

31441  
2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

IZTACALA

ESPECIALIZACIÓN EN ENDOPERIODONTOLOGIA

" DETERMINACIÓN DE CRECIMIENTO BACTERIANO Y PH DEL CEMENTO PÓRTLAND. ESTUDIO PRELIMINAR "

C.D. JOSÉ ELÍAS FLORES BOTELLO

C.D. JUAN CARLOS MALDONADO GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS

DR. EDUARDO LLAMOSAS HERNÁNDEZ

ASESORES

BIÓLOGO LUCIANO HERNÁNDEZ GÓMEZ

QFB. MA. ANTONIETA SILVA CHÁVEZ

ESP. EN ENDOP. ALBERTO TAKETOSHI FURUYA  
MEGURO

TRABAJO DE TESIS PARA OBTENER DIPLOMA DE  
ESPECIALIZACIÓN EN ENDOPERIODONTOLOGIA



IZTACALA

JUNIO DE 2002

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Prométele a ti mismo*

*Ser tan fuerte que nada pueda turbar la paz de tu mente.*

*Hablar a todos de salud, felicidad y prosperidad.*

*Hacer que los demás sientan siempre que hay algo bueno en ellos.*

*Mirar siempre hacia el lado luminoso de las cosas y hacer que tu optimismo se realice.*

*Pensar sólo en lo mejor y esperar sólo lo mejor.*

*Olvidar los errores del pasado y luchar por las grandes consecuencias del futuro.*

*Sonreír siempre y que tu sonrisa sea para todos.*

*Dedicar tanto tiempo a tu adelanto personal que no te quede un momento para encontrar un defecto en los demás.*

*Ser suficientemente tolerante, firme y generoso para combatir la pesadumbre, la pasión y el miedo, y suficientemente feliz para no permitir la presencia de la inquietud.*

*Con dedicatoria especial:*

*Para ti Mamá, por toda una vida llena de esfuerzos y sacrificios, por ser una madre siempre ejemplar, por transmitirnos ese espíritu de lucha constante y por enseñarnos los valores que nos permiten a mis hermanos y a mí tener el carácter para levantarnos victoriosos después de cada tropiezo.*

*Para mis hermanos: Manuel, Lourdes, Paty, Graciela, Sandra y José Luis, a quienes adoro, gracias por su apoyo en todo momento.*

*Para ti Adriana, por tu paciencia, comprensión, compañía y apoyo en las etapas difíciles... ¡ Gracias amor !.*

*Más que un agradecimiento, una felicitación, para ti Elías, que demostraste ser un gran compañero de tesis, por tu constancia y por tu esfuerzo, gracias por ser un gran amigo.*

*Y hablando de amigos, también con dedicatoria para ellos (as) que me han brindado su amistad y su apoyo en todo momento.*

*Un agradecimiento y dedicación particular para el Doctor Alberto Juruya, quien más allá de fungir como mi tutor, fue un apoyo fundamental durante la etapa de especialización y en la elaboración de la presente investigación.*

*Juan Carlos*

*Junio de 2002*

*Con dedicatoria especial :*

*Para ustedes Doña Ma. Elena y Don Héctor porque como padres, han sabido educar y fomentar la superación personal, el respeto y amor por lo que haces, con su ayuda ha sido posible. ¡ Gracias por darme la vida!. Con su ejemplo seguiré adelante.*

*A mis queridas hermanas (os): Mely, Toño, Chepina, David, Martha, Lupita, Jesús, Angélica, Raymundo, Bety, Giovany, ejemplos del esfuerzo y superación cotidianos.*

*Al doctor Juan Carlos, compartir los años de la especialidad ha sido muy bueno, compartir estos meses de investigación del presente trabajo han sido excelentes, fortaleciendo los lazos de amistad, y sobre todo agradezco el que hayas tenido paciencia y disposición para compartir tus conocimientos, esto es invaluable, ¡ Muchas gracias amigo !.*

*José Elías*

*Los Cirujanos Dentistas José Elías Flores Botello y Juan Carlos Maldonado García agradecemos de manera infinita a:*

*El doctor Eduardo Blamosas Hernández por su invaluable dirección, su calidad humana, su don del conocimiento y experiencia profesional; además de la confianza depositada en nosotros que han permitido realizar la presente investigación.*

*A los maestros Luciano Hernández Gómez y Ma. Antonieta Silva Chávez, a quienes les damos las gracias por compartir sus conocimientos y experiencias, y que con su dedicación y empeño han permitido lograr con su excelente asesoría esta investigación.*

*Asimismo agradecemos a todo el equipo de trabajo del Cepario de la Facultad de Química de la UNAM, por su invaluable apoyo y su incomparable amistad.*

*A los profesores de Endoperiodontología que se encargaron de transmitirnos sus conocimientos y la confianza para poder adquirirlos, ya que de esta manera procuran formar mejores especialistas*

# INDICE

MARCO TEÓRICO	1
OBJETIVOS GENERALES	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
HIPÓTESIS	10
DISEÑO METODOLÓGICO	11
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	13
<b><i>FASE EXPERIMENTAL</i></b>	
1. Hidratación de cepas liofilizadas	13
2. Comprobación de pureza, estabilidad y viabilidad de cepas bacterianas	13
3. Elaboración de cajas Petri con cemento Pórtland en gradiente	14
4. Siembra bacteriana masiva en cajas experimental y control	14
<b><i>Cuantificación de microorganismos</i></b>	
5. Concentraciones de cemento Pórtland en medios de caldo Casoy para la observación de la inhibición bacteriana	15
6. Recuento de células viables (método de dilución seriada y vaciado en placa)	15
7. Conteo de Unidades Formadoras de Colonias	16
8. Valoración de pH del cemento Pórtland	16
9. Evaluación del efecto del pH sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Streptococcus faecalis</i>	17
10. Cuantificación de microorganismos viables	17
RESULTADOS	18
ANÁLISIS DE RESULTADOS	28
CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFÍA	31
APENDICES	

## MARCO TEORICO

Uno de los objetivos de la Endoperiodontología es la conservación y el mantenimiento en condiciones de salud de los tejidos dentales, lo cual es esencial para que se lleven a cabo adecuadamente las funciones del aparato estomatognático.

Los procesos patológicos, la reparación y regeneración de dichos tejidos, así como su restauración por medio de materiales dentales requiere de un amplio conocimiento de la naturaleza biológica y anatómica de los componentes del complejo endoperiodontal<sup>1</sup> De los cuales se realizará una breve descripción.

El complejo Endoperiodontal está constituido por el esmalte, la dentina, la pulpa (fig. 1) y los tejidos periodontales: encía, cemento radicular, ligamento periodontal y hueso alveolar (fig 2); es considerado como un complejo porque todos sus elementos tienen una estrecha interrelación anatómica e interdependencia fisiológica.

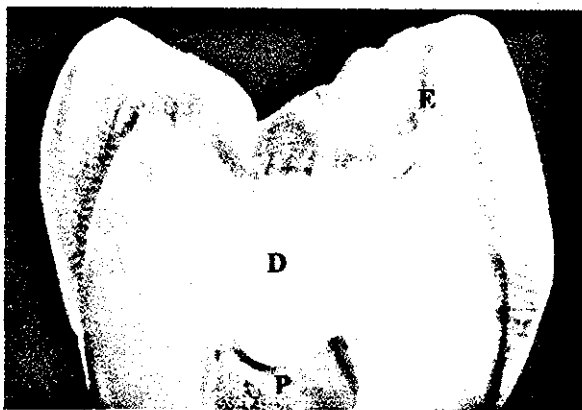


Fig. 1 Tejidos del diente: esmalte (E), dentina (D) y pulpa (P).

El esmalte provee una estructura dura y resistente para las funciones que realizan los dientes, y representa además una capa protectora para la dentina y la pulpa.<sup>1</sup>

El esmalte maduro contiene 90 % de mineral inorgánico ( calcio, fosforo apatita ) pequeñas cantidades de matriz orgánica y de 4 a 12 % de agua; esta última está contenida en los espacios intercrystalinos y en una red de microporos que forman una dinámica conexión entre la cavidad bucal y el sistema de fluidos de la pulpa y los túbulos dentinarios<sup>1</sup>.

Comparado con otros tejidos el esmalte maduro es considerado único ya que su reparación o reemplazo sólo es posible a través de materiales sintéticos dentales, por lo tanto, una vez que resulta dañado no se regenera<sup>1</sup>.



La dentina constituye la masa del diente y proporciona en su parte coronal, una base elástica para el frágil esmalte y junto con la dentina radicular, que a su vez está cubierta por el cemento, proveen protección a la pulpa<sup>1,2</sup>

La dentina a diferencia del esmalte, que es un tejido acelular y predominantemente mineralizado, está estructurada por cristales de apatita inorgánica incrustados en enlaces cruzados de matriz orgánica de fibrillas colágenas; tiene un volumen de 45 a 50 % de dichos cristales, aproximadamente 30 % de matriz orgánica y cerca de 25 % de agua<sup>1</sup>.

Entre sus principales componentes estructurales se encuentran los odontoblastos, que son las células que se encargan de originar la dentina<sup>1,2</sup>.

La dentina que se forma desde el inicio del desarrollo del diente hasta que termina de formarse la raíz completa se le denomina dentina primaria; posterior a este desarrollo se lleva a cabo la formación de la dentina que constriñirá las dimensiones de la cámara pulpar y se le conoce como dentina secundaria<sup>1,2</sup>.

Existe un tercer tipo de dentina que se forma en respuesta a irritantes externos (caries, exposición mecánica de la dentina, traumatismos, etc.); llamada dentina terciaria, reparativa, reactiva, de respuesta o secundaria irregular<sup>1,2</sup>.

De manera que la dentina es un tejido que logra su reparación a través de la continua formación fisiológica, ya sea de forma regular o irregular, con lo cual logra proteger a los componentes estructurales de la pulpa<sup>1</sup>.

La pulpa dental por su parte, se considera como un órgano muy especial debido a que ésta se encuentra dentro de un entorno constituido por paredes rígidas de dentina y de esmalte que la separan físicamente de los irritantes externos<sup>3</sup>.

La pulpa está compuesta por tejido conectivo laxo y como tal desempeña cuatro funciones básicas: formativa, nutritiva, nerviosa y defensiva. Las cuales guardan una estrecha relación con su autoprotección y reparación<sup>3</sup>.

La formación de la dentina es la primera función de la pulpa, tanto en secuencia como en importancia, y continúa haciéndolo durante toda la vida del diente<sup>4</sup>.

Su función nutritiva la lleva a cabo a través de su sistema vascular, el cual nutre a todos los elementos vitales del complejo pulpodentinario. La función nerviosa se debe a la presencia de nervios motores y sensitivos que desempeñan un papel esencial en la transmisión del dolor y el control (vasomotor) de los vasos sanguíneos<sup>1,3,4</sup>.

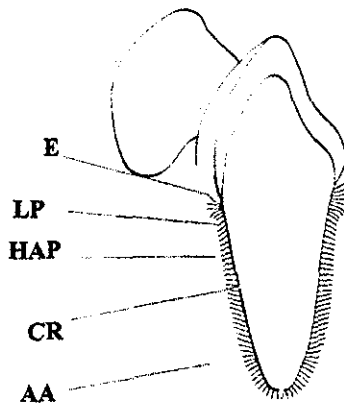
Por último, la pulpa cumple una función también de vital importancia y cuyo objetivo es su preservación anatómica y fisiológica, ésta es la función defensiva, y la logra a través de la continua formación de dentina de irritación o reparativa, o por medio de la inflamación del tejido conectivo subyacente; ambas formas de defensa protegen a la pulpa misma de los irritantes físicos, químicos y microbianos perjudiciales<sup>3,4</sup>.

La pulpa dental dispone además de una irrigación muy rica que obtiene principalmente a través del foramen apical y en menor medida de los conductos accesorios que presenta cada uno de los dientes. Este sistema de conductos radiculares, además de permitir la innervación e irrigación de la pulpa, también son una vía importante de comunicación con los tejidos periodontales<sup>3,5</sup>.

La primera relación de la pulpa con el periodonto se establece entre el tejido conectivo de ambas regiones, porque así como el tejido conectivo de la pulpa se anastomosa con el tejido intersticial del ligamento periodontal a nivel de la unión del agujero apical del conducto radicular, también los conductos laterales albergan normalmente tejido conectivo y vasos que conectan el sistema circulatorio de la pulpa con el del ligamento periodontal; esas anastomosis se forman durante las fases tempranas del desarrollo dentario<sup>6</sup>

Por su parte, el periodonto es considerado como una unidad funcional, biológica y evolutiva, cuya función principal es unir el diente al tejido óseo de los maxilares<sup>6</sup>. Sin embargo, no es una unidad independiente ya que su fisiología permite una relación biológica con la dentina y la pulpa.

Fig. 2 Tejidos periodontales: encía (E), ligamento periodontal (LP), hueso alveolar propio (HAP), cemento radicular (CR) y apófisis alveolar (AA).



El cemento radicular tiene un buen potencial reparador debido a la presencia de su tejido formativo, el ligamento periodontal. La continua formación de dentina depende de la conservación de la pulpa, pero cuando el tejido pulpar es removido o destruido, la capacidad reparadora de la dentina ante el daño quirúrgico o reabsortivo depende de la presencia de cemento; por otra parte, el ligamento periodontal es el tejido más metabólicamente activo y por lo tanto, el más eficiente, ya que es capaz de originar la regeneración del hueso alveolar, del cemento radicular y de sí mismo<sup>7</sup>.

Esta interdependencia fisiológica y el hecho de que el periodonto esté anatómicamente relacionado con la pulpa dental por medio de los forámenes apicales y conductos laterales permite las vías de intercambio nocivos cuando uno o ambos tejidos están enfermos<sup>6</sup>.

Por lo tanto, la conservación de la pulpa en condiciones de salud puede dar como resultado el mantenimiento de la integridad del periodonto y viceversa.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Sin embargo, cualquier pérdida de integridad tisular que exponga directamente la dentina o la pulpa puede permitir que las bacterias y los componentes bacterianos del medio bucal afecten el estado normal de la pulpa y con ello lograr la interrupción de sus actividades fisiológicas

Esta invasión microbiana puede producirse por vía coronaria o radicular, ya sea por procesos cariosos, por fracturas, procedimientos restauradores, traumatismos dentales o a través de trayectos anatómicos anómalos<sup>4</sup>.

De acuerdo con algunos estudios se ha demostrado que sin la intervención microbiana, la lesión inflamatoria resultante en la pulpa estaría dirigida entonces a la fuente de irritación y estará confinada hasta que se lleve a cabo la reparación y cicatrización de los tejidos<sup>8</sup>. De tal manera que todos aquellos procesos o procedimientos que provoquen una contaminación microbiana masiva va a dar como resultado el desencadenamiento y el mantenimiento de una reacción inflamatoria que durante su progresión puede diseminarse y provocar daños en los tejidos periodontales<sup>5,9</sup>.

Existen varios factores que son capaces de ocasionar tal contaminación, algunos de ellos ya mencionados, pero sin duda que uno de los factores que puede provocar una contaminación microbiana masiva directa, y no sólo en el tejido pulpar sino también en el periodonto es, la perforación endodóntica (fig 3).

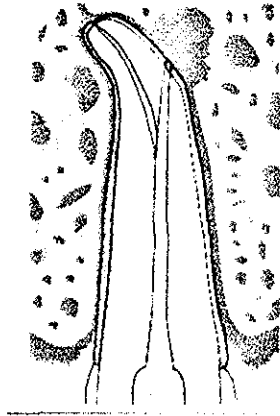


Fig 3. Perforación endodóntica

Las perforaciones endodónticas o yatrogénicas son procedimientos accidentales que se producen durante la búsqueda de los orificios de los conductos en el piso de la cámara pulpar en dientes multirradiculares, cuando se realiza la instrumentación biomecánica de los conductos radiculares o en el proceso de preparación de un endoposte<sup>10</sup>.

Las perforaciones yatrogénicas representan un factor de riesgo muy importante para los tejidos periodontales, ya que por un lado provocan una respuesta inflamatoria, y por otro, permiten la diseminación de microorganismos directamente de los conductos radiculares (fig 4), lo que favorece la perpetuación del mecanismo inflamatorio, trayendo como consecuencia una serie de

eventos tales como: formación de tejido granulomatoso, destrucción de fibras periodontales, proliferación de epitelio, y por último el desarrollo de una bolsa periodontal, situación que favorece otra vía de entrada de microorganismos<sup>10,11</sup>.

Es bien conocido que los microorganismos de la cavidad bucal son los principales irritantes de los tejidos pulpar y periodontales, sin embargo, no todos ellos representan un peligro potencial para dichos tejidos. De todas las especies que habitan en la microflora bucal, solo las bacterianas son de particular interés en el área endoperiodontal.

Existe un hecho que es particularmente significativo en las lesiones endodónticas y periodontales, el tipo de bacterias tanto de uno como de otro medio ambiente, comprenden bacterias aerobias y anaerobias, facultativas y estrictas, predominando estas últimas en lesiones ya establecidas<sup>4,6,9</sup>.

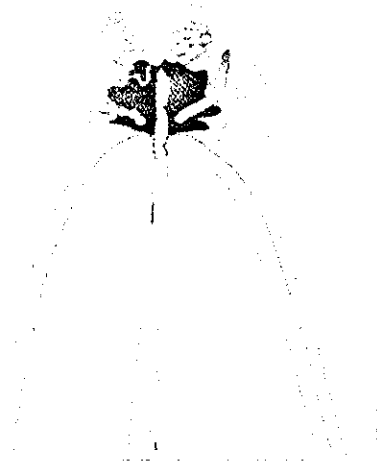


Fig. 4. Diseminación bacteriana hacia los tejidos del periodonto apical.

La razón para que exista colonización inicial por bacterias aerobias es favorecida por el medio ambiente rico en oxígeno, elemento ideal para el crecimiento de este tipo de bacterias; la transición hacia bacterias anaerobias facultativas y posteriormente a anaerobias estrictas se da por diferentes factores: las bacterias tienen enzimas que utilizan el oxígeno y dan origen a diferentes compuestos químicos, incluyendo sustancias tóxicas, el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno; estos dos compuestos reaccionan luego con el agua para formar el radical hidroxilo. Todas estas sustancias son dañinas para las células debido a sus reacciones con lípidos, ácidos nucleicos y proteínas<sup>4,9,12</sup>.

Estos cambios en el medio ambiente disminuyen la tensión de oxígeno, favorecen un entorno rico en bióxido de carbono que ayuda al crecimiento de bacterias anaerobias; esto aunado a la presencia de nutrientes presentes en los líquidos tisulares, como los originados por la destrucción

de las células del tejido conjuntivo, crean un entorno apto para el desarrollo de microorganismos exigentes, tales como los microorganismos anaerobios estrictos<sup>4,9,12</sup>.

Las bacterias por lo tanto, tienen diversas características que independientemente de los elementos que requieren para llevar a cabo su metabolismo y sobrevivencia, crean condiciones que permiten el desarrollo de otras especies bacterianas, complicando de esta manera el proceso patológico y en muchas ocasiones su tratamiento<sup>4</sup>.

De tal manera que tanto las bacterias aerobias como las anaerobias son de vital importancia en las lesiones del complejo endoperiodontal, ya que ambas interactúan de alguna manera a la invasión y propagación de las mismas. Algunas especies como *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus* son resistentes a los agentes antibacterianos y en ocasiones resulta difícil erradicarlas, otras sintetizan productos que pueden modificar el equilibrio del proceso infeccioso a favor del microorganismo invasor con productos como toxinas, cápsulas, irritantes metabólicos y enzimas extracelulares (colagenasa, proteasa, cinasas, etc.) que estimulan la respuesta inflamatoria y los procesos catabólicos tales como destrucción de colágena y hueso. Y algunas otras pueden establecer infecciones en sitios distantes al diente mediante extensiones hacia los planos faciales o a través del desarrollo de bacteriemia<sup>4</sup>.

Dadas estas condiciones, el principal objetivo después de una perforación endodóntica es, crear un entorno adecuado para que se pueda llevar a cabo una reparación biológica de los tejidos periodontales. Este proceso implica la supresión total del tejido enfermo o necrosado presente en el conducto radicular y la exclusión de la infección bacteriana, de sus productos y de los sustratos que precisan para desarrollarse, así como de un medio ambiente que impida la reinfección<sup>3,6</sup>.

De otra manera el proceso patológico podría dirigir a la pérdida de inserción periodontal, al fracaso del tratamiento endodóntico y posiblemente a la pérdida del diente.

El pronóstico de un diente con perforación radicular depende de la severidad del daño inicial a los tejidos periodontales, al tamaño de la perforación, la localización en relación al surco gingival, el lapso de tiempo entre el daño y la reparación, y la accesibilidad para llevar a cabo el sellado<sup>10,14</sup>.

Estudios clínicos han indicado que las perforaciones endodónticas pueden ser exitosamente tratadas con medios convencionales, lo cual ha podido ser corroborado con estudios histológicos en los cuales se han determinado altas tasas de reparación tisular en el sitio perforado, esto se atribuye principalmente a la ausencia de contaminación bacteriana y a la biocompatibilidad de material de sellado<sup>15</sup>.

Para el sellado de las perforaciones se han ideado muchos materiales, los cuales debido a que llegan a estar en contacto con tejidos vitales deben poseer ciertas características o cualidades que les impidan ocasionar un daño mayor a estos tejidos, por lo tanto deben ser: Bacteriostáticos o al menos no favorecer el crecimiento de los microorganismos, biocompatibles, capaces de proveer un sellado adecuado y de favorecer la regeneración de los tejidos involucrados. También deben ser radiopacos, no reabsorbibles y no tóxicos<sup>5,14,16</sup>.

Los materiales sugeridos para el sellado de perforaciones son: la amalgama, cementos de óxido de zinc y eugenol ( Super EBA[ácido ó-tioxibenzoico] e IRM [Material de Restauración Intermedio] ), pastas de hidróxido de calcio, gutapercha, cavit, resinas y cementos de ionómero de vidrio<sup>5,10,16,17</sup>.

Sin embargo se ha reportado que ninguno de ellos favorece o crea condiciones necesarias para el reestablecimiento predecible de la arquitectura normal de los tejidos periodontales en el sitio de la perforación, ya que la mayoría de los materiales hasta ahora utilizados presentan algunas desventajas, entre las principales se consideran: la microfiltración, cierta toxicidad de grado variable y sensibilidad a la presencia de humedad, lo cual favorece el mantenimiento de la inflamación y la infección<sup>5,10,17,18</sup>.

Con el afán de desarrollar nuevos materiales se ha sugerido un material llamado Mineral Trióxido Agregado (MTA) como un compuesto potencial para el sellado tanto del extremo radicular como de las perforaciones entre el sistema de conductos radiculares y la superficie externa del diente<sup>17,18,19</sup>.

El MTA es un polvo cuya composición no está publicada, pero se conocen sus principales componentes: Silicato tricálcico, Aluminato tricálcico, Óxido tricálcico, Óxido de silicato y otros óxidos minerales no identificados. El MTA contienen partículas hidrofílicas finas que fraguan en presencia de humedad dando como resultado un gel coloidal con un pH de 12.5. Este gel solidifica en menos de 4 horas, su resistencia a la compresión es de 70 Mpa (Kg/cm<sup>2</sup>), que es comparable con la del IRM y Super EBA, pero significativamente menor que la de la amalgama (311 Mpa)<sup>5,17,20</sup>.

El MTA se ha investigado en una serie de experimentos *in vitro* e *in vivo* y se ha evaluado en diferentes pruebas para conocer sus propiedades.

Las pruebas *in vivo* demuestran que el MTA es un material biocompatible, que no favorece la inflamación al estar en contacto con el tejido conectivo; y que además induce la formación de cemento radicular a pesar de su extrusión en los tejidos periodontales, incluso se ha llegado a formar sobre el MTA<sup>10,20,21</sup>. Por otro lado, las pruebas *in vitro* han permitido conocer otras propiedades que han podido ser comparadas con las de otros materiales de uso común en el sellado de perforaciones.

Una de las características que ha sido comparada ampliamente es la capacidad en el sellado marginal, los experimentos hasta ahora realizados demuestran que la calidad de sellado por parte del MTA en estudios de filtración bacteriana y de colorantes, resulta ser superior a la obtenida con la amalgama, super EBA e IRM. Se cree que esta propiedad se debe a la naturaleza hidrofílica del MTA y a la ligera expansión que se produce cuando fragua en un medio ambiente húmedo, incluso en presencia de fluido sanguíneo, el cual no afecta dicho fraguado<sup>5,18,21</sup>.

Se ha demostrado también que el MTA tiene propiedades antibacterianas sobre algunas bacterias de la cavidad bucal entre ellas anaerobias facultativas. Los resultados de estudios de filtración bacteriana demuestran que el MTA tanto fresco como solidificado tiene efectos antibacterianos contra estos microorganismos; se ha observado también que el MTA endurecido tiene menos efectos antibacterianos que su contraparte fresca, sin embargo a pesar de ello, una vez endurecido el MTA presenta impermeabilidad bacteriana. Esto parece indicar que el MTA actúa inicialmente como agente antibacteriano debido a que cuando esta fresco tiene dicha capacidad, pero cuando solidifica sigue impidiendo el paso de bacterias y sus productos aún bajo condiciones severas de contaminación, debido a su capacidad de sellado marginal. Lo cual crea condiciones favorables para la regeneración de los tejidos periodontales<sup>15,22</sup>.

Estos resultados aunados a su capacidad de estimular la formación de un puente dentinario adyacente a la pulpa dental hacen pensar que tienen mecanismo similar al del hidróxido de calcio<sup>5</sup>.

Sin embargo aún se desconoce la explicación a estos fenómenos ya que el MTA no tiene hidróxido de calcio en su composición<sup>5</sup>.

Se deduce que las propiedades físicas y químicas del MTA se deben a su composición y a las diferentes fases que se suceden durante el proceso de endurecimiento, durante éste el MTA se divide en óxido y fosfato de calcio, posteriormente aparece como discretos cristales y más tarde como una estructura amorfa. El valor significativo de los prismas es de 87% de calcio y 2.7% de silicio, mientras que el remanente es oxígeno. En las áreas de estructura amorfa parece haber 49% de fosfato, 33% de calcio, 6% de silicio, 3% de cloro y 2% de carbono<sup>19</sup>.

Se cree que el óxido de calcio podría reaccionar con los fluidos del tejido para formar hidróxido de calcio, y de esta manera estimular la deposición de cristales de calcio para la formación de un tejido duro<sup>19</sup>.

Sin conocer completamente el mecanismo de acción del MTA, es un hecho que este material posee un pH muy alcalino, el cual contribuye por un lado a la reducción de factores microbianos, y por otro a estimular la dentinogénesis y la cementogénesis<sup>5,10</sup>.

De tal manera que el MTA se postula como el material ideal para el sellado de perforaciones, así como para otras aplicaciones clínicas; por sus propiedades superiores a las de otros materiales y otras características no mostradas por algunos de ellos.

No obstante a pesar del éxito clínico e histológico, el MTA aún se considera un producto de alto costo y de difícil disponibilidad.

Recientemente se ha señalado la existencia de un material que es similar química y físicamente al MTA, sólo que de más bajo costo y de fácil obtención. Este es el cemento Portland, un material de uso común en la industria de la construcción<sup>24</sup>.

El cemento Portland es un producto cerámico que tiene la capacidad de desarrollar resistencia y endurecerse en presencia de agua<sup>25</sup>.

Y efectivamente el cemento Portland guarda similitudes con el MTA, químicamente tiene cuatro compuestos principales que constituyen más del 90% del cemento: Silicato tricálcico, Silicato dicálcico, Aluminato tricálcico y Ferroatuminato tetracálcico<sup>25,26</sup>. Dos de los compuestos son los mismos que el MTA.

Físicamente el cemento Portland es un polvo fino que al mezclarse con agua forma una pasta, la cual es plástica temporalmente, lo que permite moldearla; su fraguado inicial es a los 45 minutos y endurece completamente en menos de 7 horas para formar una masa compacta<sup>26</sup>.

Para conocer su biocompatibilidad se realizó un estudio, en el cual fueron cultivadas células semejantes a osteoblastos (MG63) en presencia de MTA y de cemento Portland: A las 4 y 6 semanas los cultivos mostraron que ambos materiales estimulan la formación de matriz en una forma similar<sup>24</sup>.

En otro estudio se ensayaron MTA y cemento Portland como materiales de recubrimiento pulpar directo en pulpas estériles de ratas y los resultados obtenidos después del examen microscópico fueron muy similares. Se observó la aposición de dentina en algunos casos, tanto al inicio como 2 semanas después<sup>24</sup>.

Estas observaciones preliminares acerca del cemento Pórtland, sugieren que puede ser un material alternativo al MTA, sin embargo los estudios acerca del cemento Pórtland aún son muy escasos, por lo que se desconoce si este cemento tiene otras propiedades, una de ellas, la capacidad antibacteriana, requisito importante que debe poseer cualquier material que pretenda ser utilizado como sellador de perforaciones, ya que una de las condiciones que se requiere para la reparación de los tejidos es la ausencia de bacterias y sus componentes.

El cemento Pórtland a diferencia del MTA presenta una reacción química perfectamente identificada, cuyos productos son significativamente importantes

Al hidratarse con el agua, los componentes básicos del cemento se transforman en dos nuevos compuestos: El gel de Tobermorita ( denominado así por su composición y estructura semejantes a la de un mineral natural, llamado tobermorita, descubierto en Tobermory, Escocia ), este gel es un compuesto cristalino que constituye el 50% del peso del cemento Su función es ligar o aglutinar entre sí a todos los componentes del cemento Pórtland<sup>25</sup>.

El otro compuesto producido y que representa el 25% del peso del cemento es el Hidróxido de calcio.<sup>25</sup>

El hidróxido de calcio en el área endodóntica es considerado un agente antimicrobiano Se ha demostrado ampliamente su eficacia clínica en la eliminación de microorganismos del espacio del conducto radicular. Basa su actividad antibacteriana en su potente alcalinidad con un pH aproximado a 12.5, el cual explica su efecto destructor de las membranas y estructuras proteínicas de la célula bacteriana Pocas bacterias pueden sobrevivir a este pH<sup>4</sup>.

Tiene actividad antibacteriana contra la mayoría de microorganismos aerobios Gram (+) y anaerobios Gram (-), es ineficaz contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis*<sup>27</sup>.

Basados en la premisa de que el cemento Pórtland al hidratarse produce hidróxido de calcio, se cree que el cemento además de poseer un pH similar al hidróxido de calcio, tiene la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano de microorganismos que colonizan comúnmente los conductos radiculares.



## OBJETIVOS GENERALES

- ❑ Evaluar la capacidad antibacteriana del cemento Pórtland.
- ❑ Relacionar el pH del cemento Pórtland con la capacidad antibacteriana.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ❑ Determinar la capacidad antibacteriana del cemento Pórtland en algunas especies bacterianas que llegan a colonizar los conductos radiculares.
- ❑ Conocer la acción bacteriostática o bactericida del cemento Pórtland sobre *Pseudomonas aeruginosa*.
- ❑ Conocer la acción bacteriostática o bactericida del cemento Pórtland sobre *Streptococcus faecalis*.
- ❑ Medir el pH del cemento Pórtland hidratado.
- ❑ Conocer si existe relación del pH del cemento Pórtland sobre el desarrollo de los microorganismos *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus faecalis*.

## HIPÓTESIS

- 1.- Si el cemento Pórtland tiene capacidad antibacteriana, inhibirá el crecimiento de algunas especies bacterianas que llegan a colonizar los conductos radiculares.
- 2.- Si el cemento Pórtland posee un pH alcalino, tendrá capacidad antibacteriana contra especies que llegan a colonizar los conductos radiculares.

## OBJETIVOS GENERALES

- Evaluar la capacidad antibacteriana del cemento Pórtland.
- Relacionar el pH del cemento Pórtland con la capacidad antibacteriana.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la capacidad antibacteriana del cemento Pórtland en algunas especies bacterianas que llegan a colonizar los conductos radiculares.
- Conocer la acción bacteriostática o bactericida del cemento Pórtland sobre *Pseudomonas aeruginosa*.
- Conocer la acción bacteriostática o bactericida del cemento Pórtland sobre *Streptococcus faecalis*.
- Medir el pH del cemento Pórtland hidratado.
- Conocer si existe relación del pH del cemento Pórtland sobre el desarrollo de los microorganismos *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus faecalis*.

## HIPÓTESIS

- 1.- Si el cemento Pórtland tiene capacidad antibacteriana, inhibirá el crecimiento de algunas especies bacterianas que llegan a colonizar los conductos radiculares.
- 2.- Si el cemento Pórtland posee un pH alcalino, tendrá capacidad antibacteriana contra especies que llegan a colonizar los conductos radiculares.

## OBJETIVOS GENERALES

- ❑ Evaluar la capacidad antibacteriana del cemento Pórtland.
- ❑ Relacionar el pH del cemento Pórtland con la capacidad antibacteriana.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ❑ Determinar la capacidad antibacteriana del cemento Pórtland en algunas especies bacterianas que llegan a colonizar los conductos radiculares.
- ❑ Conocer la acción bacteriostática o bactericida del cemento Pórtland sobre *Pseudomonas aeruginosa*.
- ❑ Conocer la acción bacteriostática o bactericida del cemento Pórtland sobre *Streptococcus faecalis*.
- ❑ Medir el pH del cemento Pórtland hidratado.
- ❑ Conocer si existe relación del pH del cemento Pórtland sobre el desarrollo de los microorganismos *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus faecalis*.

## HIPÓTESIS

- 1.- Si el cemento Pórtland tiene capacidad antibacteriana, inhibirá el crecimiento de algunas especies bacterianas que llegan a colonizar los conductos radiculares.
- 2.- Si el cemento Pórtland posee un pH alcalino, tendrá capacidad antibacteriana contra especies que llegan a colonizar los conductos radiculares.

## DISEÑO METODOLÓGICO

### Tipo de estudio

Experimental, analítico, transversal y prospectivo.

### Ubicación del estudio

Se llevó a cabo en las instalaciones del Cepario de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### Variables

#### a) Cualitativas: Capacidad antibacteriana.

- Bacteriostático
- Bactericida

#### b) Cualitativas :

- pH (potencial hidrógeno)
- Alcalinidad
- Acidez

### Recursos

#### 1) Humanos:

- Director de tesis
- Asesores de Metodología experimental: Biólogo, Química Farmacéutica Bióloga y laboratorista
- Dos alumnos egresados de la especialización en Endoperiodontología.

#### 2) Físicos:

Instalaciones del Cepario de la Facultad de Química de la UNAM.

#### 3) Materiales:

##### a) Material :

- Aceite de inmersión para microscopio óptico (Sigma ®)
- Agar AOAC (laboratorios Difco ®)
- Agar bacteriológico (Bioxon ®)
- Agar Müeller Hinton (Dibico ®)
- Agua destilada
- Alcohol-acetona (Sanofi diagnostics Pasteur ®)
- Asas microbiológicas.
- Base de agar OF (Bioxon ®)
- Bolsas de plástico de 14 x 18 cm
- Caldo AOAC (Laboratorios Difco ®)
- Caldo Casoy (Merck ®)
- Caldo nutritivo (Bioxon ®)
- Cemento Pórtland (Cruz Azul ®)
- Cinta testigo
- Cloruro de sodio (Merck ®)
- Espátulas metálicas
- Etanol al 96%
- Glucosa (Merck ®)
- Gradillas metálicas para tubos de ensaye de 72 divisiones.

- Hidróxido de sodio.
- Infusión Cerebro Corazón (BHI) Bioxon ®
- Marcador de tinta indeleble
- Material de plástico (probetas graduadas, cajas petri, micropipetas).
- Material de vidrio (Tubos de ensaye de 16 x 150, pipetas graduadas, pipetas Pasteur, triángulo de vidrio, vasos de precipitados, matraces, portaobjetos).
- Mechero de gas de Bunsen y touch matic ( Hanau ®).
- N'N'N'N' Tetrametil-p-fenilediamina (Merck ®)
- Papel de estraza
- Peróxido de hidrógeno al 3 %
- Piedra de Arkansas
- Pinzas de disección con punta roma
- Safranina (Sanofi diagnostics Pasteur ®)
- Solución salina estéril al 0.85% (Reproquifin ®)
- Solución violeta de genciana fenol (Sanofi diagnostics Pasteur ®)
- Solución yodo -yoduro de potasio (Sanofi diagnostics Pasteur ®)

**a) Equipo:**

- Autoclave vertical (Aclab ®, equipment company, USA).
- Balanza analítica – capacidad 600 x .1g- ( Ohaus ®, modelo No. Ct. 600-S made in USA)
- Cámara cuantacolonias (Hellige ®, incorporated, Garden city Made in USA)
- Cámara fotográfica (Canon ®)
- Campana de flujo laminar (Veco ®, hecho en México)
- Estufa de incubación de 37° (Riossa ®, modelo EC, hecho en México)
- Estufa de incubación de 42° C (Riossa ®, modelo EC, hecho en México)
- Horno de microondas (Panasonic®)
- Microscopio óptico (Olympus®, modelo CH30RF100, Olympus optical CO,CTD, made in Japan)
- Potenciómetro (Oakton ®, WD-35613-00;-10;-11. PHG Acorn series con electrodo de pH y sonda para temperatura meters, made in Singapur)
- Refrigerador ( American ®)
- Soluciones Buffer para calibración de pH (Merck ®, WD-00654-04 pH 7.01, WD-00654-08 pH 10.01)

**c) Material biológico: cepas bacterianas**

1. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
2. *Streptococcus faecalis* ATCC 8043/ B020

## METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Para llevar a cabo la fase experimental se seleccionaron dos cepas bacterianas liofilizadas: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Streptococcus faecalis* (ATCC 8043/B020) las cuales fueron donadas por el Cepario de la Facultad de Química

### FASE EXPERIMENTAL

#### 1. Hidratación de cepas liofilizadas

Para llevar a cabo esta fase, se trabajó dentro de una campana de flujo laminar, en ella se realizó la desinfección de las ampollas de vidrio en las cuales están contenidas las cepas liofilizadas, dicha desinfección se hace con etanol al 96%, se hidratan con Infusión Cerebro Corazón –BHI- (apéndice 1), posteriormente se cultivan en estos medios y se meten a incubación de 37° C durante 24 hrs.

#### 2. Comprobación de pureza, estabilidad y viabilidad de cepas bacterianas.

Una vez obtenido el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus faecalis* en los medios de cultivo líquidos se realizaron técnicas de aislamiento para obtener cultivos puros Para ello se emplearon medios de cultivo sólidos de agar AOAC (apéndice 2).

El aislamiento de las cepas bacterianas se llevó a cabo con la técnica de agotamiento por estrías. Las cajas de ambas cepas se metieron a incubar a 37° C durante 24 horas.

Pasado el tiempo de incubación se observa que las colonias estén suficientemente separadas y con características bien definidas para suponer que están puras, se realizan frotis bacterianos y tinción de Gram para identificación microscópica y de esta forma se verifica la existencia de un solo tipo de microorganismo.

También se realizó la comprobación de la identidad de estos cultivos mediante pruebas bioquímicas específicas (citocromo oxidasa, catalasa, BHI + NaCl al 6.5 % y de oxidación/fermentación de glucosa).

### 3. Elaboración de cajas Petri con cemento Pórtland en gradiente

Se llevó a cabo la preparación de un medio de cultivo sólido, agar Müeller Hinton (apéndice 3) y se prepararon mezclas de cemento Pórtland con agua destilada estéril (apéndice 4).

Se utilizaron dos cajas Petri por cada cepa bacteriana, una de experimentación y la otra para control

Las cajas experimentales se prepararon de la siguiente manera : Se hidrata el cemento Pórtland con agua destilada, todo en condiciones estériles, una vez hidratado se vacía en las cajas Petri , las cuales se inclinan ligeramente para que el cemento solidifique en gradiente. Una vez endurecido se vacía sobre esta base de cemento el agar Müeller Hinton.

Las cajas Petri para control solamente se les agrega agar Müeller Hinton sin cemento Pórtland

Una vez solidificado el agar, todas las cajas (experimental y control) se envuelven en bolsas de plástico para evitar deshidratación y se meten a refrigeración.

### 4. Siembra bacteriana masiva en cajas experimental y control

El primer paso consiste en preparar suspensiones en solución salina isotónica con la estandarización de Mc Farland al 0.5 ( $1.5 \times 10^8$  bacterias/ml) con las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus faecalis*.

Para lograr estas suspensiones se transfiere una asada de bacterias a un tubo de ensaye con 3 ml de solución salina isotónica estéril, la cual se agita hasta obtener una turbidez homogénea que debe ser exactamente igual a la de otro tubo con 0.5 de la escala de Mc Farland previamente establecida (apéndice 5).

Una vez preparadas las soluciones con ambas cepas bacterianas, se extrae 100 µl. de cada tubo con una micropipeta y se deposita sobre la superficie de agar de la caja experimental, después de ello se utiliza una varilla de vidrio triangular y se dispersa esta solución masivamente sobre el agar con movimientos circulares.

También se deposita 100 µl de la misma suspensión bacteriana sobre el medio de cultivo de la caja de control, y de igual manera se realiza la siembra masiva

Se realiza el mismo procedimiento con las suspensiones de ambas cepas bacterianas.

Una vez sembradas, las cajas experimental y control se envuelven en bolsas de plástico y se meten a la estufa de incubación a 37° C durante 48 hrs.

### **Cuantificación de microorganismos**

#### **5. Concentraciones de cemento Portland en medios de caldo Casoy para la observación de la inhibición bacteriana.**

Se prepararon medios de cultivo con caldo casoy ( apéndice 6 ), se utilizan 6 tubos de ensaye de 16 x 150 por cada cepa bacteriana ( *P. aeruginosa* y *S. faecalis* ) Las concentraciones se prepararon como se indica en el cuadro 1.

**Cuadro 1. Concentraciones de cemento Portland en caldo Casoy para la observación de inhibición bacteriana.**

<b>Tubo</b>	<b>Caldo Casoy</b>	<b>Cemento Pórtland</b>	<b>Volumen de microorganismos al 0.5 de la escala de McFarland</b>
Control	10 ml	0 g.	50µl
Concentración 1:10	9	1	50µl
Concentración 1:5	8	2	50µl
Concentración 1:3	7	3	50µl
Concentración 1:2.5	6	4	50µl
Concentración 1:1	5	5	50µl

#### **6. Recuento de células viables ( Método de dilución seriada y vaciado en placa)**

Se realizó la preparación de solución de cloruro de sodio -NaCl- al 0.85% (apéndice 7), se utilizaron 24 tubos de ensaye de 16 x 150 con tapón a los cuales se les vierten 9 ml. de dicha solución en cada uno y se meten a esterilizar en autoclave ( 121°C x 15 min). Se preparó también agar Müeller Hinton.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Se realizaron diluciones seriadas de los tubos más representativos obtenidos para la obtención de células viables, por lo que se tomaron en consideración el tubo control, la primera y la última concentración.

**Tubo control** – 10 ml de caldo casoy + 50 µl de cultivo al 0.5 de Mc Farland.

**Concentración 1:10** – 9 ml. de caldo casoy + 1 g. de cemento Pórtland + 50 µl de cultivo al 0.5 de Mc Farland.

**Concentración 1:1** – 5 ml. de caldo casoy + 5 g. de cemento Pórtland + 50 µl de cultivo al 0.5 de Mc Farland.

Del tubo control de *P. aeruginosa* se toma 1 ml. con una micropipeta estéril, el cual se transfiere a un tubo con 9 ml. de solución salina isotónica estéril, éste se tapa y se agita perfectamente (este primer tubo representa una dilución de 1/10 ó  $10^{-1}$ ). Se le realizan diluciones que van desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-9}$ . Durante este proceso también se transfiere 1 ml. de cada una de las diluciones a cajas Petri, para posteriormente verter sobre ellas 10 a 15 ml. de agar Müeller Hinton.

Al tubo con la concentración 1:10 se le realiza el mismo procedimiento hasta obtener dos diluciones:  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ . De ambas diluciones se extrae 1 ml. que se depositan en cajas Petri y sobre ellas también se vierte agar Müeller Hinton.

Del tubo con la concentración 1:1 solamente se le realiza una dilución  $10^{-1}$ . Se deposita en las cajas 1 ml de la dilución 1:1 directa y otro ml.  $10^{-1}$  y se vierte en ellas el agar.

#### **7. Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC)**

El conteo se realizó con una cámara cuentacolonia por cuadrante, dependiendo de la cantidad de UFC o de manera directa.

#### **8. Valoración del pH del cemento portland**

Se llevó a cabo la preparación de medios de cultivo con caldo casoy, se utilizaron 6 tubos de 16 x 150 y se prepararon concentraciones similares a las presentadas en el cuadro 1.

El pH se determinó con el uso de un potenciómetro, el cual se ajustó mediante la utilización de soluciones buffer con pH de 7 y 10, se realizó la valoración de pH inicial (al momento de la hidratación), a las 2 ½ hrs., a los 7, 14 y 21 días.

### **9. Evaluación del efecto del pH sobre *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus faecalis*.**

Para comprobar la relación existente entre el pH con la inhibición de crecimiento de *P. aeruginosa* y de *S. faecalis* se realizó la preparación de 12 tubos con 8 ml de BHI (Infusión Cerebro Corazón), se seleccionan 6 tubos para *P. aeruginosa* y 6 para *S. faecalis*. A cada tubo se le ajustó el pH a 7, 8, 9, 10, 11 y 12 respectivamente y se esterilizaron

Posteriormente se prepararon suspensiones al 0.5 de la escala de Mc Farland de *P. aeruginosa* y *S. faecalis*, de las cuales se tomaron 50µl con una micropipeta, se depositaron en cada una de los tubos con pH previamente ajustado y se metieron a incubación de 37° C durante 24 horas

### **10. Cuantificación de microorganismos viables.**

Al igual que con los tubos con cemento Pórtland se realizó el método de dilución seriada y vaciado en placa, después de 24 horas de incubación a 37° C se realizó la cuantificación mediante el uso de la cámara cuenta colonias.

## RESULTADOS

Las cepas bacterianas donadas por el Cepario fueron aisladas e identificadas. Los resultados acerca de su pureza, estabilidad y viabilidad se presentan en el cuadro 2. Las características de *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus faecalis* correspondieron a las descritas en la bibliografía microbiológica, por lo tanto se consideran viables para ser utilizadas en las siguientes pruebas biológicas

**Cuadro 2. Pruebas bioquímicas para la verificación de estabilidad bacteriana**

Cepa bacteriana	Morfología	Tinción de Gram	Citocromo oxidasa	Catalasa	Crecimiento en BHI + NaCl 6.5 %	O/F de glucosa
<i>P. aeruginosa</i>	Bacilo	Negativo	Positiva	Positiva	Negativa	+ / -
<i>S. faecalis</i>	Coco	Positivo	Negativa	Negativa	Positiva	NR

O- Oxidación

F- Fermentación

NR- No realizado

Para comprobar si el cemento Pórtland tiene acción antimicrobiana sobre ellas se utilizaron 2 medios de cultivo (experimental y control). Las observaciones realizadas en la caja control de *Pseudomonas aeruginosa* demuestran el desarrollo uniforme sobre la superficie del medio de cultivo (fig 5)

Mientras que en la caja experimental (cemento Pórtland y agar Müeller Hinton) de *P. aeruginosa* también se observó crecimiento bacteriano pero no de manera uniforme, ya que se presentan zonas de inhibición, sobre todo en la zona de mayor concentración de cemento Pórtland (fig 6).

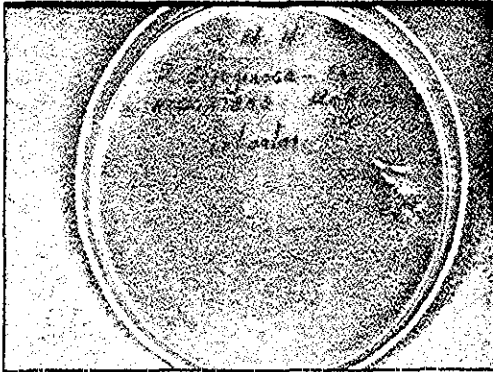
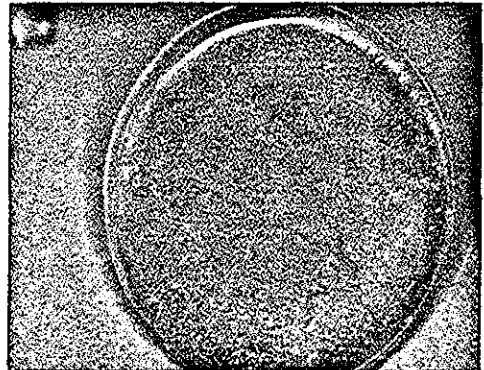


Fig. 5. Siembra masiva de *Pseudomonas aeruginosa* en agar Müeller Hinton (control)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Fig. 6. Siembra masiva de *Pseudomonas aeruginosa* en cemento Pórtland en gradiente.



Las observaciones realizadas en las cajas control y experimental donde se llevó a cabo la siembra masiva de *Streptococcus faecalis* demuestran resultados similares a los obtenidos en las cajas de *P. aeruginosa* (fig 7 y 8).

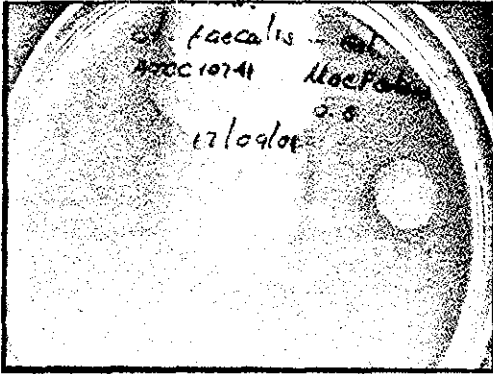


Fig. 7. Siembra masiva de *Streptococcus faecalis* en cajas control.

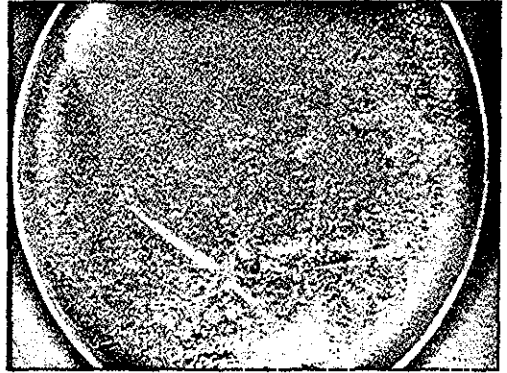


Fig. 8 Siembra masiva en cemento Pórtland en gradiente.

Lo anterior demuestra que el cemento Pórtland tiene acción inhibitoria sobre el crecimiento de colonias de los microorganismos utilizados en el estudio. Sin embargo la técnica de siembra masiva impide conocer el valor cualitativo y cuantitativo de dicha inhibición.

Para poder corroborar y analizar la inhibición de crecimiento bacteriano se prepararon diferentes concentraciones de cemento Pórtland en medios de cultivo líquidos (caldo casoy). La importancia de este método es de valor cualitativo, ya que la presencia o ausencia de microorganismos está determinada por una mayor o menor turbidez en los medios de cultivo.

Los tubos correspondientes a *Pseudomonas aeruginosa* (fig. 9) presentan los siguientes resultados: El tubo control (el de la izquierda) es el de mayor turbidez, lo que indica que el medio de cultivo es apto para el desarrollo de este tipo de microorganismos y por ello denota una alta concentración bacteriana.

El segundo tubo de izquierda a derecha (fig. 9) es el que tiene la menor concentración de cemento Pórtland, sin embargo se observa menor turbidez que la obtenida en el tubo control, lo que indica inhibición de crecimiento bacteriano y por lo tanto menor concentración bacteriana.

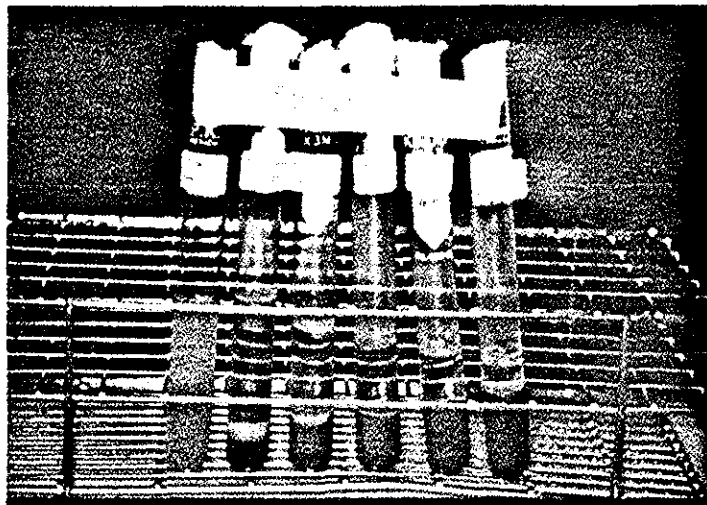


Fig. 9. Inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* con cemento Pórtland en caldo Casoy

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Mientras que el tubo con la menor o nula turbidez es el correspondiente a la concentración 1:1, por lo tanto, a una mayor concentración de cemento Pórtland mayor es la inhibición de desarrollo bacteriano.

Por otra parte, los tubos con los cultivos de *Streptococcus faecalis*, muestran resultados similares en cuanto a la turbidez (fig 10) Lo que corrobora que el cemento Pórtland tiene capacidad inhibitoria sobre el desarrollo de *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus faecalis*

Con base en estos resultados se deduce que las muestras más representativas de acuerdo con la turbidez mostrada son los tubos control, los tubos con concentraciones 1:1 y los que tienen concentraciones 1:10 El primero por no contener el material experimental y los otros dos por ser los que mostraron mayor y menor inhibición bacteriana.

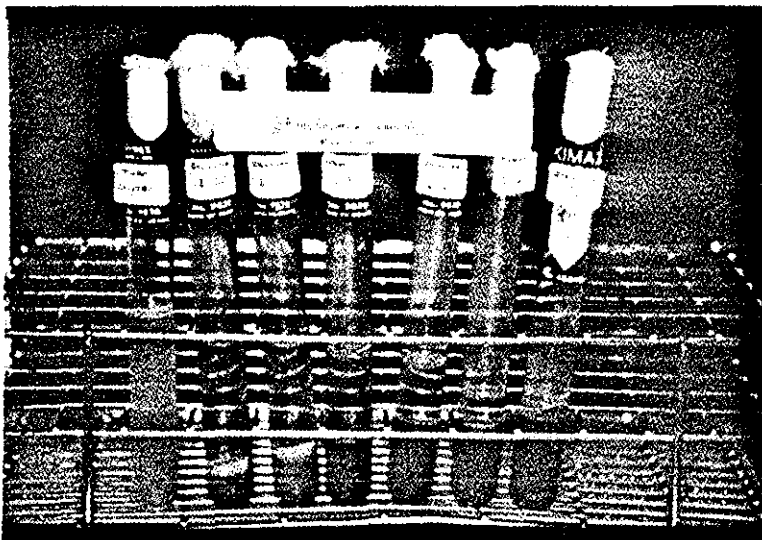


Fig. 10 Inhibición de desarrollo de *Streptococcus faecalis* con cemento Pórtland en caldo casoy

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Para la obtención del número de bacterias viables se procedió a un método de cuantificación, el de dilución seriada y vaciado en placa

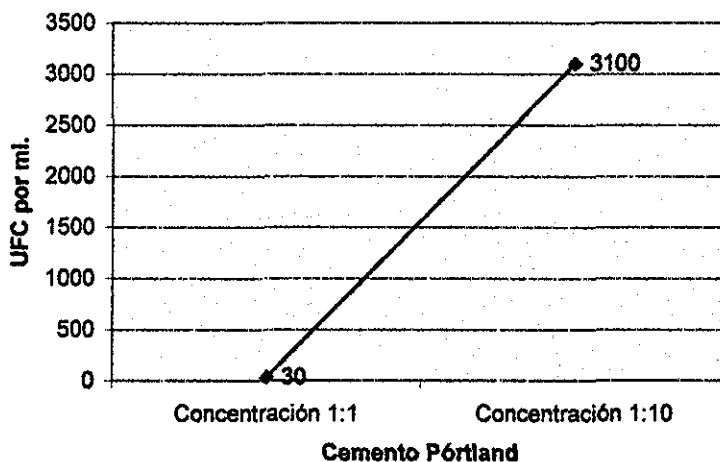
La serie de diluciones se realizó en relación a la concentración de microorganismos en los tubos control y experimental

Los resultados obtenidos en los tubos control y experimentales fueron cuantificados y se obtuvo lo siguiente: En el tubo control correspondiente a *Pseudomonas aeruginosa* (tabla y gráfico 1) se encontraron  $4.9 \times 10^{11}$  UFC por ml lo cual corresponde a una cifra bastante elevada si se compara con el tubo de la concentración 1:10 que es de 3100 ( $3.1 \times 10^3$ ) UFC por ml; pero que aún se considera elevado el número si se toma en cuenta que con una concentración 1:1 la cantidad de UFC por ml es de 30 ( $3 \times 10^1$ ), lo que indica que a mayor concentración de cemento Pórtland, mayor es la inhibición de desarrollo bacteriano.

Tabla 1. Inhibición del desarrollo de UFC de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 con las concentraciones de cemento Pórtland en comparación con el tubo control.

Concentraciones de cemento Pórtland	UFC por ml.
Tubo control	$4.9 \times 10^{11}$
Concentración 1:10	3100
Concentración 1:1	30

Gráfico 1. Inhibición de UFC de *Pseudomonas aeruginosa* con cemento Pórtland





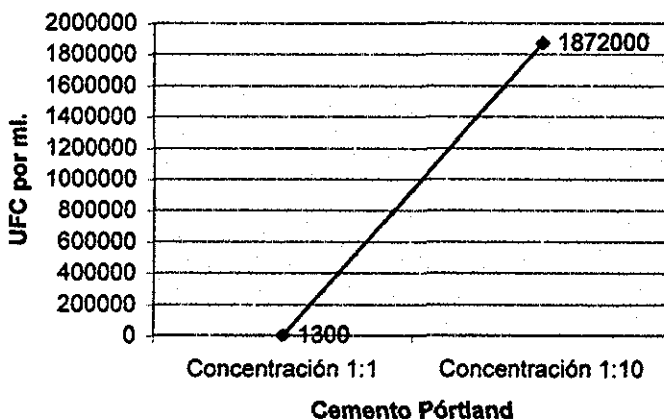
El comportamiento de los cultivos de *Streptococcus faecalis* fue similar, en el tubo control (Tabla y gráfico 2) se contabilizaron  $1.24 \times 10^{11}$  UFC por ml, mientras que en el tubo con la concentración 1:10 se desarrollaron  $1.8 \times 10^6$  (1872000) UFC por ml

En el tubo con la concentración 1:1 se notó una disminución muy significativa con respecto a la concentración 1:10 ya que se observaron  $1.3 \times 10^3$  (1300) UFC por ml. Se corrobora que a mayor concentración de cemento Pórtland, mayor la inhibición de desarrollo bacteriano, sin embargo se obtiene en base a la cuantificación que dicha inhibición no es igual para los dos microorganismos ya que la cantidad de UFC por ml. tanto en la concentración 1:10 como en la de 1:1 es mayor en los tubos de *Streptococcus faecalis* con respecto a las obtenidas en los tubos de *Pseudomonas aeruginosa*, lo cual significa que *S. faecalis* es más resistente.

**Tabla 2. Inhibición del desarrollo de UFC de *Streptococcus faecalis* ATCC 8043 con las concentraciones de cemento Pórtland en comparación con el tubo control.**

Concentraciones de cemento Pórtland	UFC por ml.
Tubo control	$1.24 \times 10^{11}$
Concentración 1:10	1872000
Concentración 1:1	1300

**Gráfico 2. Inhibición de UFC de *Streptococcus faecalis* con cemento Pórtland**



Se considera que el pH del cemento Pórtland sea el factor que contribuya a la inhibición de crecimiento de los dos microorganismos. Dado que los valores del pH del cemento Pórtland se desconocen se procedió a determinarlos, los resultados indican una estabilidad del pH neutro (control) durante los 21 días en los que se evaluó; las concentraciones experimentales mostraron gran variación durante el tiempo de registro.

Los tubos en la concentración 1:1 que fue la que demostró una gran eficacia sobre los microorganismos mostró un pH casi constante y estable durante los 21 días, el cual osciló entre 11.2 y 11.8 (cuadro 3)

**Cuadro 3. Valores de pH del cemento Pórtland**

Tubos	pH				
	Inicial	2:30 Hrs.	3er. día	14 días	21 días
Control	7.3	7.3	7.3	7.3	8.0
Concentración 1:10	8.3	9.8	9.8	9.8	11.0
Concentración 1:5	8.8	10.0	10.0	11.1	11.3
Concentración 1:3	10.9	10.9	10.4	11.2	11.1
Concentración 1:2	10.7	10.7	11.30	11.3	11.0
Concentración 1:1	11.2	11.2	11.4	11.8	11.8

El desarrollo de *P. aeruginosa* y *S. faecalis* es inhibido, se deduce que este efecto es producido por el pH alcalino del cemento Pórtland; resulta importante conocer ¿cuál es el efecto del pH sobre el desarrollo de estos microorganismos?

La respuesta a este cuestionamiento se obtuvo utilizando medios alcalinos sin utilizar cemento Pórtland. La inhibición en los tubos con caldo Casoy fue la siguiente: se obtuvo mayor turbidez en el tubo control (pH neutro) y la menor turbidez en los tubos con pH de 11 y 12. Si se toma en cuenta que los valores de pH oscilan entre los encontrados para el cemento Pórtland se puede determinar que corresponden a los tubos con la concentración 1:1.

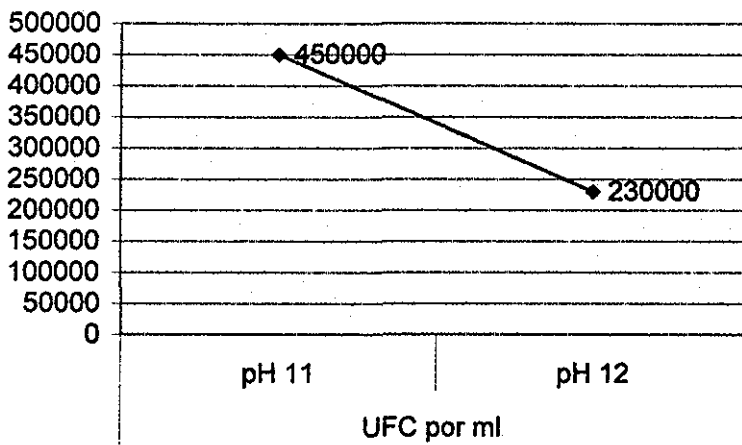
En base a estas observaciones se seleccionaron los tubos con pH 11 y 12 como los más representativos tanto por su menor densidad óptica como por coincidir con la alcalinidad del cemento Pórtland.

Dado que este método es de valor cualitativo se procedió a realizar la cuantificación de microorganismos viables mediante el método de dilución seriada y vaciado en placa, en ellas observamos que el tubo con pH 11 correspondiente a *Pseudomonas aeruginosa* tiene 450000 UFC por ml. en su última dilución (3/10), mientras que el tubo con pH 12 registró 230000 UFC por ml. (tabla y gráfico 3).

Tabla 3. Efecto del pH sobre el desarrollo de UFC de *Pseudomonas aeruginosa*

Dilución	UFC por ml.	
	pH 11	pH 12
3/10	450000	230000

Gráfico 3. Efecto del pH sobre el desarrollo de UFC de *Pseudomonas aeruginosa*



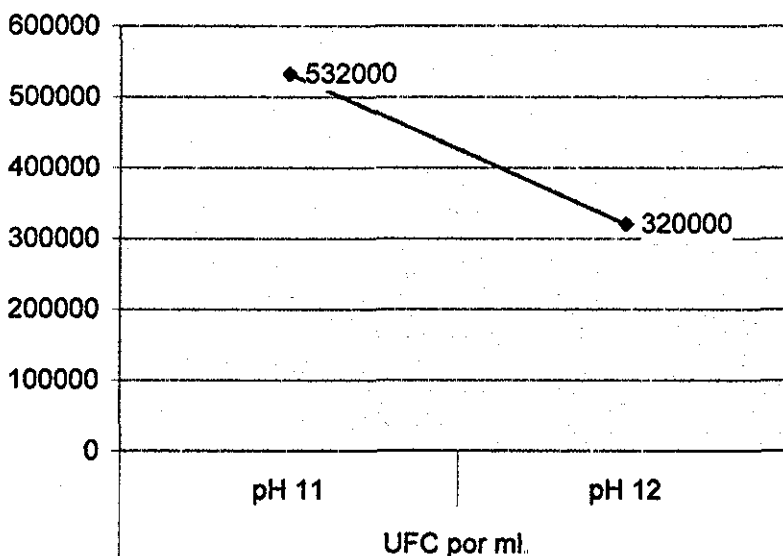
Los tubos con pH 11 y 12 correspondientes a *Streptococcus faecalis* tuvieron 332000 y 320000 UFC por ml. respectivamente en la dilución 3/10 ( tabla y gráfico 4)

Tomando como referencia estos últimos valores se puede afirmar que son elevadas con respecto a las cifras de células viables obtenidas con la concentración 1:1 de cemento Pórtland, por lo que se concluye que el desarrollo de los dos microorganismos en estudio resulta inhibido en medios con pH alcalinos, pero esta inhibición resulta más efectiva en medios que contienen cemento Pórtland

**Tabla 4. Efecto del pH sobre el desarrollo de UFC de *Streptococcus faecalis*.**

Dilución	UFC por ml.	
	pH 11	pH 12
3/10	532000	320000

**Gráfico 4. Efecto del pH sobre el desarrollo de *Streptococcus faecalis***



## ANÁLISIS DE RESULTADOS

El MTA es un material que se utiliza para diversas aplicaciones clínicas, entre ellas, el sellado de perforaciones yatrogénicas (Torabinejad y cols., 1999; Arens y cols., 1996).

Las perforaciones son consideradas como uno de los principales problemas asociados con los tratamientos endodónticos y como tal constituye una causa de fracaso (Jew y cols., 1982). Y es que una perforación establece una vía de comunicación entre el sistema de conductos radiculares y el periodonto (Torabinejad y cols., 1999), lo cual permite la filtración bacteriana que ocasiona la inflamación crónica de los tejidos periodontales (Arens y cols., 1996), que puede dar lugar a la migración apical del epitelio, así como a la destrucción del hueso subyacente (Nakata y cols., 1998).

El MTA como material sellador de perforaciones posee propiedades que impiden la penetración bacteriana, tales como el sellado marginal y un pH que contribuye a la reducción de factores bacterianos (Bates y cols., 1996; Torabinejad y cols., 1995; Arens y cols., 1996), con lo cual tiende a crear un ambiente que favorece la regeneración de los tejidos periodontales dañados.

El cemento Pórtland ha sido considerado como un material tan ideal como el MTA para el sellado de perforaciones, ya que presentan características físicas y químicas similares (Wucherpfennig y cols., 1999). Existen pocos estudios del cemento Pórtland, sin embargo, se ha reportado que es biocompatible (Wucherpfennig, y cols., 1999; Campos y cols., 2001) y que favorece la aposición de dentina en casos de recubrimiento pulpar directo (Wucherpfennig, y cols., 1999).

Uno de los objetivos de este estudio fue el determinar la capacidad antibacteriana del cemento Pórtland en dos especies bacterianas: *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus faecalis*, que son microorganismos que no han sido probados con el MTA, sin embargo son bacterias que colonizan normalmente los conductos radiculares, están estrechamente relacionados con los fracasos endodónticos (principalmente *P. aeruginosa*) y ambos son muy resistentes a los antibióticos (Ingle y cols., 1996), lo cual es clínicamente relevante.

Con base en los resultados podemos afirmar que el cemento Pórtland tiene la capacidad de inhibir significativamente el desarrollo de *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus faecalis*; es importante resaltar que éste último a pesar de ser un microorganismo alcalófilo (Buchanan y cols., 1974), capaz de sobrevivir a pH de 10 y 10.5, si se mostró inhibición de su desarrollo considerablemente por la acción del cemento Pórtland; por otro lado, *P. aeruginosa* es menos resistente a los cambios ambientales, y aunque no existen reportes de que sea un microorganismo alcalófilo, en este estudio se observó que si tolera pH alcalinos, sin embargo con el cemento Pórtland existió inhibición del desarrollo casi en su totalidad.

El MTA tiene capacidad antibacteriana, y ésta se le atribuye a su pH de 12.5, que es similar al del hidróxido de calcio (Arens y cols., 1996; Torabinejad y cols., 1999), un pH capaz de destruir las membranas y estructuras proteínicas de la célula bacteriana (Ingle y cols., 1999).

De igual manera y conforme a los objetivos planteados, en este estudio pudimos observar que el cemento Pórtland posee un pH alcalino, ligeramente menor al del MTA e hidróxido de calcio; aún a pesar de producir éste último al ser hidratado.

El cemento Pórtland con un pH de 11.8 alcanzado a los 21 días, tiene capacidad antibacteriana. Al comparar esta capacidad con la obtenida en los medios alcalinos con pH de 11 y 12, se observó

que el cemento Pórtland es capaz de inhibir el desarrollo de *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus faecalis* con mayor eficacia que en los medios alcalinos.

ESTA TESIS NO ESTÁ  
DE LA BIBLIOTECA

## CONCLUSIONES

- El cemento Pórtland ha demostrado tener capacidad antibacteriana sobre *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus faecalis*.
- El efecto del pH sobre el desarrollo de las bacterias influye de manera determinante, por lo tanto se afirma que la capacidad antibacteriana del cemento Pórtland está directamente ligada a su alcalinidad.
- Resulta evidente que el cemento Pórtland, además del hidróxido de calcio resultante y el pH alcalino, tiene otros factores que potencializan su capacidad antibacteriana; por lo que se sugiere mediante otra investigación la búsqueda de los mismos.
- El cemento Pórtland demostró capacidad bactericida *in vitro*, por lo tanto se recomienda realizar estudios experimentales *in vivo* para comprobar dicha capacidad.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 Schwartz RS, Summitt JB, Robbins JW, Dos Santos J (1996) "Fundamentals of operative dentistry. A contemporary approach", edit. Quintessence publishing co, Chicago EUA, p.p. 1-21.
2. Rieth P, Rau G (1990) "Atlas de profilaxis de la caries y tratamiento conservador", edit. Salvat, Barcelona España, 59-68.
3. Weine FS (1997) "Tratamiento endodóntico", 5ª ed., Harcourt Brace, Barcelona España, p.p. 695-713
4. Ingle JH, Bakland LK (1996) "Endodoncia", 3ª ed., edit. McGraw Hill Interamericana, México D.F., p.p.
5. Torabinejad M, Chivian M. Clinical applications of Mineral Trioxide Aggregate, Journal of Endodontics, 1999, 25 (3) : 199-205
6. Lindhe J, Karring I, Lang NP (2000) "Periodontología clínica e implantología odontológica", 3ª ed., edit. Médica panamericana, Madrid España, p.p. 19-67, 138-190, 299-329.
7. Gutmann JL, Harrison JL (1994) "Surgical endodontics", edit. Shiyaku euroamérica, St. Louis Missouri EUA, p.p. 89-122.
8. Kakehashi, S., Stanley HR, Fitzgerald RJ. (1965) The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats, Oral surgery 20, 340-349
9. Guldener PH, Langeland K (1995) "Endodoncia, diagnóstico y tratamiento", edit. Springer, Barcelona España, p.p. 78-96
10. Arens DE, Torabinejad M. Repair of furcal perforations with mineral trioxide aggregate, two case reports, Oral surgery oral medicine oral pathology oral radiology endodontics, 1996; 82 : 84-88
11. Jew RC, Weine F. A histological evaluation of periodontal tissues adjacent to root perforations filled with Cavit, Oral surgery, July 1982, 124-135
12. Lim D (1998) "Microbiology", 2ª ed., edit. Mc Graw Hill, E.U, p.p. 81-102
13. The pathogenesis of periodontal diseases. Academy reports, Journal of periodontology, 1999; 70 : 457-470
14. Nakata TT, Bae KS, Baumgartner JC. Perforation repair comparing mineral trioxide aggregate and amalgam using an anaerobic bacterial leakage model, Journal of endodontics, 1998, 24 (3) : 184-186.





15. Balla R, LoMonaco CL, Skribner J, Lin LM, Histological study of furcations perforations treated with tricalcium phosphate, hidroxilapatita, amalgama and Life; Journal of endodontics, vol. 17, No. 5, May 1991, 234-238.
16. Kettering JD, Torabinejad M Investigation of mutagenicity of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials, Journal of endodontics, 1995, 21(1) : 537-539.
17. Fisher EJ, Arens DE, Miller CH. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate a compared with zinc-free amalgam, intermediate restorative materia, Journal of endodontics and super EBA as a root-end filling material, Journal of endodontics, 1998, 24 (3) : 176-179.
18. Torabinejad M, Higa RK, McKendry DJ, Pitt Ford IR. Dy leakage of four root-end filling materials: effects of blood contamination, Journal of endodontics, vol. 20 No. 4, April 1994, 159-163.
19. Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otobony JA, Bernabé P, Dezan E Reaction of rat conective tissue to implanted tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. Journal of endodontics, vol 25 No. 3 March 1999.
20. Bates CF, Carnes DL, del Rio CE Longitudinal sealing ability of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material, Journal of endodontics, vol. 22 No. 11 November 1996, 575-578
21. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford IR, Kariyawasam SP. Tissue reaction to implanted super EBA and mineral trioxide aggregate in the mandibule of Guinea pigs : A preliminary report, Journal of endodontics, vol. 21, No.11, November 1995, 569-571.
22. Torabinejad M, Hong CU, Lee SJ, Monsef M; Pitt Ford IR. Investigation of mineral trioxide aggregate for root-end filling in dogs, Journal of endodontics, vol. 21 No. 12, December 1995, 603-608.
23. Torabinejad M, Rastegar AF, Kettering JO. Bacterial leakage of mineral aggregate as a root-end filling material, Journal of endodontics, vol. 21 No 3, March 1995, 109-112.
24. Wucherpfennig AI, Green DB. Mineral trioxide VS. Portland cement : two biocompatible filling materials, Journal of endodontics, vol 25 No. 4 April 1999, 282-283
25. Merrit FS (1991) " Manual del ingeniero civil", 3ª ed., edit. Mc Graw Hill, México D.F., p.p.
26. Peray KE (1986) " The rotary cement kiln", 2ª ed Edit. Chemical publishing, New York NY, p.p 115-140.
27. Leonardo MR " Memorias del 8º Congreso internacional de posgrados", San Luis Potosí S.I.P., Septiembre del 2000.
28. Campos LI., Llamosas E., Morales R. (2001) " Evaluación de la biocompatibilidad del cemento Pórtland implantado en tejido conectivo subepitelial de ratas", Iesis de Especialización de Endoperiodontología, pag. 20.

29. Buchanan RE, Gibbons NE (1974) " Bergey's manual of determinative bacteriology", edit. Williams and Wilkins, 8a. ed. p p 504-505

## APÉNDICE 1

### Infusión Cerebro Corazón (BHI)

**Fórmula para 1000 ml de agua destilada :**

Infusión de cerebro corazón	6.0 g
Peptona de carne	60 g
Cloruro de sodio	50 g
Dextrosa	3.0 g
Peptona de gelatina	14.5 g
Fosfato disódico	2.5 g

pH final  $7.4 \pm 0.2$

*Altamente higroscópico*

**Modo de preparación :**

Suspender 37 g del polvo en un litro de agua destilada, mezclar perfectamente, calentar con agitación frecuente y hervir durante un minuto hasta disolución completa, distribuir en tubos de ensaye y esterilizar a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos.

## APÉNDICE 2

### Agar AOAC

**Ingredientes por litro :**

Leche peptonizada	15 g
Extracto de levadura	5 g
Dextrosa	10 g
Jugo de tomate	5 g
Fosfato potásico monobásico	2 g
Tween 80	1 g

**Modo de preparación :**

Suspender 38 g. en un litro de agua destilada, distribuir en cantidades de 10 ml en tubos de 16 a 20 mm. de diámetro. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$ .

### APÉNDICE 3

#### Agar Müeller Hinton

##### Gramos por litro de agua destilada :

Infusión de carne de res .....	300 g
Peptona de caseína ácida .....	17.5 g
Almidón .....	1.5 g
Agar-agar .....	17.0 g

pH final  $7.4 \pm 0.2$

##### Modo de preparación :

Rehidratar 38 g del medio de cultivo en un litro de agua destilada. Remojar de 10 a 15 minutos, agitar perfectamente hasta disolver el medio. Esterilizar a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Enfriar a  $40-45^{\circ}\text{C}$  y vaciar en cajas de Petri estériles.

### APÉNDICE 4

#### Cemento Pórtland

##### Modo de preparación :

Pesar 20 mg. de cemento Pórtland en una balanza analítica, vaciar en un mortero, agregar 12 ml. de agua destilada estéril, mezclar con una espátula para cemento hasta obtener consistencia cremosa.

## APÉNDICE 5

### ESCALA DE MC FARLAND (CUADRO 4)

Clave de tubo	Cloruro de Bario (1%)	Acido sulfúrico (1%)	Suspensión bacteriana correspondiente por ml. ( $\times 10^8$ )
1	0.1	9.9	3
2	0.2	9.8	6
3	0.3	9.7	9
4	0.4	9.6	12
5	0.5	9.5	15
6	0.6	9.4	18
7	0.7	9.3	21
8	0.8	9.2	24
9	0.9	9.1	27
10	10	9.0	30

## APÉNDICE 6

### Caldo Casoy

#### Composición para 1000 ml de agua destilada :

Peptona de caseína .....	17.0 g
Peptona de harina de soya .....	3.0 g
D (+) glucosa .....	2.5 g
Cloruro de sodio .....	5.0 g
Fosfato dipotásico .....	2.5 g

pH  $7.3 \pm 0.1$

#### Modo de preparación :

Disolver 30 g. del medio por litro de agua recién destilada, en caso necesario calentar a baño María hasta disolución total. Esterilizar en autoclave ( 15 minutos a  $121^\circ \text{C}$ )

## APÉNDICE 7

### Cloruro de sodio cristal ( Reactivo analítico)

#### Modo de preparación al 0.85 % :

Pesar en una balanza analítica 85 g por cada 1000 ml. de agua destilada, agitar hasta disolver, distribuir en cantidades en mililitros en tubos de ensaye con tapón de plástico y meter a esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 minutos.

## APENDICE 8

### PRUEBA DE LA CATALASA

**Principio:** Comprobar la presencia de la enzima catalasa

#### Reactivos:

1. Peróxido de hidrógeno al 30 % (superoxal).
2. Buffer fosfato (M/15), pH:7.
3. Tween 80, 10 %.

#### Método:

1. Con una aguja de inoculación recoger el centro de una colonia pura de 18 a 24 horas y colocar sobre un portaobjetos de vidrio limpios. La prueba no podrá aplicarse si el agar sangre es introducido en el peróxido de hidrógeno.
  2. Agregar una gota de peróxido de hidrógeno al 30 % sobre el organismo del portaobjetos usando un gotero o una pipeta de Pasteur.
- Nota: no invertir el orden del método porque pueden producirse resultados falsos positivos. Ni mezclar con la aguja o el asa de inoculación. No es necesaria la mezcla del cultivo y el peróxido de hidrógeno.
  - Observar la inmediata formación de burbujas ( liberación de gas) y registrar el resultado

#### Interpretación:

- Prueba positiva: formación inmediata de burbujas bien visibles (formación de oxígeno).
- Prueba negativa: no hay formación de burbujas (no se forma oxígeno).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## APENDICE 9

### PRUEBA DE LA OXIDASA

**Principio:** Determinar la presencia de las enzimas oxidasas

**Reactivos empleados:**

Reactivo de Kovacs: Diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina al 1%.

**Método en placa directa:**

Se coloca una colonia sobre papel filtro y se agrega una gota del reactivo.

**Interpretación:**

- Colonias oxidasas positivas: la colonia forma un color azul
- Colonia oxidasas negativa: no se produce cambio de color en las colonias o sólo adquieren un color rosado pálido por el reactivo.

## APENDICE 10

### PRUEBA DE OXIDACIÓN-FERMENTACION

**Principio:** Determinar el metabolismo oxidativo o fermentativo de un hidrato de carbono.

**Medio empleado:**

Medio básico OF de Hugo y Leifson, pH: 7.1

**Método de preparación:** Medio básico Bacto OF ®

1. Pesar las cantidades con precisión como se indica en el prospecto.
2. Rehidratar con agua destilada o desmineralizada.
3. Calentar suavemente hasta su disolución.
4. Esterilización en autoclave a 121° C durante 15 minutos.
5. Enfriar el medio básico esterilizado hasta 40-45° C en un baño de agua.
6. Agregado de hidratos de carbono, dos opciones:
  - a) Soluciones acuosas al 10 % : hidratos de carbono (glucosa).
  - b) Discos de hidrato de carbono comerciales.
7. Enfriar antes de su empleo y refrigerar para su conservación (4-10° C).
8. Inoculación, prueba estándar en dos tubos. Picar con una aguja de inoculación en ambos tubos hasta 0.6 mm del fondo del tubo, cubrir todos los tubos cerrados (o sellados) con 1 a 2 ml. De vaselina o parafina fundida estéril, para excluir el oxígeno.
9. Incubación a 35° C durante 48 horas o más, puede necesitar de 3 a 4 días o hasta 14 días de incubación prolongada.

**Interpretación:**

- Positiva: Color amarillo.
- Negativa: Color verde, azul o naranja