32(supl 1)
3. Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. Irrigation in endodontics. Br Dent J. 2014 Mar;216(6):299-303.
4. Abuhaimed TS, Abou Neel EA. Sodium Hypochlorite Irrigation and Its Effect on Bond Strength to Dentin. Biomed Res Int. 2017;2017:1930360.

5. Bhandi S, Mehta D, Mashyakh M, et al. Antimicrobial Efficacy of Silver Nanoparticles as Root Canal Irrigant's: A Systematic Review. *J Clin Med.* 2021;10(6):1152
6. Ruksakiet K, Hanák L, Farkas N, Hegyi P, Sadaeng W, Czumbel LM, Sang-Ngoen T, Garami A, Mikó A, Varga G, Lohinai Z. Antimicrobial Efficacy of Chlorhexidine and Sodium Hypochlorite in Root Canal Disinfection: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *J Endod.* 2020 Aug;46(8):1032-1041
7. Álvarez-Sagües A, Herce N, Amador U, Llinares-Pinel F, Nistal-Villan E, Presa J, Álvarez L, Azabal M. Efficacy of EDTA and HEDP Chelators in the Removal of Mature Biofilm of *Enterococcus faecalis* by PUI and XPF File Activation. *Dent J (Basel).* 2021 Apr 9;9(4):41
8. Ibrahim AM, Zakhary SY, Amin SAW. Calcium hydroxide intracanal medication effects on pain and flare-up: a systematic review and meta-analysis. *Restor Dent Endod.* 2020 May 22;45(3):e26.
9. Kim D, Kim E. Antimicrobial effect of calcium hydroxide as an intracanal medicament in root canal treatment: a literature review - Part I. In vitro studies. *Restor Dent Endod.* 2014 Nov;39(4):241-52.
10. Valverde ME, Baca P, Ceballos L, Fuentes MV, Ruiz-Linares M, Ferrer-Luque CM. Antibacterial efficacy of several intracanal medicaments for endodontic therapy. *Dent Mater J.* 2017 May 31;36(3):319-324.
11. Vasudeva A, Sinha DJ, Tyagi SP, Singh NN, Garg P, Upadhyay D. Disinfection of dentinal tubules with 2% Chlorhexidine gel, Calcium hydroxide and herbal intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*: An in-vitro study. *Singapore Dent J.* 2017 Dec;38:39-44
12. Ahangari Z, Naseri M, Vatandoost F. Propolis: Chemical Composition and Its Applications in Endodontics. *Iran Endod J.* 2018;13(3):285-292. doi:10.22037/iej.v13i3.20994
13. Oncu A, Huang Y, Amasya G, Sevimay FS, Orhan K, Celikten B. Silver nanoparticles in endodontics: recent developments and applications. *Restor Dent Endod.* 2021 Jul 1;46(3):e38

14. Parolia A, Kumar H, Ramamurthy S, Madheswaran T, Davamani F, Pichika MR, Mak KK, Fawzy AS, Daood U, Pau A. Effect of Propolis Nanoparticles against *Enterococcus faecalis* Biofilm in the Root Canal. *Molecules*. 2021 Jan 30;26(3):715.
15. Al-Shaher A, Wallace J, Agarwal S, Bretz W, Baugh D. Effect of propolis on human fibroblasts from the pulp and periodontal ligament. *J Endod*. 2004 May; 30(5):359-61.
16. Parolia A, Kundabala M, Rao NN, Acharya SR, Agrawal P, Mohan M, Thomas M. A comparative histological analysis of human pulp following direct pulp capping with Propolis, mineral trioxide aggregate and Dycal. *Aust Dent J*. 2010 Mar; 55(1):59-64.
17. Parolia A, Kumar H, Ramamurthy S, Davamani F, Pau A. Effectiveness of chitosan-propolis nanoparticle against *Enterococcus faecalis* biofilms in the root canal. *BMC Oral Health*. 2020 Nov 25;20(1):339
18. Halkai KR, Halkai R, Mudda JA, Shivanna V, Rathod V. Antibiofilm efficacy of biosynthesized silver nanoparticles against endodontic-periodontal pathogens: An in vitro study. *J Conserv Dent*. 2018 Nov-Dec;21(6):662-666
19. Baygar T. Characterization of silk sutures coated with propolis and biogenic silver nanoparticles (AgNPs); an eco-friendly solution with wound healing potential against surgical site infections (SSIs). *Turk J Med Sci*. 2020;50(1):258-266.
20. Adomavičiūtė E, Stanys S, Žilnius M, Juškaitė V, Pavilionis A, Briedis V. Formation and Biopharmaceutical Characterization of Electrospun PVP Mats with Propolis and Silver Nanoparticles for Fast Releasing Wound Dressing. *Biomed Res Int*. 2016;2016:4648287
21. Ehsani M, Amin Marashi M, Zabihi E, Issazadeh M, Khafri S. A Comparison between Antibacterial Activity of Propolis and Aloe vera on *Enterococcus faecalis* (an In Vitro Study). *Int J Mol Cell Med*. 2013 Summer;2(3):110-6
22. Sadek RW, Moussa SM, El Backly RM, Hammouda AF. Evaluation of the Efficacy of Three Antimicrobial Agents Used for Regenerative Endodontics: An In Vitro Study. *Microb Drug Resist*. 2019 Jun;25(5):761-771.

23. Chandwani ND, Maurya N, Nikhade P, Chandwani J. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of calcium hydroxide, triple antibiotic paste and bromelain against *Enterococcus faecalis*: An In Vitro study. *J Conserv Dent.* 2022 Jan-Feb;25(1):63-67
24. Halkai KR, Mudda JA, Shivanna V, Rathod V, Halkai R. Antibacterial Efficacy of Biosynthesized Silver Nanoparticles against *Enterococcus faecalis* Biofilm: An in vitro Study. *Contemp Clin Dent.* 2018 Apr-Jun;9(2):237-241.
25. Valencia D. Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Seasonal Samples of Sonoran Desert Propolis: Evaluation of Its Antibacterial Activity against Clinical Isolates of Multi-Drug Resistant Bacteria. *Pharmaceutics.* 2022 Sep 2;14(9):1853.