



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES  
UNIDAD LEÓN**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA  
DEL COMPUESTO CTZ EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE  
ALMACENAMIENTO Y SU EXPOSICIÓN A LA LUZ.  
ESTUDIO *IN VITRO***

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN ODONTOLOGÍA**

**P R E S E N T A:**

**SILVIA PAOLA RAMIREZ RESENDIZ**



**TUTOR: DRA. LAURA SUSANA ACOSTA TORRES  
ASESORES: ESP. FEDERICO MORALES CORONA  
ESP. JESÚS BENJAMÍN LÓPEZ NÚÑEZ  
DRA. GENOVEVA HERNÁNDEZ PADRON**

**LEÓN, GUANAJUATO. 2016**



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.

# INDICE

<b>DEDICATORIAS</b> .....	<b>I</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>II</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>PALABRAS CLAVE</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>4</b>
1. MARCO TEÓRICO .....	4
1.1. DENTICIÓN PRIMARIA.....	4
1.1.1. DIFERENCIAS MORFOLÓGICAS ENTRE DENTICIÓN PRIMARIA Y PERMANENTE.....	4
1.1.2. ANATOMÍA INTERNA DE LOS DIENTES PRIMARIOS .....	5
1.1.3. IMPORTANCIA DE LA PRESERVACIÓN DE LA DENTICIÓN PRIMARIA.....	7
1.2. PATOLOGÍA PULPAR Y LESIONES PERIODONTALES.....	7
1.2.1. TEJIDOS PULPARES Y PERIODONTALES .....	7
1.2.2. ETIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES QUE AFECTAN LA PULPA Y EL PERIODONTO .....	8
1.2.3. DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACIÓN DE ENFERMEDADES PULPARES Y PERIRRADICULARES ..	9
1.2.3.1. Enfermedades pulpares .....	11
1.2.3.1. Lesiones endoperiodontales.....	12
1.2.4. MICROBIOLOGÍA DE DIENTES CON NECROSIS PULPAR Y LESIONES PERIRRADICULARES	13
1.2.5. TRATAMIENTO DE DIENTES CON NECROSIS PULPAR Y LESIÓN PERIRRADICULAR .....	13
1.3. TÉCNICA DE ENDODONCIA NO INSTRUMENTADA (NIET) .....	14
1.3.1. ESTERILIZACIÓN DE LA LESIÓN Y REPARACIÓN TISULAR (LSTR) .....	14
1.3.2. MEDICAMENTOS EMPLEADOS .....	15
1.4. CTZ.....	15
1.4.2 COMPONENTES.....	15
1.4.4 INDICACIONES.....	17
1.4.5 VENTAJAS Y DESVENTAJAS .....	17
1.4.6 TÉCNICA .....	17
1.4.7 BIOCOMPATIBILIDAD .....	17
1.5. TÉCNICAS DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y GRUPOS FUNCIONALES DEL CTZ. ....	18
1.5.1. TÉCNICA DE DIFUSIÓN EN AGAR .....	18
1.5.2. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO.....	20
2. ANTECEDENTES .....	21
2.1. ESTUDIOS IN VITRO .....	21

2.2. ESTUDIOS CLÍNICOS.....	21
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>23</b>
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	23
3. JUSTIFICACIÓN .....	24
4. OBJETIVO GENERAL.....	25
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
6. HIPÓTESIS.....	25
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>26</b>
1. METODOLOGÍA.....	26
1.1. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	26
1.2. VARIABLES.....	26
1.3. UNIVERSO DE TRABAJO.....	26
1.4. CRITERIOS DE SELECCIÓN .....	27
1.5. TAMAÑO DE MUESTRA .....	28
1.6. MATERIALES.....	28
1.7. MÉTODO.....	29
1.7.1. PREPARACIÓN DE CTZ.....	29
1.7.2. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO .....	30
1.7.3. SEMBRADO DE CULTIVO DE 24 HORAS.....	31
1.7.4. PREPARACIÓN DE INÓCULO Y ESTANDARIZACIÓN DE SUSPENSIÓN .....	32
1.7.5. ENSAYO ANTIMICROBIANO .....	33
1.7.5. ANÁLISIS DE GRUPOS FUNCIONALES.....	35
1.8. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	36
1.9. INFRAESTRUCTURA.....	36
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>38</b>
1. RESULTADOS.....	38
1.1. EFECTO ANTIMICROBIANO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO.....	40
1.2. EFECTO ANTIMICROBIANO EN FUNCIÓN DE SU EXPOSICIÓN A LA LUZ.....	44
1.3. EFECTO ANTIMICROBIANO DEL COMPUESTO CTZ ENTRE CADA ESPECIE BACTERIANA.....	47
1.4. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE ESPECTROSCOPÍA DE INFRARROJO.....	48
2. DISCUSIÓN .....	49
3. CONCLUSIONES.....	51
4. BIBLIOGRAFÍA .....	52
<b>ANEXOS.....</b>	<b>i-xii</b>

## DEDICATORIAS

*A la vida por permitirme aferrarme a ella. Por pintar los bocetos de mi camino.*

*A mi familia: mi hermano por ser mi primer maestro; mi papá por ser el superhéroe que me ayuda en las dificultades; mi mamá por su apoyo incondicional y darme su ejemplo en todos los aspectos de la vida. A Ángel por su amor y paciencia, por enseñarme que debo seguir firme en mi camino y nunca dejar de soñar.*

*A mis maestros, compañeros y pacientes por su enseñanza, convivencia y confianza.*

*A mis roomies y amigas: Miroslava, Isela, Paloma. A Carmen. Por ser un apoyo emocional y convertirse en mi familia.*

## AGRADECIMIENTOS

Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León de la Universidad Nacional Autónoma de México. Al Mtro. Javier de la Fuente Hernández. Por abrirme las puertas de la universidad, por las oportunidades de participaciones en congresos, por las becas y ayudas económicas brindadas. Gracias por permitirme realizar un intercambio internacional. Por ser una universidad ejemplar en calidad educativa. Especialmente la ENES por brindar a todos sus alumnos infraestructura de gran calidad que nos permite desarrollar habilidades y conocimientos de la mejor manera.

Laboratorio de Nanoestructuras y Biomateriales de la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León. A la Dra. Laura Susana Acosta Torres y a la Dra. Concepción Arenas Arrocena. Por creer en nuestro proyecto y apoyar la realización del mismo. Gracias por su orientación y participación activa durante el desarrollo de esta investigación. Por hacerme partícipe de múltiples actividades de la universidad, por confiar en mí.

Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la UNAM Campus Juriquilla y a la Dra. Genoveva Hernández Padrón. Por su apoyo en la realización del análisis de espectroscopía que se realizó quincenalmente durante 4 meses. Por su orientación.

Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA): Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN225516; proyecto: Materiales dentales nanoestructurados para la inhibición de microorganismos causantes de infecciones bucales, y al Programa de Apoyo a Proyectos para la Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME PE210616; proyecto: Enseñanza práctica del proceso de evaluación del efecto antimicrobiano y citotóxico de nanopartículas metálicas) por el financiamiento otorgado al presente proyecto.

Esp. Federico Morales Corona. Por ser el autor de la idea de realizar este estudio. Por su constante atención y la confianza depositada en mí. Porque en todo momento sentí su respaldo e interés para llevar a cabo la investigación.

Esp. Benjamín López Núñez, Esp. Abraham Mendoza Quintanilla y Dra. Adriana Martínez. Por sus comentarios y observaciones que han ayudado para mejorar este trabajo.

L.O. Paloma Netzayeli Serrano Díaz. Por la ayuda técnica brindada, por la orientación en la metodología. Por mostrarme de la mejor manera el mundo de la microbiología.

L.O. Julieta Pérez Hernández. Por su disposición y apoyo en la toma de fotografías de la metodología.



## RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** La Técnica de Endodoncia No Instrumentada (NIET) es una alternativa para el tratamiento de dientes primarios con necrosis pulpar y lesiones periapicales. Consiste en colocar una pasta antibiótica en el piso de la cámara pulpar. El CTZ es una pasta que se realiza a partir de cápsulas de cloranfenicol y tetraciclina, añadiendo óxido de zinc sin endurecedor y eugenol. Se han encontrado manuales de procedimientos que indican que el CTZ debe almacenarse en un frasco ámbar, con caducidad de dos semanas.

**OBJETIVO:** Evaluar la actividad antibacteriana del compuesto CTZ en función del tiempo de almacenamiento y su exposición a la luz ambiental durante un periodo de 4 meses a partir de su preparación mediante un estudio *in vitro*.

**MATERIAL Y MÉTODOS:** Se preparó el CTZ con la proporción 1:1:2 de cloranfenicol, tetraciclina y óxido de zinc; colocando la mitad en un frasco ámbar y la otra mitad en uno transparente. Se realizaron pruebas de inhibición bacteriana mediante exposición directa cada 2 semanas durante 16 semanas del CTZ con eugenol en los microorganismos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli* (0,5 McFarland). Se midieron las zonas de inhibición después de 48 horas de incubación a 37°C; fueron utilizados controles positivos y negativos. Se aplicó ANOVA de Una Vía ( $P < 0.05$ ).

**RESULTADOS:** Los valores de inhibición-bacteriana del CTZ (mm) al inicio del estudio (I) y después de 16 semanas (16s) de almacenamiento tanto en frasco ámbar (a) como en transparente (t): *Pseudomonas aeruginosa* I=  $(29.61 \pm 0.79)$ , 16 s-a=  $(29.03 \pm 0.59)$  y 16 s-t=  $(29.39 \pm 0.52)$ ; *Staphylococcus aureus* I=  $(36.05 \pm 2.30)$ , 16 s-a=  $(34.94 \pm 1.18)$  y 16 s-t=  $(35.04 \pm 1.45)$ ; *Enterococcus faecalis* I=  $(29.97 \pm 0.59)$ , 16 s-a=  $(39.82 \pm 0.64)$  y 16 s-t=  $(29.42 \pm 0.68)$ ; *Escherichia coli* I=  $(28.77 \pm 0.43)$ , 16 s-a=  $(28.66 \pm 0.57)$  y 16 s-t=  $(29.01 \pm 0.68)$ . En el análisis estadístico realizado se observó diferencia significativa en las cuatro especies bacterianas ( $P = < 0.0001$ ), por lo cual se decidió realizar contrastes post-hoc de comparación múltiple (Dunnett, Sidak y Tukey). Se observaron diferencias significativas en las comparaciones múltiples de algunos grupos.

**CONCLUSIONES:** El compuesto CTZ puede almacenarse en frascos de vidrio transparente durante un periodo de 4 meses con seguridad que el efecto antibacteriano será el mismo que el CTZ preparado en el momento operatorio. El compuesto CTZ tuvo mayor efecto antibacteriano contra cocos Gram-positivos aerobios y anaerobios facultativos (*S. aureus*, *E. faecalis*). Es importante preparar el CTZ de acuerdo a las proporciones mencionadas por Costa y cols. considerando la fecha de caducidad de los componentes.

## PALABRAS CLAVE

Necrosis pulpar, dientes primarios, pasta antibiótica, NIET, LSTR.



## INTRODUCCIÓN

Uno de los propósitos de la odontología pediátrica es la preservación de los dientes primarios en buenas condiciones hasta su exfoliación, ya que realizan funciones importantes como la estética, fonación y morfología (1). Con frecuencia, los traumatismos dentales y lesiones extensas de caries afectan la pulpa de los dientes primarios, haciendo que el mantenimiento de éstos en la boca dependa del tratamiento pulpar (2).

La pulpectomía es una opción para el tratamiento de dientes primarios afectados severamente. La pulpectomía consiste en la limpieza mecánica del canal radicular seguido de la obturación de los canales radiculares con un material biocompatible, radiopaco y reabsorbible (3). Se sabe que la elección de un material de sellado endodóncico podría ser guiado principalmente por sus propiedades biológicas, así como la ausencia de sintomatología, reducción o estabilización de lesión periapical (4). Los materiales de obturación más empleados para dientes primarios son el óxido de zinc y eugenol (ZOE), hidróxido de calcio y pasta yodoformada, entre otras (5).

El tratamiento de pulpectomía en dentición primaria tiene algunas dificultades, tales como la curvatura de las raíces de los molares, complejidad de los conductos y resorción fisiológica (6), además de estas dificultades está la infección de origen polimicrobiano (7). Por estas razones, la limpieza química y mecánica de los conductos requiere la reducción o eliminación de las bacterias con irrigantes antimicrobianos y, especialmente, con un material obturador antimicrobiano con amplio espectro, buena difusión y reabsorción (2).

En la Escuela de Odontología en la Universidad de Niigata se ha desarrollado el concepto de "Terapia de Esterilización de la lesión y Reparación Tisular" (LSTR por sus siglas en inglés) que emplea el uso de una mezcla de fármacos antibióticos para la desinfección de lesiones orales, incluyendo las lesiones dentinarias, pulpares y periapicales. Esta terapia, aparentemente depende de la eliminación de bacterias del sistema de canal radicular y no de los procedimientos mecánicos (8). La LSTR se acompaña de la Técnica de Endodoncia No Instrumentada (NIET por sus siglas en inglés) que consiste en la colocación de una pasta a base de componentes antimicrobianos unidos a un vehículo que se colocarán en la entrada de cada canal radicular. Los medicamentos que se utilizan comúnmente en la NIET son: tetraciclinas, metronidazol y/o ciprofloxacino, además de emplear un vehículo como el macrogol, propilenglicol y/o eugenol. Las pastas CTZ y 3Mix son las más conocidas para esta técnica (9).

La pasta CTZ se conforma de cloranfenicol, tetraciclina, óxido de zinc y eugenol. Es empleada en la técnica de endodoncia no instrumentada en dientes primarios con necrosis pulpar, la cual ha sido enseñada en cursos de especialización en odontopediatría en Brasil para el tratamiento de caries severa de la infancia (10). La técnica que utiliza la pasta CTZ se puede realizar en sólo una sesión debido a sus propiedades antibacterianas. Promueve la estabilización de la reabsorción ósea y no causa sensibilidad



en los tejidos (11). Además, no exige limpieza mecánica de los canales radiculares antes o después de la desinfección, lo cual es una ventaja en el tratamiento de los pacientes no colaboradores (12).

Aunque desde 1964 fue sugerido por Cappiello el uso de la pasta CTZ y se realizaron estudios comprobando su éxito (10,13-16), no existen investigaciones recientes sobre eficacia de la pasta después de su elaboración con relación al tiempo y tipo de almacenamiento.

El objetivo de este estudio es evaluar la efectividad antibacteriana del CTZ en función del tiempo de almacenamiento y su exposición a la luz ambiental, mediante un estudio *in vitro* con las siguientes especies bacterianas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli*.



# CAPÍTULO 1

---

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. DENTICIÓN PRIMARIA

Al igual que en los mamíferos, la especie humana es bifiodonta, lo que significa que tiene dos denticiones completas en diferentes etapas de su vida; primaria y permanente. La dentición primaria, conformada por 20 dientes, comienza su formación entre la sexta y octava semana de vida intrauterina, los dientes erupcionan a la cavidad oral entre los 6 meses y los 2,5 años de edad (17). La mandíbula y el maxilar continúan su crecimiento para tener espacio suficiente para la dentición permanente que comienza a los 6 años aproximadamente con la erupción de los primeros molares permanentes, tanto inferiores como superiores. Entre la edad de 6 y 12 años, los niños comienzan a tener dentición mixta. A la edad de 12 años la mayoría tiene la dentición permanente completa con 28 dientes, excepto por los terceros molares (18).

Tanto los dientes permanentes como los deciduos tienen un desarrollo que involucra procesos biológicos dentro de un ciclo vital. En los dientes primarios, este ciclo es corto y su duración depende de cada tipo de grupo dentario: comienza desde la formación embriológica de la lámina dentaria, se desarrolla en cada fase de crecimiento, tiempo después los dientes erupcionan en la cavidad bucal, la formación continua hasta tener las raíces completas para pasar al periodo de envejecimiento, el cual involucra reabsorción fisiológica de las raíces hasta que llega el momento de la exfoliación del diente (19).

#### **1.1.1. DIFERENCIAS MORFOLÓGICAS ENTRE DENTICIÓN PRIMARIA Y PERMANENTE**

La morfología de la dentición primaria es diferente a la dentición permanente en muchos aspectos, no únicamente en el tamaño de la corona y las raíces. Los dientes primarios se distinguen de los dientes permanentes por los *caracteres de la dentición*, que son un conjunto de rasgos diferenciadores que resultan de la comparación de ambas denticiones. Estos rasgos pueden dividirse en coroneales, radiculares, histológicos y pulpares (17).

- ***Características coroneales***

En los dientes primarios las superficies oclusales en sentido vestibulolingual son más estrechas que en los dientes permanentes. La corona es más corta en relación a la raíz. Los molares primarios tienen una apariencia engrosada debido a que el diámetro mesiodistal es mayor en relación con la altura de la corona. Tiene superficies linguales y labiales abultadas en los dientes anteriores y crestas



vestibulocervicales en las caras vestibulares de los molares, seguida de una constricción en la línea cervical. En esta dentición existen puntos de contacto más amplias y planas, por lo que se llaman “áreas de contacto” (17).

- ***Características radiculares***

Las raíces de los dientes primarios, a diferencia de los temporales, no tienen tronco radicular, esto significa que aparecen inmediatamente debajo de las coronas. Generalmente las raíces tienen una relación con el germen de su diente permanente sucesor, por lo que los molares tienen las raíces divergentes (17).

- ***Características histológicas***

Los tejidos mineralizados de los dientes primarios tienen diferentes características a las encontradas en los dientes permanentes: el esmalte de los primarios tiene menor grosor y tiene menor grado de calcificación; la dentina tiene menor espesor. La extensión de los prismas del esmalte en los dientes primarios también difiere de los dientes permanentes, ya que en los primeros se extienden en dirección coronal, y los segundos hacia cervical. Los dientes temporales son más propensos a la progresión rápida de infecciones por las características de los tejidos duros y por la proximidad de la cámara pulpar a la superficie oclusal. Tienen menor sensibilidad dentinaria. La pulpa en dientes primarios es altamente vascularizada y tiene una capa de fibras reticulares y de colágeno en la pulpa coronal. Las fibras nerviosas de los dientes primarios terminan en el área odontoblástica, mientras que en los dientes permanentes se extienden hasta la predentina. Los tejidos nerviosos de la pulpa son los últimos en formarse durante el desarrollo de la pulpa y son los primeros en degenerarse cuando comienza la rizólisis (17,20).

- ***Características pulpares***

El tamaño de la cámara pulpar es más amplia comparada con los dientes permanentes y los cuernos pulpares están más cerca de la superficie oclusal con mayor prominencia del cuerno mesiovestibular. Los conductos radiculares, conductos accesorios y forámenes en los molares primarios tienen diversas irregularidades de forma y número (17,19,20).

### ***1.1.2. ANATOMÍA INTERNA DE LOS DIENTES PRIMARIOS***

La cavidad pulpar es el espacio que aloja la pulpa dental y que está rodeada de dentina. Dado que la aposición de dentina a lo largo de la vida del diente es continua, la cámara pulpar y conductos radiculares cambian su tamaño y forma a través del tiempo: la cámara pulpar de un diente que ha erupcionado recientemente tiene mayor volumen y sus cuernos pulpares están bien definidos debajo de las cúspides; conforme pasa el tiempo, la cavidad pulpar disminuye su tamaño debido a la aposición



de dentina que es mayor en el techo y piso de la cámara pulpar, a diferencia de las paredes, que es menor (21).

Los cambios fisiológicos, dentinopulpares y estructurales que suponen la aposición de dentina en la etapa posteruptiva del diente abarcan tres etapas definidas (22):

- 1) *Etapa desde la erupción hasta la formación completa de la raíz.* El complejo dentinopulpar es altamente vascularizado y su actividad dentinogénica es elevada. Se forma el ápice y la dentina se deposita en toda la luz del conducto radicular (21,22).
- 2) *Etapa en que la raíz está completa, antes del comienzo de la rizólisis.* El órgano dentinopulpar es más propensa a la formación de dentina frente a agresiones debido a la similitud con la pulpa de dientes permanentes jóvenes (22).
- 3) *Etapa en que comienza la rizólisis.* El complejo inicia una etapa de regresión, por lo cual disminuyen la vascularización y el número de células. Los odontoclastos fagocitan la dentina y destruyen el cemento de la raíz, haciendo que paulatinamente el ápice radicular sea más ancho (21,22).

#### ▪ ***Cámara pulpar***

El piso de la cámara pulpar de los dientes primarios es muy delgado. En la furca de los molares hay presencia de foraminas accesorias y/o canales accesorios que pueden ser el resultado de un fracaso en la formación de la vaina epitelial de Hertwigh durante la odontogénesis, en donde vasos sanguíneos persistentes alcanzan a la pulpa y al final dan como resultado la conexión de la pulpa con los tejidos periodontales (23). Estas características anatómicas pueden explicar las áreas de rarefacción ósea en la furca en los molares temporales de dientes con necrosis pulpar y consecuente infección periodontal (19).

#### ▪ ***Conductos radiculares***

Las raíces de los dientes primarios terminan su formación de 16 a 20 meses después de la erupción. En tres años aproximadamente, las raíces comienzan la resorción fisiológica en el ápice o en una superficie lateral cerca del ápice debido a su próxima exfoliación (24).

Los canales radiculares en los dientes anteriores tienen pocas irregularidades y son más simples, lo cual significa que se pueden manipular fácilmente en la terapia de conductos. En contraste, los conductos de los molares son más complejos: debido a que las raíces son divergentes en el sentido apical, los conductos también presentan esta forma; además de ser estrechos y largos, tienen forma de reloj de arena; tienen múltiples canales colaterales, intercanales y canales recurrentes; las resorciones externas por rizólisis (19,20,22).



### **1.1.3. IMPORTANCIA DE LA PRESERVACIÓN DE LA DENTICIÓN PRIMARIA**

La dentición primaria es importante para el desarrollo de los niños y tiene numerosas funciones, las cuales consisten en el la preparación y asimilación de los alimentos para su digestión, fonación, estimulación del crecimiento de la mandíbula, estética y mantenedor de espacio para los dientes permanentes (6).

La pérdida prematura de molares e incisivos primarios es principalmente atribuida a caries, seguida de los traumatismos. La causa de pérdida prematura de incisivos laterales y caninos se relacionan con reabsorción prematura de las raíces (25). Las consecuencias de la pérdida prematura son disminución de la longitud de arco, espacio insuficiente para la erupción de dientes permanentes, erupción ectópica o premolares impactados, mesialización del diente adyacente al molar perdido, extrusión del permanente antagonista, desviación de la línea media con posibilidad de mordida cruzada y desarrollo de hábitos linguales (26).

Debido a los altos índices de caries, la mínima invasión y la preservación de los dientes primarios con diferentes opciones de tratamiento debe ser el objetivo principal en la terapéutica de dientes con lesiones de caries, siempre y cuando el diente permanente no erupcione dentro de los siguientes 12 meses. Además de la preservación, es importante el tratamiento oportuno de las infecciones de los molares primarios, tanto pulpares como perirradiculares, ya que su progresión puede afectar el germen del diente permanente sucesor y las estructuras circundantes. Los efectos adversos de la progresión de lesiones perirradiculares son: hipoplasia del esmalte, cese del desarrollo radicular, alteraciones de posición y dientes arrestados (27-29).

## **1.2. PATOLOGÍA PULPAR Y LESIONES PERIODONTALES**

### **1.2.1. TEJIDOS PULPARES Y PERIODONTALES**

La pulpa es un tejido conjuntivo blando ricamente vascularizado e innervado compuesto por células, sustancia intercelular, fibras reticulares y de colágeno. Está delimitado por un entorno inextensible como es la dentina, con una circulación sanguínea terminal y con una zona de acceso circulatorio de pequeño calibre en el periápice (19,20,30).

La pulpa, que es muy activa biológicamente, desempeña funciones durante todo el ciclo de vida del diente. Posee capacidad de formación de dentina, nutrición de la dentina a través de los odontoblastos, defensa ante agresiones, y función sensorial mediante las fibras nerviosas. Histológicamente la pulpa se divide en cuatro zonas diferentes: *zona odontoblástica* que se encuentra en la periferia pulpar; *zona acelular o zona de Weil*, está debajo de los odontoblastos y es muy evidente en la pulpa coronaria; *zona rica en células*, se encuentra adyacente a la zona acelular y la constituyen fibroblastos y células



mesenquimales indiferenciadas; y *zona central* que se caracteriza por la presencia de los vasos y nervios más grandes (20,21).

Cuando la pulpa de un diente primario es joven o está en proceso de rizogénesis predominan los grupos celulares, mientras que en los dientes donde se está llevando a cabo la rizólisis disminuyen las células, especialmente de los odontoblastos (20).

El periodonto es el conjunto de tejidos que dan soporte a los dientes y además los protegen. Tiene como función principal insertar el diente en el tejido óseo y mantener íntegramente la mucosa bucal. Está dividido en periodonto de protección (encía libre, encía papilar y encía insertada) y de soporte (ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar) (31).

El periodonto en la primera dentición es diferente al de la dentición permanente en varios aspectos. En primer lugar, la encía de la dentición primaria es más rojiza que la de la dentición permanente debido a que tiene mayor vascularización, además es más laxa y carece de puntilleo. Por otra parte, el ligamento periodontal en niños son más amplios y con densidad menor de fibras. El hueso alveolar es menos trabeculado y calcificado, tiene más espacios medulares, mayor irrigación sanguínea y drenaje linfático (32).

### ***1.2.2. ETIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES QUE AFECTAN LA PULPA Y EL PERIODONTO***

La afectación pulpar tiene etiología diversa. Las infecciones producidas por microorganismos anaerobios y bacterias Gram-negativas son una de las causas más importantes que pueden afectar la pulpa. Las caries, fisuras o fracturas y los defectos del desarrollo dentario son las causas más frecuentes de infección a través de la corona; los traumatismos, tanto agudos (las luxaciones, fisuras y fracturas) como iatrogénicos (preparación de cavidades o tallados dentarios); cambios bruscos de temperatura con generación de calor; el uso de instrumental rotatorio sin refrigeración adecuada; las restauraciones metálicas extensas que transmiten intensamente los cambios de temperatura, sobre todo el frío; la toxicidad de los materiales de obturación que cada vez es menor debido a la biocompatibilidad que alcanzan y cuando se produce daño pulpar por los materiales de obturación es debido a un mal sellado o a la filtración marginal (30).

En cuanto a las enfermedades perirradiculares, la etiología principal son los traumatismos dentarios que involucran la corona y/o la raíz del diente. Además, la pulpitis y la necrosis pulpar son los principales factores desencadenantes de lesiones perirradiculares (30).

Dadas las características morfológicas diferentes de los dientes primarios y los permanentes es predecible que los procesos pulpares y periapicales también difieran: en los dientes primarios, la pulpa responde con mayor rapidez a la caries dental que en los dientes permanentes (33). La respuesta



sensitiva que es desencadenada por un proceso inflamatorio en un diente temporal, es menor que en uno permanente, por lo cual los niños pueden sufrir una enfermedad pulpar grave sin presentar dolor. Se ha comprobado que esto sucede porque el número de terminaciones nerviosas disminuye cuando se acerca la exfoliación de los dientes primarios (34). En el caso del periodonto, se ha reportado que a nivel molecular es fácilmente reabsorbible porque contiene más sialoproteínas y osteoproteínas que facilitan la unión de odontoclastos (35).

La respuesta defensiva de la pulpa ante agresiones se puede llevar a cabo de dos formas dependiendo la intensidad del estímulo: cuando es ligera existe formación de dentina reparadora por parte de los odontoblastos; en cambio, cuando el estímulo es más agresivo, las células de defensa actúan desencadenando procesos inflamatorios en la pulpa (pulpitis) como quimiotaxis de neutrófilos, fagocitosis, liberación de enzimas lisosómicas y vasodilatación (20,21). Al incrementar la vasodilatación hay acumulación de líquido en el espacio intersticial, tomando en consideración que la pulpa se encuentra rodeada de dentina en un espacio inflexible y carece de circulación colateral, la presión de la pulpa dental incrementa de 5 a 14 mmHg hasta 35 mmHg, en donde el daño pulpar es irreversible por el colapso de vasos y muerte celular. El aumento de la presión pulpar comprime las terminaciones nerviosas, originando así el dolor característico en la sintomatología de la pulpitis (30,36).

Cuando hay una respuesta pulpar ante agresiones, la intensidad de ésta varía desde una lesión mínima hasta daños irreversibles como pulpitis que progresa a necrosis pulpar. Por lo general, la necrosis desencadena enfermedades del periodonto que afectan principalmente la zona inter-radicular, seguido de la zona periapical (20,37).

### ***1.2.3. DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACIÓN DE ENFERMEDADES PULPARES Y PERIRRADICULARES***

El éxito de un tratamiento pulpar depende en gran parte de la evaluación preoperatoria precisa del estado de la pulpa. Sin embargo, dar un diagnóstico certero presenta ciertas dificultades en la dentición temporal. Una de estas complicaciones es que los niños no pueden dar detalles precisos de sus síntomas. Las pruebas de sensibilidad pulpar no se deben realizar en molares primarios, ya que su respuesta a los estímulos puede carecer de precisión (37).

Las características clínicas y radiográficas del diente afectado no siempre coinciden con las condiciones histopatológicas y bacteriológicas de la pulpa. Por otra parte, es posible saber si la pulpa dentaria puede ser tratada, para lo cual es necesario realizar la historia clínica del paciente e historia del dolor, seguida de examen visual de lesiones cariosas y palpación del periodonto asociado y de los tejidos blandos cercanos a la zona. Es importante determinar si existe movilidad y el grado que presenta. En el examen radiográfico deben observarse las zonas peri e interradiculares, el espacio del ligamento periodontal y el desarrollo del diente sucesor (19,20,22,26).



Se puede determinar que un diente está pasando por un episodio de pulpitis cuando se presentan los siguientes síntomas (38):

- Historia de dolor severo, espontáneo y nocturno.
- Dolor a la masticación.
- La necesidad de analgésicos para controlar el dolor.
- Caries extensa.
- Presencia de absceso intraoral o extraoral.

Distintos autores han clasificado las enfermedades pulpares y periapicales de diversas maneras:

- Basadas en la extensión del daño pulpar (39).
  1. Pulpitis
    - a. Pulpitis irreversible
    - b. Pulpitis reversible
      - i. Pulpitis hiperplásica
      - ii. Reabsorción interna
  2. Degeneración pulpar, calcificación pulpar
  3. Necrosis
- Basado en la terapéutica pulpar (22).
  1. Exposición pulpar asintomática
  2. Pulpitis clínica
  3. Necrosis pulpar
- Basado en la condición pulpar (40).
  1. Pulpa normal
  2. Hipersensibilidad dentinaria
  3. Pulpitis reversible
    - a. Sin lesión periodontal
    - b. Con lesión periodontal
  4. Pulpitis irreversible
    - a. Sin lesión periodontal
    - b. Con lesión periodontal

Con fines descriptivos se menciona una clasificación basada en los cambios histológicos y las características clínicas de las enfermedades pulpares y lesiones periodontales (41).



### 1.2.3.1. Enfermedades pulpares

- ***Hipersensibilidad dentinaria***

Aparentemente no hay cambios histológicos. El paciente presenta dolor con estímulos térmicos, mecánicos, táctiles u osmóticos. Está asociada a dentina expuesta. El dolor es agudo, consiste en una respuesta exagerada del complejo dentinopulpar y desaparece cuando se retira el estímulo (40,41).

Los dientes primarios son menos sensibles a los estímulos debido a dos razones principales: el número y distribución de las fibras nerviosas y la degeneración nerviosa al comenzar la rizólisis (22).

- ***Pulpitis reversible***

La pulpa se encuentra vital e inflamada. Tiene capacidad de repararse una vez que se elimine el factor irritante (30).

Tiene por etiología la caries dental y procedimientos operatorios. El paciente responde ante estímulos térmicos y osmóticos (al consumir alimentos con azúcar) que desaparecen una vez que el factor irritante es eliminado (40). El dolor asociado con la pulpitis reversible es agudo, transitorio y provocado: permanece cuando se coloca el estímulo y disminuye cuando se remueve (20).

No existen cambios radiográficos evidentes en la región periapical (41).

- ***Pulpitis irreversible***

La pulpitis irreversible es el resultado de la progresión de una pulpitis reversible. La pulpa se encuentra vital e inflamada, pero no tiene capacidad de recuperarse aunque se eliminen los factores de agresión. El dolor es agudo, punzante y persiste por un tiempo prolongado después de que el estímulo se ha retirado, incluso puede ser espontáneo. Cuando los tejidos periapicales están involucrados, hay dolor a la percusión (41). Los cambios de temperatura y de presión agravan el cuadro clínico (20,30).

- ***Necrosis pulpar***

La pulpa cesa su actividad metabólica y vital. El tejido conjuntivo pulpar sufre una descomposición séptica o aséptica, por consiguiente hay destrucción de los vasos sanguíneos y linfáticos que nutren las células. Las fibras nerviosas son las últimas en degenerarse (21,42).

La progresión de la pulpa hacia la necrosis se da de la siguiente manera: la falta de circulación colateral provoca que los líquidos provenientes del proceso inflamatorio, aunado a la rigidez de la dentina, aumentan la presión en la cámara pulpar. Esto provoca destrucción progresiva de los tejidos pulpares hasta que la necrosis se instaura completamente (40).



Esta condición pulpar puede ser el resultado de daños a la pulpa. También hay degeneración pulpar en la atrofia fisiológica (en edades avanzadas) o como consecuencia secundaria de traumatismos, alteraciones oclusales, caries e inflamaciones pulpares y periodontales (40).

Generalmente, cuando un diente tiene necrosis, no existe dolor ni respuesta a estímulos. Una de las características clínicas es que la corona del diente afectado presenta un color oscuro (21).

Dependiendo la progresión de enfermedad puede encontrarse *a) necrosis pulpar sin periodonto involucrado* en donde no existen cambios radiográficos evidentes; y *b) necrosis pulpar periodonto involucrado* en donde son evidentes las lesiones radiolúcidas en la zona peri o interradicular (40).

### 1.2.3.1. Lesiones endoperiodontales

La relación entre las enfermedades pulpares y periodontales fue descrita por primera vez por Simring y Goldberg en 1964. Desde entonces, el término "lesión endoperiodontal" se emplea para describir las lesiones que surgen a partir de productos inflamatorios encontrados en diferentes concentraciones en el periodonto y lesiones pulpares (43,44).

- ***Periodontitis apical aguda***

Es una inflamación de los tejidos periodontales. Se asocia con la extensión de microorganismos de la raíz a los tejidos periapicales, aunque otra etiología son los traumatismos. El diente afectado es sensible a la percusión, hay molestia al masticar. Dependiendo la causa de la inflamación, puede haber o no respuesta en las pruebas de vitalidad. Puede producir o no dolor a la palpación. Radiográficamente el espacio del ligamento periodontal aparece ensanchado (41).

- ***Absceso perirradicular agudo***

Es una acumulación purulenta en el tejido conectivo de la zona periapical. Se caracteriza por ser una lesión dolorosa, de rápida progresión, formación de pus y con frecuencia, inflamación de los tejidos asociados. La tumefacción puede localizarse en el vestíbulo, el paladar, la superficie lingual o espacios fasciales dependiendo la localización de los ápices del diente e inserciones musculares. Existe respuesta sensitiva a la percusión y palpación. El diente no responde a las pruebas de vitalidad. En el examen radiográfico el espacio del ligamento periodontal puede encontrarse ensanchado o mostrar una radiolucidez diferente (41).

- ***Absceso perirradicular crónico***

Es una reacción inflamatoria a la infección pulpar y necrosis, de progresión lenta, asintomático en la mayoría de las ocasiones y drenajes purulentos intermitentes a través de un tracto fistuloso. Causa reabsorción ósea perirradicular que se identifica mediante un examen radiográfico como una zona



radiolúcida. La percusión y palpación no produce respuestas sensitivas. El diente involucrado generalmente responde de manera negativa ante las pruebas de sensibilidad pulpar (41).

#### **1.2.4. MICROBIOLOGÍA DE DIENTES CON NECROSIS PULPAR Y LESIONES PERIRRADICULARES**

La flora microbiana que se presenta en la pulpitis irreversible en su mayoría es de respiración aerobia y anaerobia facultativa. Conforme la enfermedad pulpar progresa, el potencial de óxido-reducción hístico presente en el ambiente disminuye y se va transformando en un medio anaerobio estricto. Con esto, el desarrollo y multiplicación microbiana se desarrolla, en especial las bacterias anaerobias. Las bacterias anaerobias estrictas Gram-negativas tienen una elevada capacidad proteolítica y colagenolítica, lo que significa que promueven la destrucción del tejido conjuntivo pulpar (30).

La presencia de diferentes bacterias involucradas en infecciones endodóncicas de dientes primarios, tales como pulpitis, necrosis pulpar y lesiones apicales han sido reportadas; no obstante, datos acerca de la microbiología de las fístulas son escasos (45,46). En un estudio sobre la prevalencia de microorganismos en canales radiculares de dientes primarios en humanos con necrosis pulpar y lesiones periapicales crónicas donde se aislaron los microorganismos presentes en 31 canales radiculares, se encontró que en el 96.6% de los canales radiculares habían microorganismos anaerobios, aunado a esto, la presencia de microorganismos aerobios estaba en el 93.5% de los canales radiculares (47). Entre los morfotipos bacterianos predominantes se encuentran los cocos Gram-positivos, seguidos de los cocobacilos Gram-negativos y bacilos Gram-positivos. Las especies bacterianas predominantes en necrosis pulpar en dientes deciduos son *Enterococcus spp.* y *P. gingivalis* (48).

#### **1.2.5. TRATAMIENTO DE DIENTES CON NECROSIS PULPAR Y LESIÓN PERIRRADICULAR**

Los objetivos del tratamiento de un diente con necrosis pulpar son 1) mantener el diente libre de infecciones, 2) realizar limpieza química-mecánica y obturación de los canales radiculares, 3) promover la reabsorción fisiológica y 4) mantener el espacio del diente sucesor. Basados en estos objetivos, el tratamiento de elección para el tratamiento de necrosis pulpar es la pulpectomía (26).

El término “pulpectomía” se refiere a la remoción de la pulpa, sin embargo en odontología pediátrica se refiere a la remoción de caries, tejido inflamado o pulpa necrótica de la cámara pulpar y conductos radiculares, seguido de la obturación de los conductos empleando un material obturador reabsorbible (49). Con fines prácticos a esta técnica también se le puede llamar tratamiento de conductos radiculares (20).



Las indicaciones para este procedimiento terapéutico son: dientes primarios con pulpitis irreversible o necrosis pulpar (50). La pulpectomía es contraindicada en dientes primarios con menos de 2/3 de raíz por resorción fisiológica, cuando el diente afectado no tiene posibilidad de restaurarse, si existe perforación en el piso de la cámara pulpar, cuando hay reabsorción interna o externa visible al realizar un examen radiográfico, si hay presencia extensa de reabsorción ósea y cuando el paciente tiene un estado de salud débil (19).

Los dientes primarios presentan algunas características anatómicas que complican la limpieza químico-mecánica de los conductos radiculares para la eliminación de las bacterias presentes *in situ*, comprometiendo el éxito del tratamiento de pulpectomía. Estas características son la complejidad y las irregularidades de los conductos, tales como múltiples forámenes accesorios que sirven como alojamiento de bacterias, divergencia marcada de los conductos y reabsorción fisiológica. Además de estas complicaciones, se debe considerar que las infecciones pulpares son de origen polimicrobiano. Dadas las contraindicaciones y las complicaciones que existen en la terapia de pulpectomía, existe una técnica simplificada llamada Técnica de Endodoncia No Instrumentada (Non Instrumented Endodontic Technique, NIET) que consiste en la colocación de antibióticos en el piso de la cámara pulpar con la finalidad de eliminar los microorganismos presentes en la cavidad y conductos (2,6,7,46,51).

### **1.3. TÉCNICA DE ENDODONCIA NO INSTRUMENTADA (NIET)**

El concepto de Técnica de Endodoncia No Instrumentada (Non Instrumented Endodontic Technique, NIET) fue desarrollada en Japón. Su mecanismo de acción se basa en el concepto de Esterilización de la Lesión y Reparación Tisular (Lesion Sterilization and Tissue Repair, LSTR) en el que menciona que cuando se eliminan las bacterias presentes en la lesión, los tejidos afectados se reparan (52).

Para el tratamiento de dientes con necrosis se requiere reducir o eliminar las bacterias con irrigantes antimicrobianos y, especialmente, utilizando materiales de obturación con acción antibacteriana de amplio espectro, buena difusión y reabsorción (2).

La colocación de pastas antibióticas en la entrada de los conductos radiculares es una alternativa para el tratamiento de dientes con necrosis pulpar. Los antibióticos eliminan las bacterias presentes en los conductos radiculares infectados (53).

#### **1.3.1. ESTERILIZACIÓN DE LA LESIÓN Y REPARACIÓN TISULAR (LSTR)**

La Unidad de Investigación en Cariología de la Escuela de Odontología en la Universidad de Niigata desarrolló en 1990 el concepto de Esterilización de la Lesión y Reparación Tisular (Lesion Sterilization and Tissue Repair, LSTR), en la cual se emplea una mezcla de antibióticos unida a un vehículo que logra la difusión del efecto antibacteriano a través de la dentina y hasta la zona periapical para la eliminación

de infecciones dentinarias, pulpares y periapicales. Se basa en que la ausencia de bacterias permite que las lesiones periodontales reparen (9,54).

La terapia LSTR es utilizada para el tratamiento de lesiones cariosas con o sin compromiso pulpar y/o periapical (44). Este procedimiento clínico es simple y no requiere múltiples citas. Está diseñado como una Técnica de Endodoncia No Instrumentada (Non Instrumented Endodontic Technique, NIET) (55).

### 1.3.2. MEDICAMENTOS EMPLEADOS

Los medicamentos empleados para NIET son tetraciclinas, metronidazol, ciprofloxacino y vehículos como el macrogol, propilenglicol y eugenol. Además de estos, se emplean otros antibióticos como amoxicilina, cefaclor, cefradina, fosfomicina, penicilina, cloranfenicol, estreptomina, neomicina y pastas de hidróxido de calcio y de clorhexidina. La pasta 3MIX-MP y la pasta CTZ son las más utilizadas para la Técnica de Endodoncia No Instrumentada (50,52,56-61).

### 1.4. CTZ

La NIET con pasta CTZ ha sido enseñada en cursos de especialización en odontopediatría en Brasil para el tratamiento de caries de la infancia. Como ya se mencionó, no requiere de la instrumentación de los canales radiculares (62,63).

El CTZ es una pasta antibiótica que se usa en el tratamiento de molares temporales con necrosis pulpar, con o sin lesiones endoperiodontales. Está compuesta por cloranfenicol, tetraciclina y óxido de zinc en una proporción 1:1:2, en el momento operatorio se le adiciona una gota de eugenol. Fue introducida por Cappiello en 1964 en Argentina. Todos los componentes del CTZ son aprobados por la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria en Brasil (ANVISA) (12,13,16,64).

#### 1.4.2 COMPONENTES

- Cloranfenicol

El cloranfenicol es un antibiótico que actúa como bacteriostático. Es de amplio espectro y activo contra bacterias Gram-positivas y negativas. Actúa inhibiendo la síntesis de proteínas bacterianas; se fija a la fracción 50S del ribosoma e impide el acceso de un aminoacil-t RNA al sitio aceptor para la incorporación de aminoácidos. De esta manera funciona como un análogo peptídico que evita la formación de enlaces peptídicos (65).

En 1947 el cloranfenicol era obtenido de *Streptomyces venezuelae*. En la actualidad el

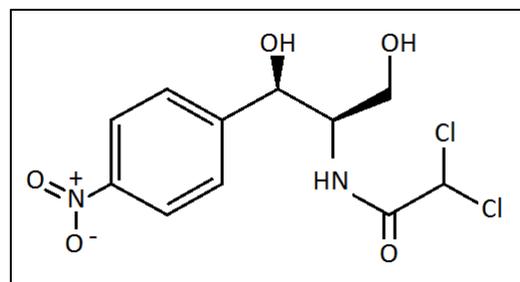


Figura 1. Fórmula química del cloranfenicol.  
Fuente propia.

producto comercial es sintético, obtenido mediante procesos químicos. Es un sólido cristalino blancoamarillento. Es muy estable en solución acuosa y resiste a la ebullición. Es muy sensible a la luz, por lo que debe protegerse de ella. La sustitución nitro bencénica en su fórmula le confiere la propiedad antibacteriana (Figura 1) (65).

- Tetraciclina

Las tetraciclinas son una clase de antibióticos que tienen un núcleo de cuatro anillos cíclicos en su estructura (Figura 2). Son sólidos débilmente hidrosolubles. Las soluciones acuosas son inestables.

Este tipo de antibiótico es principalmente bacteriostático. Se considera un antibiótico de amplio espectro, sin embargo, el uso extendido e indiscriminado ha reducido gradualmente su utilidad. Es efectivo contra cocos Gram-positivos y Gram-negativos, inhiben la mayoría de bacilos Gram-positivos, algunos bacilos Gram-negativos son sensibles a las tetraciclinas. Actúan inhibiendo la síntesis de proteínas al impedir la unión de la cadena de péptidos (65).

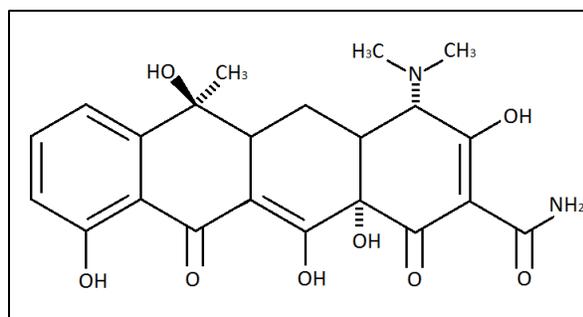


Figura 2. Fórmula química de la tetraciclina.  
Fuente propia.

- Óxido de Zinc y eugenol

El cemento de óxido de zinc y eugenol ha sido ampliamente utilizado como material de obturación de raíces en dientes primarios. Tiene actividad antibacteriana por sí mismo, sin embargo no puede considerarse un material de obturación ideal, ya que esta actividad es limitada y no es suficiente para eliminar completamente la microbiota de los sistemas radiculares. Como desventaja, tiende a reabsorberse más lento que las raíces de los dientes primarios y presenta cierta toxicidad cuando tienen contacto con otros tejidos (66–68).

El óxido de zinc está compuesto de un 69% de polvo de óxido de zinc (obtenido de la oxidación del metal, mediante descomposición por descomposición térmica), 29.3% de resina, 1% de estearato de zinc y 0.7% de acetato de zinc el cual funciona como catalizador del fraguado. El eugenol (2-metoxi-4-alil-fenol) es un ácido eugénico o carifílico, líquido, oleoso. Es un compuesto aromático generalmente extraído de *Syzygium aromaticum*. Tiene un efecto analgésico importante (69–72).

Cuando se mezclan el polvo de óxido de zinc con en eugenol se da una reacción ácido-base, dando una sal, además de agua. Durante este proceso, los iones de hidrógeno fenólico presentes en el eugenol se sustituyen por iones de zinc, formato eugenolato de zinc, el cual es un quelato débil. A diferencia de los cementos de fosfato de zinc, esta reacción de fraguado es debilmente exotérmica (72).



#### **1.4.4 INDICACIONES**

La pasta CTZ es empleada principalmente en dientes con necrosis pulpar con o sin lesiones endoperiodontales. Es usada para los dientes que muestran presencia de resorción radicular externa o interna y que no es viable para realizar la terapia endodóncica convencional. Se emplea la técnica para múltiples caries, sobre todo en niños con conducta negativa o poco cooperadores. En el caso de otras pastas antibióticas como 3MIX-MP se puede emplear para el tratamiento de pulpitis irreversible en molares permanentes jóvenes como tratamiento de apicoformación y para tratar molares primarios con pulpitis irreversible (52,73,74).

#### **1.4.5 VENTAJAS Y DESVENTAJAS**

Las principales ventajas del uso de la pasta CTZ en el tratamiento de necrosis pulpar de dientes primarios es que la técnica es mínimamente invasiva, tiene un costo bajo, emplea antibióticos en su composición con lo cual la cantidad de bacterias en los conductos radiculares disminuye, además permite realizar el procedimiento en una cita. Con esta técnica se eliminan las bacterias aisladas en los conductos radiculares, además de que penetra en los conductos accesorios. Presenta un éxito clínico alto de acuerdo a varios estudios in vivo (15,52,74).

Una de las desventajas es que existe poca información acerca de ésta técnica para que su uso clínico sea fundamentado. Los efectos secundarios y reacciones alérgicas a los antibióticos. Pueden aparecer cepas resistentes a los antibióticos (15,52,74).

#### **1.4.6 TÉCNICA**

La NIET con la pasta antibiótica CTZ se lleva a cabo bajo anestesia local y aislamiento absoluto con dique de hule y grapa. En primer lugar se elimina el esmalte y dentina cariados, posteriormente se realiza el acceso a la cámara pulpar. Se irriga la cámara pulpar y los conductos radiculares con hipoclorito de sodio al 0.5% (solución Dakin) y se aspira con una cánula de alta succión. Posterior a la irrigación, se seca la cavidad y los conductos con puntas de papel. Se realiza la mezcla del polvo de CTZ con una gota de eugenol, obteniendo una pasta de consistencia ligera y de color amarillo claro. Se debe colocar la pasta en el piso de la cámara pulpar según la técnica de LSTR. Finalmente se coloca una obturación definitiva (11,16,74,75).

#### **1.4.7 BIOCOMPATIBILIDAD**

Se sabe que la biocompatibilidad de un material endodóncico es determinado por tres métodos: la evaluación del material mediante series de pruebas *in vitro*, implantación subcutánea o intraósea del material para observar la reacción tisular local, y la evaluación *in vivo* de cualquier reacción al material mediante pruebas pre-clínicas en animales y clínicas en humanos (4).



Los medicamentos utilizados en las cámaras pulpares de los dientes primarios deben tener acción inmediata local, por lo tanto, deben tener poca toxicidad y no deben difundirse a través de los tejidos circundantes (76).

El CTZ tiene en su composición dos antibióticos: tetraciclina y cloranfenicol, los cuales son conocidos por presentar efectos colaterales o que pueden comprometer su uso como pasta antibiótica en odontopediatría. Debido a que los fármacos colocados en la cámara pulpar de los dientes primarios deben tener acción inmediata local, deben tener baja toxicidad y no deben difundirse a través de otros tejidos esenciales (76,77).

## **1.5. TÉCNICAS DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y GRUPOS FUNCIONALES DEL CTZ.**

### ***1.5.1. TÉCNICA DE DIFUSIÓN EN AGAR***

Los métodos disponibles en la actualidad para la detección de actividad antimicrobiana de diversos productos se encuentran clasificados en tres grupos: antibiograma que está indicado para identificar resistencia a antibióticos a partir de bacterias aisladas clínicamente; la dilución que está indicado para conocer la concentración inhibitoria mínima y se realiza mediante la comparación inicial y final de un inóculo bacteriano previamente estandarizado; y el método de difusión en agar. Esta técnica fue desarrollada en 1940 y es empleada comúnmente para el estudiar el efecto antibacteriano de extractos de plantas, aceites esenciales y otros medicamentos. Ésta técnica tiene ventajas como la simplicidad del método, bajo costo, la facilidad de la interpretación de resultados, la capacidad de analizar un gran número de microorganismos y agentes antimicrobianos (78-80).

La técnica de difusión en agar consiste en colocar en la superficie de agar previamente inoculada con una especie microbiana, discos de papel filtro de 6 mm de diámetro aproximadamente, que han sido impregnados con el antibiótico a estudiar. La caja de agar es incubada. Generalmente, el agente antimicrobiano se difunde a través del agar, inhibiendo el crecimiento de los microorganismos estudiados. Transcurridas 18-24 horas de incubación, los discos se rodean de una zona donde no hay crecimiento bacteriano (zona de inhibición bacteriana). Posteriormente, los diámetros de las zonas de inhibición son analizadas (79,81).

En la literatura se han encontrado estudios comparativos sobre la efectividad antibacteriana de pastas antibióticas y obturadoras empleadas en el tratamiento de pulpectomías y NIET. En ellos se realiza la técnica de difusión por agar con los microorganismos *Staphyococcus aureus*, *Enterococcus Faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacilus subtilis*, *Candida albicans* (82-84). Tomando en cuenta lo anterior, las especies más utilizadas en este tipo de pruebas son:



- ***Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo aerobio Gram-negativo, considerado como un patógeno oportunista. Usualmente, las cepas se mueven gracias a un flagelo único polar. Tienen un tamaño de 0.5-0.8  $\mu\text{m}$  por 1.5-3.0  $\mu\text{m}$  (85). Puede ser aislada de múltiples nichos ambientales, como el agua, aceite, plantas, animales y humanos. También es un agente clínico importante que causa un gran número de lesiones agudas y crónicas. Presenta resistencia natural a un gran número de antibióticos y antisépticos, por lo cual se torna una de las principales causas de infecciones hospitalarias y diversas infecciones endodóncicas recurrentes. Ha sido aislada de infecciones orales, tales como la angina de Ludwig (86-88).

- ***Staphylococcus aureus***

La familia de *Staphylococcus* son cocos Gram-positivos que se caracterizan por agruparse en más de un plano con forma similar a un racimo de uvas. Tiene un diámetro de 0.5-1.5  $\mu\text{m}$ . No tienen motilidad y no son formadoras de esporas. Son aerobios facultativos que crecen por respiración aerobia. La especie llamada *aureus* se refiere al hecho de que las colonias tienen un color amarillo oro cuando crecen en medios sólidos (89,90). Es un patógeno común en el humano que causa diversas infecciones en piel y mucosas. Además de las infecciones superficiales, interviene en la formación de abscesos, septicemia, neumonía, osteomielitis y gastroenteritis (91).

- **1.5.3 *Enterococcus faecalis***

*Enterococcus faecalis* es un coco anaerobio facultativo Gram-positivo que puede encontrarse sola, en pareja o en pequeñas cadenas (92).

Normalmente, *E. faecalis* se encuentra en el tracto gastrointestinal de los seres humanos y otros mamíferos. Esta bacteria puede causar infecciones intrahospitalarias, se encuentra en un 30-90% de casos de infecciones secundarias. Esta bacteria se ha aislado de las raíces de los dientes afectados por lesiones periapicales persistentes. Las infecciones endodóncicas con *E. faecalis* probablemente no son derivadas de la microflora propia del paciente, sino que se trata de una infección de origen exógeno (88,93-95).

- **1.5.4 *Escherichia coli***

*Escherichia coli* es una bacteria entérica, bacilo Gram-negativo. Tiene un tamaño de 0.7-1.5 por 2-5  $\mu\text{m}$ . Por lo regular, este microorganismo coloniza el tracto gastrointestinal de los niños recién nacidos. Usualmente, *E. coli* coexiste con el hospedero con normalidad. Estos comensales en ocasiones aisladas causan enfermedad, a excepción de los casos de hospederos inmunocomprometidos o cuando la barrera gastrointestinal está rota, tal es el caso de la peritonitis. A pesar de que *E. coli* es una bacteria



propiamente entérica, se han reportado estudios donde se ha aislado esta cepa bacteriana en pacientes con prótesis removibles y el paladar y lengua de pacientes regulares (96–98).

### ***1.5.2. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO***

La espectroscopía óptica consiste en la interacción de un haz de radiación electromagnética con un analito, del cual se requieren determinar sus características. Como consecuencia de esta interacción, el haz saliente es diferente al entrante, y a partir de este último, se puede obtener información sobre la estructura del sistema a estudiar (99).

La región infrarroja del espectro electromagnético se encuentra entre  $12800\text{-}10\text{ cm}^{-1}$  y ésta se puede dividir en tres zonas: Infrarrojo cercano (NIR  $12800\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ ), Infrarrojo medio ( $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ ) e Infrarrojo lejano ( $400\text{-}10\text{ cm}^{-1}$ ); siendo el Infrarrojo con más aplicaciones analíticas (100–102).

Un espectro infrarrojo es obtenido al pasar radiación a través de un analito para determinar qué fracción de esta radiación incidente ha sido absorbida por la muestra. La interacción de la radiación infrarroja con el analito provoca una alteración en el mismo que guarda relación con el estado de vibración de las moléculas. La energía a la que aparece cada pico de un espectro guarda relación con la frecuencia de vibración de una parte de la molécula. Cada molécula tiene un espectro vibracional único que tiene características que las diferencian de las demás. De esta manera, una de las múltiples aplicaciones del espectro infrarrojo es para identificar las muestras desconocidas mediante la comparación de espectros de referencia (100–102).



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. ESTUDIOS *IN VITRO*

Guedes de Amorim y cols. Realizaron un estudio en 2006 con una mezcla de microorganismos (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus Faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*), comparando la acción antimicrobiana contra cada uno de ellos, usando las pastas Guedes-Pinto, ZOE, Hidróxido de calcio, CTZ y Vitapex. Se observó la inhibición transcurridas 1, 24, 48 y 72 horas. Los resultados obtenidos fueron que todas las pastas mostraron inhibición de crecimiento a partir de las 24 horas. La pasta CTZ mostró tener mayor diámetro de inhibición en la mezcla de bacterias, seguido de la pasta Guedes-Pinto y ZOE. Se observó una mayor inhibición de bacterias *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans*, mientras que el ZOE inhibió con mayor eficacia el cultivo de *E. faecalis* (82).

Piva en 2008 realizó un estudio comparativo de la capacidad antimicrobiana *in vitro* de las pastas Guedes-Pinto, CTZ, ZOE, Calen, Mta y L&C de una mezcla de microorganismos (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus Faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*) con el método de exposición directa, en el cual se evaluó si existía crecimiento bacteriano o no a las 24, 48 y 72 horas. Los resultados mostraron que la pasta CTZ inhibió el crecimiento, al igual que el MTA. Las pastas restantes mostraron ineficacia antibacteriana (83).

Debido a la inespecificidad de este estudio, Piva en 2009 realizó una comparación entre las mismas pastas con la mezcla de microorganismos mencionados anteriormente, sin embargo, el método empleado fue difusión en agar para medir la zona de inhibición de cada material a las 48 horas de incubación. Los resultados mostraron una zona de inhibición de las pastas Guedes-Pinto y CTZ significativamente mayor que las demás pastas (84).

### 2.2. ESTUDIOS CLÍNICOS

Los primeros estudios clínicos de la aplicación del CTZ comenzaron a partir de 1964 con la aportación de Capiello y Soller, quienes realizaron un estudio en 100 pacientes entre 2 y 5 años de edad que presentaban dientes primarios con indicación de terapia pulpar. En los tratamientos de Terapia de Esterilización de la lesión y Reparación Tisular realizadas con CTZ el autor relató no haber observado ningún tipo de alteración clínica o radiográfica. Las necropulpectomías con CTZ mostraron resultados clínicos y radiográficos satisfactorios a corto plazo, con involución de fístula y dolor, disminución de movilidad y retorno de la función masticatoria. A los siete meses de control no fue observada ningún tipo de alteración patológica en los dientes tratados con CTZ (16).



En 1965 un estudio realizado en Brasil por Walther se utilizó pasta CTZ en molares primarios con necrosis pulpar. Se observó un 70% de éxito en las intervenciones clínicas, considerando éxito clínico aquellos dientes que al menos 6 meses después del tratamiento no presentaron recidiva del proceso infeccioso, alteraciones clínicas visuales de los tejidos periodontales y de soporte, así como la desaparición de la lesión clínica inicial (14).

En 2006 Chagas de Oliveira realizó un estudio en la Unidad de Salud de la Familia de Goianésia, Brasil, en el cual realizó una cita de revisión a 18 niños que habían sido tratados con pulpotomía con CTZ de 10 a 39 meses atrás, analizando un total de 20 molares primarios. Los criterios para considerar éxito en el tratamiento fueron ausencia de dolor, de movilidad patológica, de absceso y ausencia de fístula. Considerando estas características se obtuvo 83.3% de éxito (10).

González Núñez realizó un estudio clínico en 2010, en el cual realizó NIET con pasta CTZ en un paciente de 8 años con diagnóstico de necrosis pulpar del órgano dentario 85 y absceso. Transcurridos dos meses después del tratamiento, el control radiográfico revela remisión de la lesión radiolúcida. A los 7 meses del tratamiento, clínicamente el molar se encontraba asintomático, sin movilidad y en función masticatoria normal. Radiográficamente se observó aposición ósea en el área de la furca, además ausencia de resorción radicular patológica y/o lesión periapical crónica (13).

Un estudio realizado en 2014 por Pérez Hernández PE realizado en 53 dientes de pacientes de 4-8 años comparó el éxito del tratamiento de la técnica convencional contra la NIET con 6 meses de seguimiento. Los resultados sugieren que la efectividad clínica de la pasta CTZ es similar a lo obtenido con la técnica convencional (15).



# CAPÍTULO 2

---

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La pasta antibiótica CTZ ha demostrado en varios estudios su efectividad clínica en el tratamiento de dientes primarios con necrosis pulpar y lesiones perirradiculares (10,13–16). El uso del CTZ en la NIET tiene diversas ventajas, tales como la mínima invasión, bajo costo, eliminación de bacterias y tiempo de trabajo corto. Sin embargo, una de sus principales desventajas, es que existe poca información sobre la pasta para que su uso clínico sea fundamentado (15,52,74).

Los fármacos utilizan especificaciones de empaquetado para su distribución con la finalidad de que conserven sus propiedades físicas y químicas hasta la fecha de caducidad sugerida. Debido a que el CTZ se prepara a partir de la presentación comercial de antibióticos y es almacenado hasta su uso clínico, pueden existir cambios en la estructura de los componentes por las condiciones bajo las cuales se almacena el CTZ (103,104).

La Universidad Peruana Cayetano Heredia indica en un manual de procedimientos que el CTZ puede almacenarse en un frasco ámbar durante dos semanas, sin embargo no justifica por qué se almacena en estas condiciones. Probablemente este hecho se deba a que los antibióticos que se emplean para el polvo de CTZ son fotosensibles (10,104).

Aunque desde 1964 fue sugerido el uso de la pasta CTZ por Cappiello y Soller en la Técnica de Endodoncia No Instrumentada, no existen estudios recientes que demuestren su efectividad *in vitro* con diferentes variables tales como el tiempo de almacenamiento y las características en las que éste se lleva a cabo (4,16,82–84).

## 2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿En qué medida el tiempo de almacenamiento y la exposición a la luz ambiental afectan la actividad antimicrobiana del compuesto CTZ?



### 3. JUSTIFICACIÓN

La presente investigación se relaciona con la terapéutica pulpar en dientes primarios con necrosis pulpar y lesión perirradicular. El tratamiento de pulpectomía es la principal opción terapéutica para los dientes con ésta condición patológica, sin embargo, el éxito de la misma se ve comprometido por la complejidad y las irregularidades de la anatomía interna de los dientes que impiden la eliminación de las bacterias presentes *in situ*. Debido a las complicaciones que existen en la terapia de pulpectomía, existe la Técnica de Endodoncia No Instrumentada (NIET) que consiste en la colocación de una pasta antibiótica en el piso de la cámara pulpar sin la necesidad de realizar limpieza químico-mecánica de los conductos radiculares (2,6,7,46,51).

La técnica es menos invasiva comparada con la pulpectomía, es de bajo costo, con antibióticos en su composición y que permite realizar el procedimiento en una sola cita. Sin embargo existe poca información acerca de esta técnica disponible en la literatura para que su uso clínico sea fundamentado (15). En contraste, se ha empleado clínicamente y se han obtenido resultados favorables en el caso del tratamiento de necropulpectomías, fístulas y abscesos periapicales (10,13-15).

Las indicaciones de uso del CTZ, son enseñadas en su mayoría en universidades de Brasil a los estudiantes de la especialidad de odontología pediátrica. También es empleada en el Programa de la Especialidad de Odontopediatría de la UNAM y en programas de salud comunitaria para los casos de caries severa en pacientes pediátricos, y probablemente en otras escuelas de odontología en Latinoamérica, sin embargo no se han reportado en la literatura (13).

Es necesario realizar estudios que fundamenten el uso del CTZ y el éxito clínico que representa. Con esto se puede aumentar el nivel de evidencia para emplear este compuesto antibiótico como una de las principales terapéuticas para dientes con necrosis pulpar y lesión perirradicular, ya que por el momento, no se encuentra como una opción de tratamiento en las clasificaciones de terapéutica pulpar para dientes primarios.

Los resultados obtenidos en esta investigación pretenden estandarizar la preparación del CTZ, las condiciones y el tiempo de almacenamiento que garantice la eficacia antibacteriana. De esta forma se podrá almacenar el compuesto durante mayor tiempo, evitando su preparación continua, economizando el procedimiento.



## 4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antibacteriana del compuesto CTZ en función del tiempo de almacenamiento y su exposición a la luz ambiental durante un periodo de 4 meses a partir de su preparación mediante un estudio *in vitro*.

## 5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar en periodos de quince días, durante 4 meses, la eficacia antimicrobiana del compuesto CTZ almacenado.
- Evaluar la eficacia inhibitoria del CTZ en función de su exposición parcial y total a la luz ambiental.
- Evaluar el efecto antimicrobiano del compuesto CTZ en las especies bacterianas *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* considerando sus características biológicas.
- Evaluar mediante espectroscopía de infrarrojo la presencia de grupos funcionales del compuesto CTZ a través del tiempo y por efecto de la luz ambiental.
- Estandarizar la preparación del compuesto CTZ y las condiciones de almacenamiento para su uso clínico.

## 6. HIPÓTESIS

La actividad antimicrobiana del compuesto CTZ se ve afectada por efecto del tiempo y la exposición a la luz resultando en menores zonas de inhibición y modificación de la formulación química del compuesto cuando se utiliza por más de 2 semanas de haberse preparado y se almacena en contenedores transparentes.



# CAPÍTULO 3

---

## 1. METODOLOGÍA

### 1.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Experimental longitudinal. Se evaluó la actividad antibacteriana del CTZ durante un periodo de 4 meses a partir de su preparación.

### 1.2. VARIABLES

- **DEPENDIENTES**
  - Zonas de inhibición bacteriana.
  - Presencia de grupos funcionales.
- **INDEPENDIENTES**
  - Tiempo de almacenamiento
  - Exposición parcial y total a la luz ambiental (frasco color ámbar y frasco transparente).

La operacionalización de las variables se muestra en la Tabla 1.

### 1.3. UNIVERSO DE TRABAJO

Pasta CTZ (compuesta por cloranfenicol, tetraciclina y óxido de zinc en proporción 1:1:2).

Especies bacterianas American Type Culture Collection (ATCC):

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Staphylococcus aureus* ATCC 12598
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- *Escherichia coli* ATCC 25922



VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ESCALA DE MEDICIÓN
Zonas de inhibición bacteriana	Zona alrededor de un disco antibiótico en un antibiograma en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada.	Zona alrededor del disco de CTZ en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada con cuatro especies bacterianas.	Milímetros (mm).
Presencia de grupos funcionales	Conjunto de átomos, enlazados de una determinada forma, que presentan una estructura y propiedades físico-químicas determinadas que caracterizan a los compuestos que los contienen.	Estudio de cambios en las uniones químicas de los compuestos del CTZ.	Número de onda en el desplazamiento FT-IR y Raman ( $\text{cm}^{-1}$ ).
Tiempo de almacenamiento	<i>Almacenar</i> .- Guardar cosas en un almacén u otro lugar. <i>Tiempo</i> .- Período determinado durante el que se realiza una acción, <i>Tiempo de almacenamiento</i> .- Período determinado durante el que se acumula un objeto dentro de una cosa o lugar.	Período durante el cual se almacenará el CTZ en dos tipos de contenedores diferentes.	Semanas.
Exposición parcial y total a la luz ambiental.	<i>Exponer</i> .- Colocar a alguien o algo para que reciba la acción de un agente. <i>Luz ambiente</i> .- la luz que está naturalmente disponible.	Recipiente en el cual se almacenará el CTZ.	Frasco de vidrio color ámbar (exposición parcial) y frasco de vidrio transparente (exposición total).

**Tabla 1. Operacionalización de las variables.**

## 1.4. CRITERIOS DE SELECCIÓN

### • CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Especies bacterianas ATCC: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*.
- CTZ: Cloranfenicol en cápsulas de 250 mg, Tetraciclina en cápsulas de 500 mg, Óxido de Zinc sin endurecedor de uso odontológico.

### • CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Especies bacterianas obtenidas de aislados clínicos.
- Antibióticos y ZOE con fecha de caducidad anterior a 7 meses a partir de la preparación inicial para el comienzo del estudio.



- **CRITERIOS DE ELIMINACIÓN**

- Preparaciones de la pasta CTZ con mayor fluidez o viscosidad de la consistencia adecuada.
- Cultivos contaminados

### 1.5. TAMAÑO DE MUESTRA

3 discos de sensibilidad impregnados con CTZ por cada cultivo de bacterias y por cada control (Tabla 2). Se realizaron las pruebas cada dos semanas durante 4 meses (Tabla 3).

No. Preparado	PREPARADO 1		PREPARADO 2	
Tipo de frasco	Ámbar	Transparente	Ámbar	Transparente
<i>P. aeruginosa</i>	3	3	3	3
<i>S. aureus</i>	3	3	3	3
<i>E. faecalis</i>	3	3	3	3
<i>E. coli</i>	3	3	3	3
Total de discos por prueba		48		

*Tabla 2. Cantidad de discos de sensibilidad de CTZ por prueba quincenal.*

SEMANA	Inicial	2	4	6	8	10	12	14	16	DISCOS TOTALES
CANTIDAD DE DISCOS	48	48	48	48	48	48	48	48	48	432

*Tabla 3. Suma de los discos de CTZ utilizados en cada prueba*

### 1.6. MATERIALES

- Incubadora de cultivo INCUCCELL MMM Group.
- Incubadora con agitación Thermo Scientific.
- Gabinete de bioseguridad Thermo Scientific.
- Espectrofotómetro Multiskan GO.
- Autoclave CRISTÓFOLI.
- Vernier electrónico digital Control Company
- Medios de cultivo:
  - Agar Mueller-Hinton OXOID. Inglaterra. Lote 1419373.
  - Caldo Mueller-Hinton DIFCO. Francia. Lote 2319300.
- Componentes del CTZ:
  - Cloranfenicol Laboratorio LIFERPAL MD®. Lote 15G092. Caducidad Agosto 2020.
  - Tetraciclina Laboratorio ARLEX®. Lote 5071353. Caducidad Julio 2017.

- Óxido de Zinc sin endurecedor VIARDEN®. Lote 970115. Caducidad 19 de Enero de 2018.
- Eugenol VIARDEN®. Lote 730714. Caducidad 24 de Julio de 2016
- Consumibles: Cajas Petri, guantes, campos, pipetas estériles desechables, cubrebocas, discos de papel filtro, puntas de micropipeta, isopos.

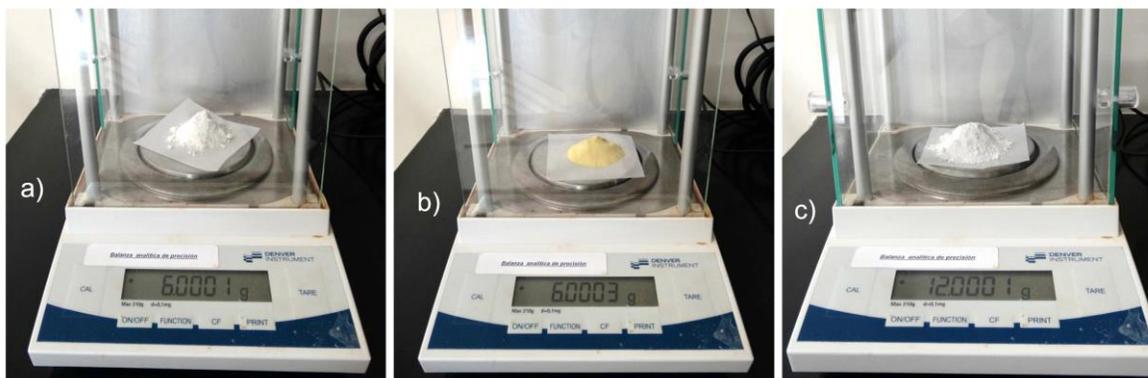
## 1.7. MÉTODO

### 1.7.1. PREPARACIÓN DE CTZ

La pasta antibiótica CTZ se preparó a partir de la presentación farmacológica comercial del cloranfenicol y tetraciclina en cápsulas de 250 mg y 500 mg respectivamente. Se empleó óxido de zinc sin acetato de zinc, el cual funciona como endurecedor (Figura 3). De acuerdo a lo mencionado por Costa y cols (103). (cloranfenicol, tetraciclina y óxido de zinc en proporción 1:1:2) se pesaron 6 gramos de cloranfenicol, 6 gramos de tetraciclina y 12 gramos de óxido de zinc y se mezclaron para obtener 24 gramos de CTZ para el grupo *PREPARADO 1* (Figura 4). Posteriormente se dividieron 20 gramos de CTZ para el estudio microbiológico y 4 gramos para el estudio de espectroscopía.



**Figura 3. Medicamentos empleados para la elaboración del CTZ. a) Cloranfenicol en cápsulas de 250 mg. b) Tetraciclina en cápsulas de 500 mg. c) Óxido de Zinc sin endurecedor.**



**Figura 4. Pesado de los componentes del CTZ con balanza analítica a) Cloranfenicol. b) Tetraciclina. c) Óxido de Zinc**

El CTZ obtenido para cada estudio se dividió a la mitad y se colocó una parte en un frasco de vidrio color ámbar y en uno transparente. Se realizó el mismo procedimiento para realizar el *PREPARADO 2*. Se obtuvieron los grupos que se muestran en la Tabla 4, en donde los códigos *M* y *E* pertenecen al tipo de estudio: microbiológico y de espectroscopía, respectivamente; el código *1* y *2* pertenecen al número

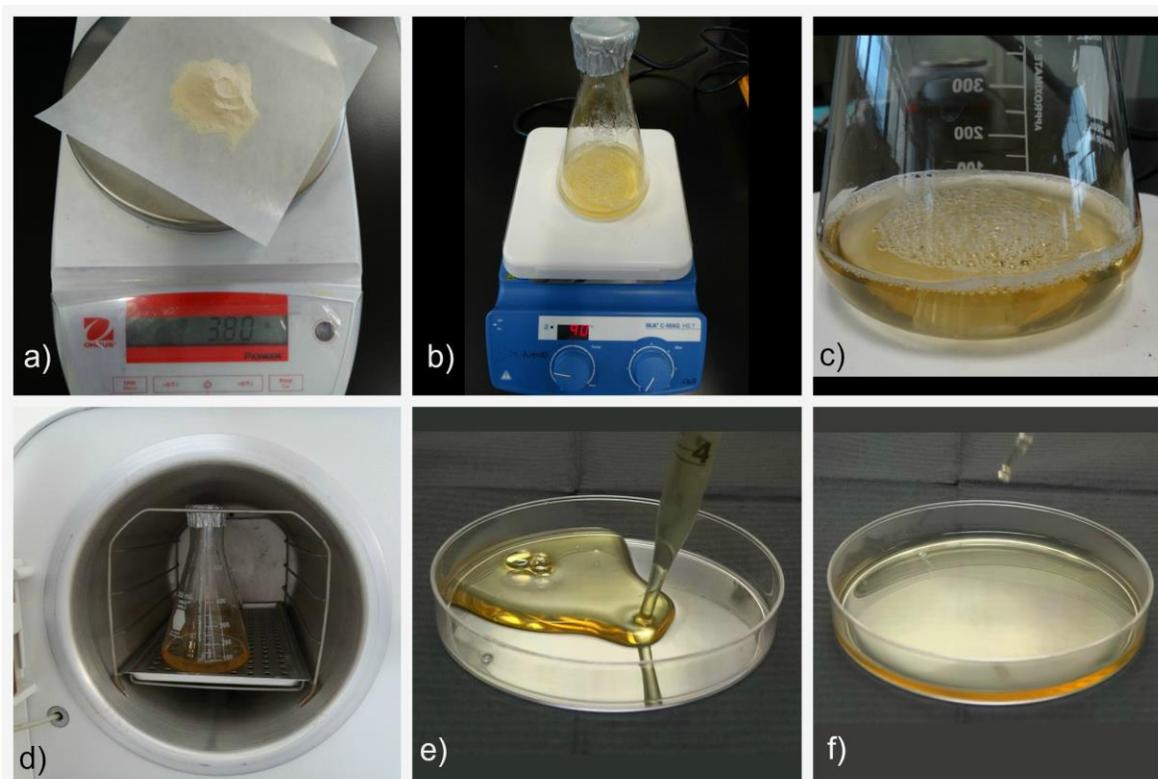
de preparado; finalmente los códigos *A* y *T* pertenecen al tipo de frasco: ámbar o transparente, respectivamente. Los grupos de muestra obtenidos se almacenaron para la realización del estudio antimicrobiano y de espectroscopía cada dos semanas.

No. Preparado	PREPARADO 1				PREPARADO 2			
	MICROBIOLOGÍA		ESPECTROSCOPIA		MICROBIOLOGÍA		ESPECTROSCOPIA	
Tipo de Frasco	Ámbar	Transparente	Ámbar	Transparente	Ámbar	Transparente	Ámbar	Transparente
Código	M1A	M1T	E1A	E1T	M2A	M2T	E2A	E2T

*Tabla 4. Grupos de estudio con los códigos correspondientes.*

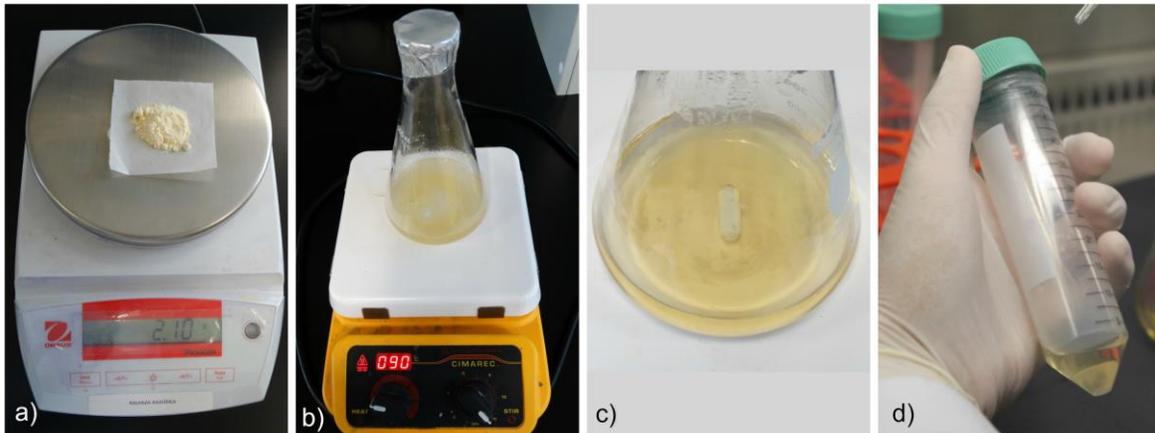
### 1.7.2. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

- **Preparación de agar Mueller-Hinton:** Se disolvieron 3.8 g de agar Mueller-Hinton por cada 100 ml de agua destilada en un matraz y se introdujo un agitador magnético. Se colocó el matraz en una placa de agitación magnética y calentamiento a 80°C y se dejó 1 minuto en ebullición hasta lograr una solución homogénea. Se esterilizó en autoclave (134°C, 2 atm de presión). Se colocaron 5 ml de agar por cada caja Petri de 6 cm de diámetro; en las cajas de 10 cm de diámetro se colocarán 10 ml. Después de que gelificaron, se rotularon y se sellaron para guardar en refrigeración (Figura 5).



*Figura 5. Preparación de medios de cultivo de agar Mueller-Hinton. a) Pesado del polvo. b) calentamiento con agitación. c) Solución de agar uniforme. d) Esterilizado del agar. e) Vaciado del agar en caja Petri. f) Placa de agar gelificada.*

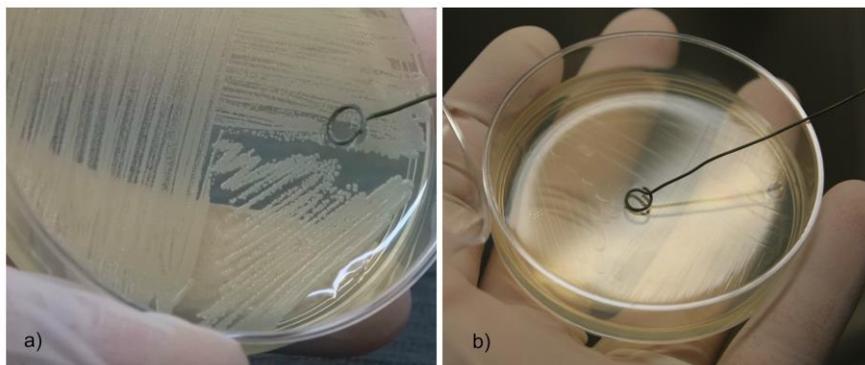
- **Preparación de caldo Mueller-Hinton:** Se disolvieron 2.1 g de caldo Mueller-Hinton por cada 100 ml de agua destilada en un matraz y se introdujo un agitador magnético. Se colocó el matraz en una placa de agitación magnética y calentamiento a 80°C y se dejó 1 minuto en ebullición hasta lograr una solución homogénea. Se esterilizó en autoclave (134°C, 2 atm de presión). Se colocó el caldo en tubos falcon estériles. Se rotularon y se sellaron con cinta para guardar en refrigeración (Figura 6).



**Figura 6. Preparación de medio de cultivo de caldo Mueller-Hinton. a) Pesado del polvo. b) calentamiento con agitación. c) Solución de caldo uniforme. d) Vaciado de caldo en tubos falcon.**

### **1.7.3. SEMBRADO DE CULTIVO DE 24 HORAS.**

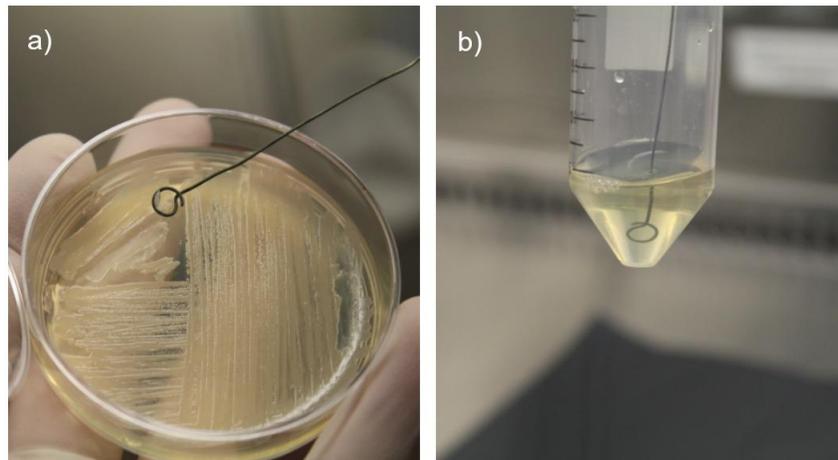
Con un asa sembradora se tomó de 2 a 3 colonias bacterianas aisladas con la misma morfología y diámetro de una especie bacteriana previamente identificada y se resembró en un medio de cultivo en placa de agar mediante la técnica de sembrado por estrías. Se rotuló y se selló con cinta. Se realizó este procedimiento para cada una de las especies *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli*. Se incubaron las cajas Petri a 37°C durante 24 h. *E. faecalis* se incubó en una cámara de anaerobios (Figura 7).



**Figura 7. Sembrado de cultivo de 24 horas. a) Cultivo previamente identificado. b) Sembrado de cultivo mediante estriado**

#### **1.7.4. PREPARACIÓN DE INÓCULO Y ESTANDARIZACIÓN DE SUSPENSIÓN**

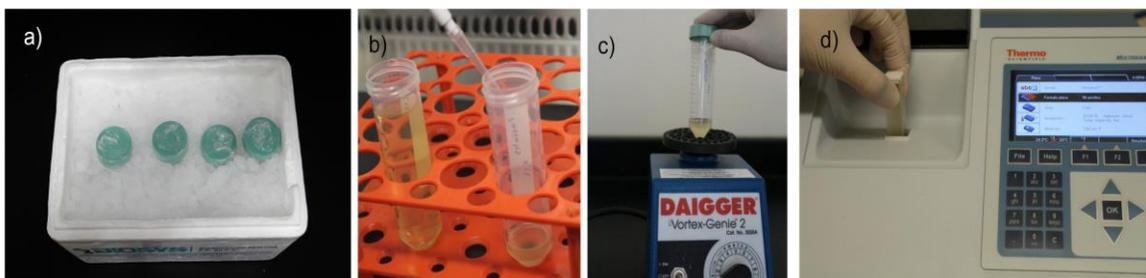
Para la preparación de los cuatro inóculos de cultivo se realizó el método de cultivo líquido o de Kirby-Bauer. Con un asa sembradora se tomaron de 2 a 3 colonias bacterianas aisladas con la misma morfología y diámetro del cultivo realizado máximo 24 horas antes. Se colocó en 5 ml de caldo Mueller-Hinton dentro de un tubo falcon estéril (Figura 8). Se rotuló y se selló con cinta parafilm. Se realizó este procedimiento con las cuatro especies bacterianas. Los 4 tubos se colocaron en una incubadora a 37°C con oscilación de 200 rpm durante 18 h.



**Figura 8 Preparación de inóculo. a) Recolección de bacterias con asa sembradora. b) Suspensión de las colonias bacterianas en caldo.**

Transcurridas 18 horas de incubación con oscilaciones, las 4 suspensiones se mantuvieron en hielo para detener el crecimiento bacteriano. Se ajustaron las suspensiones bacterianas empleando caldo Mueller-Hinton estéril como blanco y para diluir la suspensión al patrón de turbidez 0.5 de McFarland (equivalente a  $1 \times 10^8$  UFC/mL), agitando la suspensión antes de ser medida con la ayuda de espectrofotometría con las siguientes longitudes de onda para cada bacteria (Figura 9):

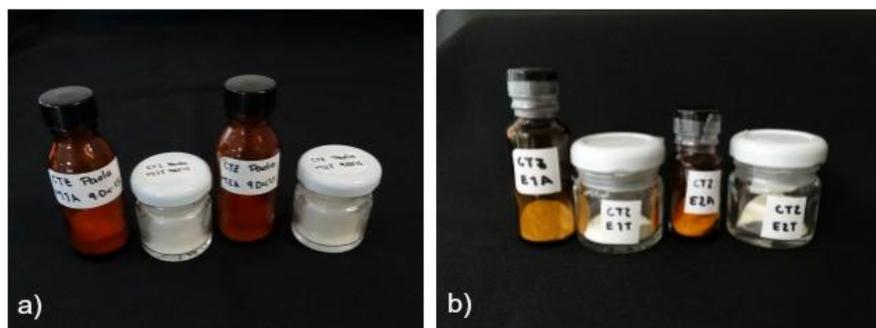
- *Pseudomonas aeruginosa* 625 nm.
- *Staphylococcus aureus* 570 nm.
- *Enterococcus faecalis* 540 nm.
- *Escherichia coli* 625 nm.



**Figura 9. Estandarización de suspensión. a) Suspensiones madre en hielo. b) Dilución de la suspensión con caldo Mueller-Hinton estéril. c) Agitación de la suspensión. d) Lectura de densidad óptica con espectrofotometría.**

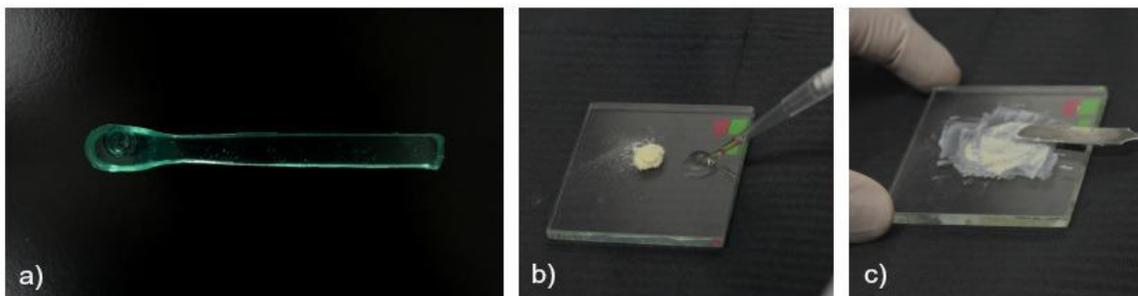
### 1.7.5. ENSAYO ANTIMICROBIANO

Para el estudio microbiológico se realizaron dos preparados de 24 g cada uno respetando las proporciones mencionadas anteriormente, de la cual, se almacenaron 10 g en un frasco de vidrio ámbar y 10 g en un frasco de vidrio transparente (posteriormente se tomaron 2 g de cada grupo para el análisis de espectroscopía de infrarrojo) (Figura 10).



**Figura 10. Frascos de almacenamiento de los grupos de CTZ a) para estudio microbiológico y b) para estudio de espectroscopía.**

Del preparado obtenido se tomaron 55 mg con la ayuda de una cucharilla de acrílico prefabricada (Figura 11) y se mezclaron con 35  $\mu$ l de eugenol en el momento de realizar los cultivos y los discos de sensibilidad.



**Figura 11. Preparación del CTZ. a) Cucharilla de acrílico. b) Compuesto CTZ con eugenol. c) Mezcla de los componentes.**

El método utilizado fue la prueba de exposición directa, en la cual se colocó la solución ajustada al patrón de turbidez 0,5 de McFarland de una bacteria (200  $\mu$ l para cajas de 6 cm de diámetro y 400  $\mu$ l para cajas de 10 cm de diámetro) y se sembraron con la técnica de estriado con un hisopo estéril. Posteriormente se realizó la mezcla del polvo de CTZ con eugenol como se mencionó en el párrafo anterior. Discos de papel filtro de 6 mm de diámetro fueron inmersos en la pasta CTZ para ser colocados en la placa de agar con el inóculo (Figura 12). Se incubó por un periodo de 48 h a 37 °C. *E. faecalis* se incubó en una cámara de anaerobios.

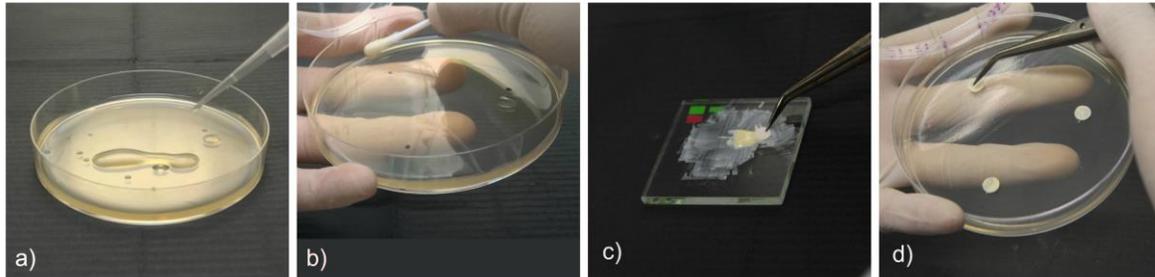


Figura 12. a) colocación de 400  $\mu$ l de suspensión ajustada. b) sembrado por estrias. c) inmersión de discos de papel filtro en el compuesto CTZ. d) colocación de discos de sensibilidad de CTZ en la placa inoculada.

Se tomaron 4 medidas del diámetro de las zonas de inhibición por cada disco empleando un vernier electrónico y se registraron en la base de datos en Excel.

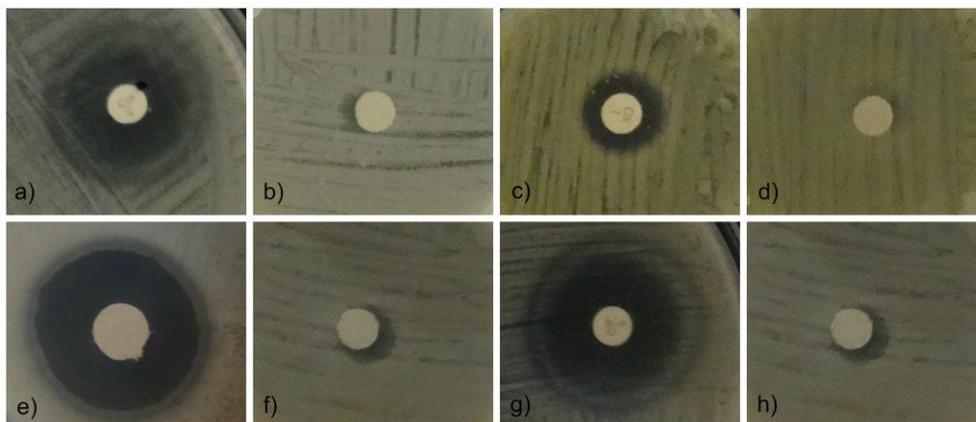
Se realizó el mismo procedimiento cada dos semanas con el mismo preparado de polvo CTZ hasta cumplir 4 meses de evaluación, tal como lo muestra el cronograma de actividades (Tabla 5).

MES	Nov	Diciembre										Enero										Febrero										Marzo										Abr					
ACTIVIDAD	30	1	2	3	4	7	8	9	10	11	4	5	6	7	8	18	19	20	21	22	1	2	3	4	5	15	16	17	18	19	29	1	2	3	4	14	15	16	17	18	28	29	30	31	1		
Prueba piloto																																															
Preparación de cultivos																																															
Sembrado de cultivos jóvenes																																															
Solución madre 18 h																																															
Preparación de CTZ																																															
Ajuste de soluciones madre																																															
Sembrado de Cultivos																																															
Análisis de espectroscopia																																															
Revisión de Cultivos																																															

Tabla 5. Cronograma de actividades. Se muestra las semanas en las que se realizó el estudio y las actividades a seguir cada día.

Se empleó un grupo control positivo con discos de sensibilidad con un antibiótico en específico para cada cepa bacteriana, mientras que el grupo de control negativo se realizó mediante el uso de discos de papel filtro con agua destilada (Figura 13):

- *Pseudomonas aeruginosa*: Ciprofloxacino.
- *Staphylococcus aureus*: Oxacilina.
- *Enterococcus faecalis*: Clorhexidina 2%.
- *Escherichia coli*: Ciprofloxacino

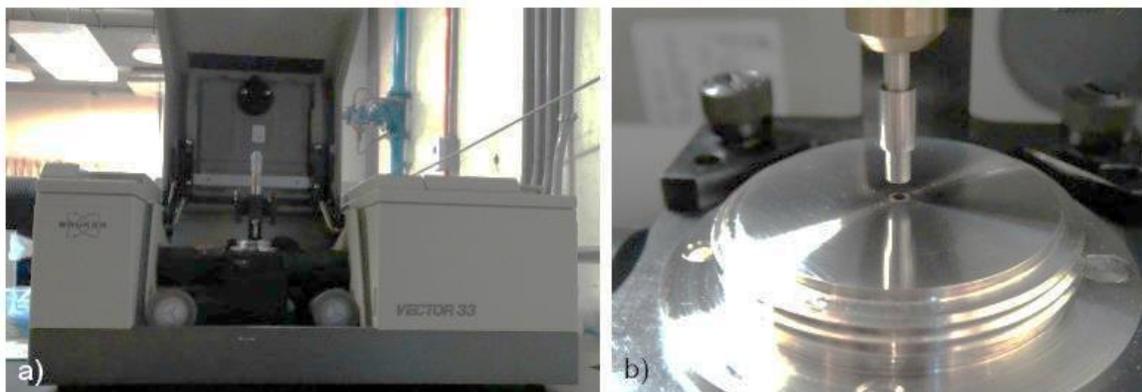


**Figura 13.** a) Control positivo de ciprofloxacino y b) negativo de *P. aeruginosa*; c) control positivo de oxacilina y d) negativo de *S. aureus*; e) control positivo de clorhexidina al 2% y f) negativo de *E. faecalis*; g) control positivo de ciprofloxacino y h) negativo de *E. coli*.

### 1.7.5. ANÁLISIS DE GRUPOS FUNCIONALES

El análisis de grupos funcionales se realizó en el Laboratorio de Espectroscopía del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la UNAM campus Juriquilla mediante Espectroscopía de infrarrojo.

Las muestras se analizaron en un Espectrofotómetro de Infrarrojo Marca Bruker Modelo Vector 33, con 32 barrido y una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$  mediante la técnica de Transmitancia Total Atenuada (ATR), para la cual no se requiere de ninguna preparación, únicamente las muestras son colocadas sobre un cristal de diamante (Figura 14).



**Figura 14.** a) Espectrofotómetro de Infrarrojo. b) Cristal de diamante y compresor de muestra.



Se hizo incidir sobre la muestra un haz de luz monocromático. Una porción de la luz es dispersada inelásticamente experimentando cambios de frecuencia e independientes de la frecuencia de la luz incidente.

## **1.8. ANÁLISIS DE RESULTADOS**

Las medidas de las zonas de inhibición bacteriana se registraron en una base de datos en Excel (Tabla 6).

Los resultados se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de Una Vía ( $P < 0.05$ ) seguido de contrastes post-hoc de comparación múltiple (Dunnett, Sidak y Tukey) empleando GraphPad Prism versión 7.00 para Windows.

Se realizó un análisis descriptivo de los espectros obtenidos por las técnicas de Espectroscopía Infrarrojo ATR.

## **1. 9. INFRAESTRUCTURA**

- Laboratorio de Nanoestructuras y Biomateriales de la ENES Unidad León de la UNAM.
- Laboratorio de Espectroscopía del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la UNAM Campus Juriquilla.



### Semana \_\_ (prueba \_\_)

FECHA: \_\_\_\_\_

M1A															
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
P. aeruginosa															
S. aureus															
E. faecalis															
E. coli															

M1T															
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
P. aeruginosa															
S. aureus															
E. faecalis															
E. coli															

M2A															
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
P. aeruginosa															
S. aureus															
E. faecalis															
E. coli															

M2T															
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
P. aeruginosa															
S. aureus															
E. faecalis															
E. coli															

**Tabla 6. Base de datos para la recolección de resultados obtenidos de las zonas de inhibición bacteriana.**



# CAPÍTULO 4

## 1. RESULTADOS

Quincenalmente, se obtuvieron las zonas de inhibición bacteriana con cada cepa bacteriana con los grupos a evaluar y se realizaron registros fotográficos de las zonas de inhibición más representativos de cada grupo (Anexo 1-8). Posteriormente se registraron las medidas de las zonas de inhibición en la base de datos de Excel (Anexo 9-16).

Se realizó análisis de ANOVA de Una Vía para la comparación de la media de más de dos grupos con tamaños de muestras similares. Con cada especie bacteriana fue realizado el análisis para observar si en los grupos Ámbar (A) y Transparente (T) de cada grupo semanal (semana Inicial, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16) había diferencia significativa ( $P = <0.05$ ). Para cada especie bacteriana, se analizaron un total de 360 valores divididos en 15 grupos (Tabla 7).

	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>
Número de tratamientos	15	15	15	15
Número de valores	360	360	360	360
Valor P	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Diferencia significativa de medias ( $P < 0.05$ )	Sí	Sí	Sí	Sí
R cuadrada	0,3427	0,5254	0,4224	0.5156

Tabla 7. Análisis ANOVA de Una vía entre las medias de cada grupo de cada bacteria.

En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* la media de la semana inicial (SI) fue de 29.61 mm  $\pm$  0.79; en la semana 16 (S16) del grupo A fue de 29,03 mm  $\pm$  0,59; en S16 del grupo T fue de 29.39 mm  $\pm$  0.52 (Tabla 8). Al realizar el análisis de ANOVA de Una Vía se obtuvo diferencia significativa entre los grupos ( $P = <0.0001$ ) (Tabla 7).

	INICIAL	4A	4T	6A	6T	8A	8T	10A	10T	12A	12T	14A	14T	16A	16T
Número de Valores	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
Mínimo	28,36	27,13	28,43	28,47	28,21	29,11	28,01	29,82	29,02	28,19	27,79	28,72	28,77	27,66	28,22
Percentil 25%	29	28,43	29,18	29,5	29,52	29,93	29,31	30,41	29,75	28,91	28,39	29,15	29,1	28,73	29,08
Media	29,54	29,84	29,44	30,49	29,73	30,1	29,66	30,87	29,91	29,21	28,6	29,43	29,64	28,99	29,43
Percentil 75%	30,34	30,37	29,87	30,8	30,23	30,38	29,95	31,29	30,24	29,6	29,66	29,83	30,28	29,31	29,73
Máximo	31,18	31,86	30,38	31,49	30,64	30,77	30,52	31,84	30,8	30,23	30,42	30,52	30,48	30,12	30,35
Media	29,61	29,56	29,48	30,16	29,7	30,08	29,54	30,86	29,95	29,24	28,96	29,46	29,66	29,03	29,39
Desviación Estándar	0,7868	1,208	0,4688	0,8273	0,6289	0,4404	0,5904	0,5459	0,424	0,5629	0,6996	0,464	0,567	0,5889	0,5154
IC 95% bajo	29,28	29,05	29,29	29,81	29,43	29,9	29,29	30,63	29,77	29	28,66	29,27	29,42	28,78	29,17
IC 95% alto	29,95	30,07	29,68	30,51	29,96	30,27	29,79	31,09	30,13	29,48	29,25	29,66	29,9	29,28	29,6

Tabla 8. Estadística descriptiva de *P. aeruginosa*.



En *Staphylococcus aureus* la media de SI fue de 36.05 mm  $\pm$  2.30; en S16 grupo A la media obtenida fue de 34.98 mm  $\pm$  1.18; en S16 grupo T la media fue de 35.04 mm  $\pm$  1.45 (Tabla 9). Al realizar el análisis se obtuvo diferencia significativa entre los grupos ( $P = <0.0001$ ) (Tabla 7).

	INICIAL	4A	4T	6A	6T	8A	8T	10A	10T	12A	12T	14A	14T	16A	16T
Número de Valores	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
Mínimo	30,5	35,47	32	32,52	33,51	32,07	30,88	35,28	34,31	25,99	29,48	34,53	33,5	32,75	33,02
Percentil 25%	34,41	36,88	34,24	34,71	34,81	33,2	32,1	36,69	37,46	31,33	32	36,56	35,03	34,1	33,92
Media	36,36	38,06	35,53	36,21	35,66	34,06	33,5	38,17	38,29	33,16	33,86	37,63	37,06	34,97	34,81
Percentil 75%	37,4	38,8	36,79	36,9	36,32	35,18	34,28	40,04	38,87	34,21	35,16	38,92	38,83	36	36,19
Máximo	40,24	39,19	39,98	37,93	38,25	36,44	36,64	42,01	40,1	35,32	36,05	39,55	40,13	36,83	37,78
Media	36,05	37,69	35,62	35,81	35,59	34,15	33,41	38,31	37,98	32,48	33,46	37,54	36,9	34,98	35,04
Desviación Estándar	2,301	1,129	2,025	1,589	1,086	1,24	1,641	1,834	1,314	2,336	1,908	1,465	1,984	1,183	1,455
IC 95% bajo	35,07	37,21	34,77	35,13	35,13	33,62	32,72	37,54	37,43	31,49	32,66	36,93	36,06	34,48	34,43
IC 95% alto	37,02	38,17	36,48	36,48	36,05	34,67	34,11	39,09	38,54	33,46	34,27	38,16	37,74	35,48	35,65

Tabla 9. Estadística descriptiva de *S. aureus*.

En *Enterococcus faecalis* la media de SI fue de 29.97 mm  $\pm$  0.59; en S16 grupo A la media obtenida fue de 29.82 mm  $\pm$  0.64; en S16 grupo T la media fue de 29.42 mm  $\pm$  0.68 (Tabla 10). Al realizar el análisis se obtuvo diferencia significativa entre los grupos ( $P = <0.0001$ ) (Tabla 7).

	INICIAL	4A	4T	6A	6T	8A	8T	10A	10T	12A	12T	14A	14T	16A	16T
Número de Valores	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
Mínimo	28,94	26,7	28,07	29,64	28,71	28,31	28,68	30,41	28,73	28,67	27,48	29,46	29,16	28,39	28,53
Percentil 25%	29,6	28,79	28,63	30,11	29,62	30,17	29,38	31,1	30,36	29	28,32	29,8	29,91	29,46	28,98
Media	29,89	29,37	29,21	30,45	29,95	30,48	29,85	31,59	30,81	29,45	28,85	30,04	30,25	29,77	29,23
Percentil 75%	30,38	30,56	30,13	30,79	30,72	31,03	30,31	32,24	31,28	29,9	29,46	30,73	30,68	30,2	29,86
Máximo	31,2	31,82	32,47	31,03	32,39	31,76	30,84	32,82	32,1	31,16	29,88	31,88	31,44	31,11	31,06
Media	29,97	29,45	29,53	30,42	30,16	30,51	29,82	31,64	30,71	29,53	28,82	30,29	30,26	29,82	29,42
Desviación Estándar	0,587	1,268	1,268	0,4015	0,9522	0,7671	0,5886	0,6916	0,7486	0,6376	0,6625	0,6719	0,5145	0,6446	0,6762
IC 95% bajo	29,73	28,91	28,99	30,25	29,76	30,18	29,57	31,35	30,4	29,26	28,54	30	30,04	29,55	29,13
IC 95% alto	30,22	29,99	30,06	30,59	30,57	30,83	30,07	31,93	31,03	29,8	29,1	30,57	30,48	30,09	29,71

Tabla 10. Estadística descriptiva de *E. faecalis*.

En *Escherichia coli* la media de SI fue de 28.77 mm  $\pm$  0.43; en S16 grupo A la media obtenida fue de 28.66 mm  $\pm$  0.57; en S16 grupo T la media fue de 29.01 mm  $\pm$  0.68 (Tabla 11). Al realizar el análisis se obtuvo diferencia significativa entre los grupos ( $P = <0.0001$ ) (Tabla 7).

	INICIAL	4A	4T	6A	6T	8A	8T	10A	10T	12A	12T	14A	14T	16A	16T
Número de Valores	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
Mínimo	27,84	27,6	27,28	27,41	27,04	27,38	28,17	29	28,62	27,33	26,93	27,77	26,82	27,81	28,03
Percentil 25%	28,45	28,45	28,13	28,16	27,39	28,32	28,71	29,95	29,63	27,88	27,81	28,54	28,48	28,06	28,47
Media	28,7	28,96	28,42	28,46	27,71	29,05	29,25	30,43	30,03	28,42	28,25	29,01	28,83	28,65	28,81
Percentil 75%	29,16	29,6	28,93	29,09	28,01	29,91	29,86	30,81	30,38	28,73	28,68	29,51	29,56	29,16	29,79
Máximo	29,69	30,48	29,82	29,53	28,36	30,45	30,68	31,68	32,46	29,11	29,19	30,43	30,41	29,55	30,05
Media	28,77	29,06	28,54	28,55	27,68	29,06	29,3	30,38	30,21	28,32	28,19	29,04	28,88	28,66	29,01
Desviación Estándar	0,4347	0,7979	0,611	0,5996	0,3586	0,8735	0,7119	0,6649	0,8923	0,5196	0,5811	0,5965	0,8426	0,5657	0,6798
IC 95% bajo	28,59	28,72	28,28	28,3	27,53	28,69	29	30,09	29,83	28,1	27,94	28,79	28,52	28,42	28,73
IC 95% alto	28,95	29,39	28,8	28,81	27,83	29,43	29,6	30,66	30,58	28,54	28,43	29,29	29,24	28,89	29,3

Tabla 11. Estadística descriptiva de *E. coli*.

Como se puede observar, al realizar el análisis de ANOVA de Una Vía para cada especie bacteriana, se obtuvo diferencia estadísticamente significativa en los cuatro microorganismos analizados ( $P = <0.0001$ ), por ello se decidió realizar contrastes post-hoc de comparación múltiple (Dunnet, Sidak, Tukey), para saber en qué comparaciones de grupos se encontraba la significancia.

## 1.1. EFECTO ANTIMICROBIANO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO.

Para evaluar el efecto antimicrobiano del CTZ en función del tiempo de almacenamiento, se separaron los datos obtenidos del grupo ámbar (A) y del grupo transparente (T). Se realizó el contraste de Dunnett para evaluar si existía diferencia significativa en la inhibición bacteriana obtenida en cada prueba realizada (semana 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16) comparándola siempre con la inhibición bacteriana obtenida en la prueba de la semana inicial en el grupo A. Se realizó de la misma forma para el grupo T. La comparación se realizó en cada especie bacteriana.

Los resultados significativos ( $P < 0.05$ ) fueron en *P. aeruginosa* en la semana 10 y 16 del grupo A y en la semana 12 del grupo T; en *S. aureus* hubo significancia en la semana 4, 8, 10, 12 y 14 del grupo A y la semana 8, 10, 12 del grupo T; en *E. faecalis* la diferencia se encontró en la semana 10 del grupo A y en la semana 10 y 12 del grupo T; para *E. coli* hubo significancia en la semana 10 del grupo A y en la semana 6 del grupo T. A continuación se mencionan los detalles obtenidos para cada especie bacteriana.

- *Pseudomonas aeruginosa*

En el grupo A la media de las zonas de inhibición bacteriana disminuyó en la semana 4, 12, 14 y 16, mientras que aumentó en la semana 6, 8 y 10 respecto a la semana inicial (Figura 15). Sin embargo, se encontró diferencia estadísticamente significativa únicamente en dos grupos: 1) en la comparación de la semana inicial y la semana 10 con una diferencia de -1.243 mm ( $P = < 0.0001$ ) y 2) entre la semana inicial y la semana 16 con diferencia de 0.5808 ( $P = 0.0324$ ) (Tabla 12).

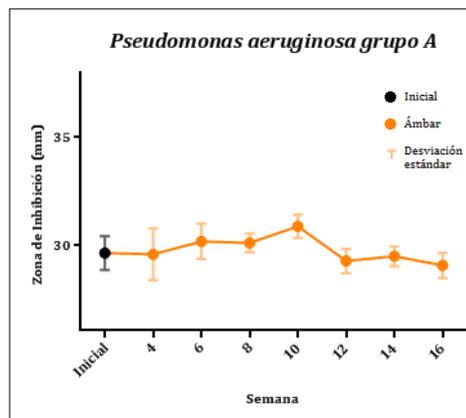


Figura 15 Gráfica del grupo A de *P. aeruginosa*.

Comparación múltiple de Dunnett	Media 1	Media 2	Diferencia de Media	Intervalo de Confianza 95%	Valor P Ajustado	Significancia Estadística
Inicial vs. 4 A	29,61	29,56	0,05708	-0.4903 to 0.6045	0,9996	No
Inicial vs. 6 A	29,61	30,16	-0,5463	-1.094 to 0.001182	0,0507	No
Inicial vs. 8 A	29,61	30,08	-0,4708	-1.018 to 0.07660	0,1228	No
Inicial vs. 10 A	29,61	30,86	-1,243	-1.790 to -0.6955	< 0.0001	Sí
Inicial vs. 12 A	29,61	29,24	0,3729	-0.1745 to 0.9203	0,3162	No
Inicial vs. 14 A	29,61	29,46	0,1496	-0.3978 to 0.6970	0,9682	No
Inicial vs. 16 A	29,61	29,03	0,5808	0.03340 to 1.128	0,0324	Sí

Tabla 12. Análisis de comparación múltiple de Dunnett del grupo A de *P. aeruginosa*.

En el grupo T la media de las zonas de inhibición bacteriana disminuyó en la semana 4, 8, 12 y 16, mientras que aumentó en la semana 6, 10 y 14 respecto a la semana inicial (Figura 16). Sin embargo, se encontró diferencia estadísticamente significativa en la comparación de la semana inicial con la semana 12 de 0.6546 mm ( $P=0.0013$ ) (Tabla 13).

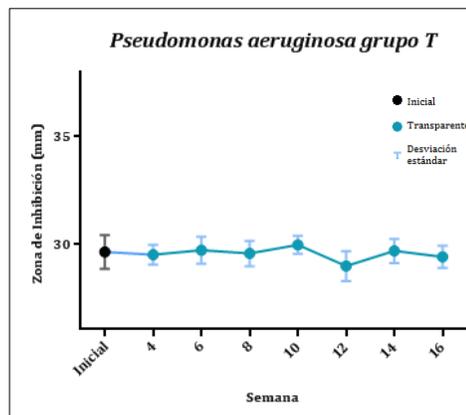


Figura 16. Gráfica del grupo T de *P. aeruginosa*.

Comparación múltiple de Dunnett	Media 1	Media 2	Diferencia de Media	Intervalo de Confianza 95%	Valor P Ajustado	Significancia Estadística
Inicial vs. 4 T	29,61	29,48	0,1304	-0,3233 to 0,5841	0,959	No
Inicial vs. 6 T	29,61	29,7	-0,08125	-0,5349 to 0,3724	0,9971	No
Inicial vs. 8 T	29,61	29,54	0,07333	-0,3803 to 0,5270	0,9976	No
Inicial vs. 10 T	29,61	29,95	-0,3354	-0,7891 to 0,1183	0,2386	No
Inicial vs. 12 T	29,61	28,96	0,6546	0,2009 to 1,108	0,0013	Sí
Inicial vs. 14 T	29,61	29,66	-0,0475	-0,5012 to 0,4062	0,9996	No
Inicial vs. 16 T	29,61	29,39	0,2271	-0,2266 to 0,6808	0,6391	No

Tabla 13. Análisis de comparación múltiple de Dunnett del grupo T de *P. aeruginosa*.

- ***Staphylococcus aureus***

En el grupo A la media de las zonas de inhibición bacteriana disminuyó en la semana 6, 8, 12 y 16, mientras que aumentó en la semana 4, 10 y 14 respecto a la semana inicial (Figura 17). Sin embargo, se encontró diferencia estadísticamente significativa en la comparación de la semana inicial con la semana 4 de -1.643 mm ( $P=0.0060$ ); con la semana 8 de 1.9 mm ( $P=0.0010$ ); con la semana 10 de -2.266 mm ( $P<0.0001$ ); con la semana 12 de 3.569 ( $P<0.0001$ ); y con la semana 14 de -1.499 ( $P=0.0151$ ) (Tabla 14).

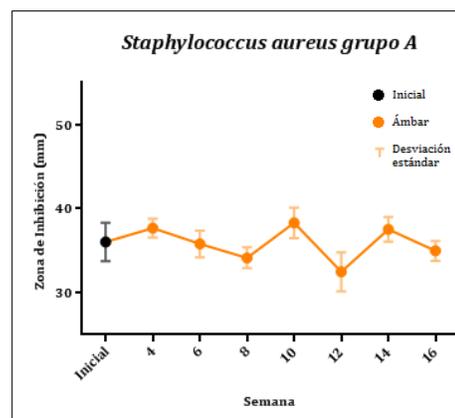


Figura 17. Gráfica del grupo A de *S. aureus*.

Comparación múltiple de Dunnett	Media 1	Media 2	Diferencia de Media	Intervalo de Confianza 95%	Valor P Ajustado	Significancia Estadística
Inicial vs. 4 A	36,05	37,69	-1,643	-2,935 to -0,3521	0,006	Sí
Inicial vs. 6 A	36,05	35,81	0,2408	-1,050 to 1,532	0,9952	No
Inicial vs. 8 A	36,05	34,15	1,9	0,6083 to 3,191	0,001	Sí
Inicial vs. 10 A	36,05	38,31	-2,266	-3,557 to -0,9746	< 0,0001	Sí
Inicial vs. 12 A	36,05	32,48	3,569	2,278 to 4,860	< 0,0001	Sí
Inicial vs. 14 A	36,05	37,54	-1,499	-2,790 to -0,2077	0,0151	Sí
Inicial vs. 16 A	36,05	34,98	1,068	-0,2229 to 2,360	0,1484	No

Tabla 14. Análisis de comparación múltiple de Dunnett del grupo A de *S. aureus*.

En el grupo T la media de las zonas de inhibición bacteriana disminuyó en la semana 4, 6, 8, 12 y 16, mientras que aumentó en la semana 10 y 14 respecto a la semana inicial (Figura 18). Hubo diferencia estadísticamente significativa en la comparación de la semana inicial con la semana 8 de 2.631 mm ( $P = <0.0001$ ); con la semana 10 de -1.939 ( $P = 0.0012$ ); y con la semana 12 de 2.585 ( $P = <0.0001$ ) (Tabla 15).

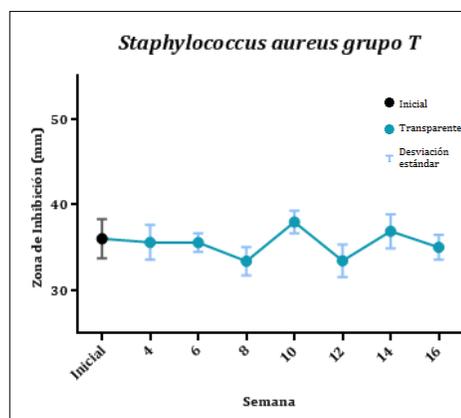


Figura 18. Gráfica del grupo T de *S. aureus*.

Comparación múltiple de Dunnett	Media 1	Media 2	Diferencia de Media	Intervalo de Confianza 95%	Valor P Ajustado	Significancia Estadística
Inicial vs. 4 T	36,05	35,62	0,4217	-0,9160 to 1,759	0,9358	No
Inicial vs. 6 T	36,05	35,59	0,4583	-0,8794 to 1,796	0,9065	No
Inicial vs. 8 T	36,05	33,41	2,631	1,294 to 3,969	< 0,0001	Sí
Inicial vs. 10 T	36,05	37,98	-1,939	-3,276 to -0,6011	0,0012	Sí
Inicial vs. 12 T	36,05	33,46	2,585	1,247 to 3,923	< 0,0001	Sí
Inicial vs. 14 T	36,05	36,9	-0,8563	-2,194 to 0,4814	0,3802	No
Inicial vs. 16 T	36,05	35,04	1,006	-0,3319 to 2,344	0,2237	No

Tabla 15. Análisis de comparación múltiple de Dunnett del grupo T de *S. aureus*.

- ***Enterococcus faecalis***

En el grupo A la media de las zonas de inhibición bacteriana disminuyó en la semana 4, 12 y 16, mientras que aumentó en la semana 6, 8, 10 y 14 (Figura 19). Sin embargo, se encontró diferencia estadísticamente significativa en la comparación de la semana inicial con la semana 10 de -1.665 ( $P = <0.0001$ ) (Tabla 16).

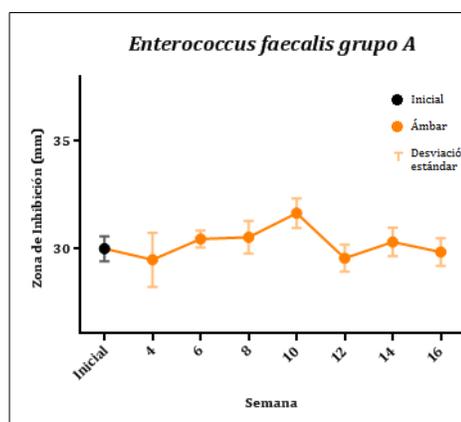


Figura 19. Gráfica del grupo A de *E. faecalis*.

Comparación múltiple de Dunnett	Media 1	Media 2	Diferencia de Media	Intervalo de Confianza 95%	Valor P Ajustado	Significancia Estadística
Inicial vs. 4	29,97	29,45	0,5229	-0,04526 to 1,091	0,0848	No
Inicial vs. 6	29,97	30,42	-0,45	-1,018 to 0,1182	0,1807	No
Inicial vs. 8	29,97	30,51	-0,5352	-1,103 to 0,03297	0,0738	No
Inicial vs. 10	29,97	31,64	-1,665	-2,234 to -1,097	< 0,0001	Sí
Inicial vs. 12	29,97	29,53	0,4442	-0,1240 to 1,012	0,1911	No
Inicial vs. 14	29,97	30,29	-0,3133	-0,8815 to 0,2548	0,5395	No
Inicial vs. 16	29,97	29,82	0,1554	-0,4128 to 0,7236	0,968	No

Tabla 16. Análisis de comparación múltiple de Dunnett del grupo A de *E. faecalis*.

En el grupo T la media de las zonas de inhibición bacteriana disminuyó en la semana 4, 8, 12 y 16, mientras que aumentó en la semana 6, 10 y 12 respecto a la media de la semana inicial (Figura 20). Sin embargo, se encontró diferencia estadísticamente significativa en la comparación de la semana inicial y la semana 10 de -0.7383 mm ( $P= 0.0082$ ) y en la semana 12 de 1.15 mm ( $P= <0.0001$ ) (Tabla 17).

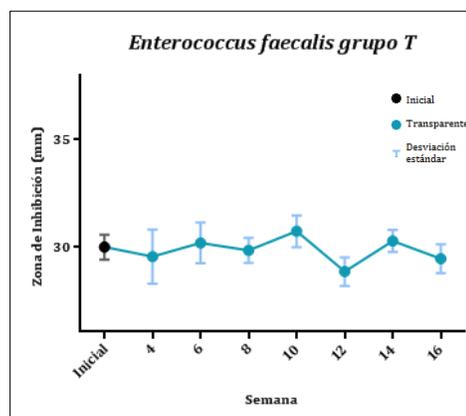


Figura 20. Gráfica del grupo T de *E. faecalis*.

Comparación múltiple de Dunnett	Media 1	Media 2	Diferencia de Media	Intervalo de Confianza 95%	Valor P Ajustado	Significancia Estadística
Inicial vs. 4	29,97	29,53	0,445	-0.1526 to 1.043	0,2322	No
Inicial vs. 6	29,97	30,16	-0,1908	-0.7885 to 0.4068	0,9318	No
Inicial vs. 8	29,97	29,82	0,1529	-0.4447 to 0.7505	0,9775	No
Inicial vs. 10	29,97	30,71	-0,7383	-1.336 to -0.1407	0,0082	Sí
Inicial vs. 12	29,97	28,82	1,15	0.5528 to 1.748	< 0.0001	Sí
Inicial vs. 14	29,97	30,26	-0,2854	-0.8830 to 0.3122	0,684	No
Inicial vs. 16	29,97	29,42	0,5529	-0.04471 to 1.151	0,0822	No

Tabla 17. Análisis de comparación múltiple de Dunnett del grupo T de *E. faecalis*.

- ***Escherichia coli***

En el grupo A la media de las zonas de inhibición bacteriana disminuyó en la semana 6, 12 y 16, mientras que aumentó en la semana 4, 8, 10 y 14 respecto a la media de la semana inicial (Figura 21). Sin embargo, se observó diferencia estadísticamente significativa en la comparación de la semana inicial y la semana 10 de -1.605 mm ( $P= <0.0001$ ) (Tabla 18).

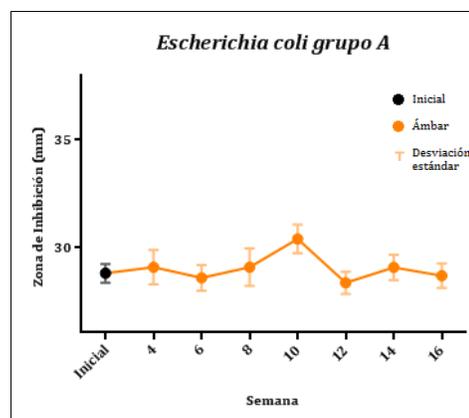


Figura 21. Gráfica del grupo A de *E. coli*.

Comparación múltiple de Dunnett	Media 1	Media 2	Diferencia de Media	Intervalo de Confianza 95%	Valor P Ajustado	Significancia Estadística
Inicial vs. 4	28,77	29,06	-0,2858	-0.7776 to 0.2059	0,4832	No
Inicial vs. 6	28,77	28,55	0,2175	-0.2743 to 0.7093	0,751	No
Inicial vs. 8	28,77	29,06	-0,2862	-0.7780 to 0.2055	0,4817	No
Inicial vs. 10	28,77	30,38	-1,605	-2.097 to -1.113	< 0.0001	Sí
Inicial vs. 12	28,77	28,32	0,4492	-0.04259 to 0.9409	0,0886	No
Inicial vs. 14	28,77	29,04	-0,2721	-0.7638 to 0.2197	0,5359	No
Inicial vs. 16	28,77	28,66	0,1146	-0.3772 to 0.6063	0,9869	No

Tabla 18. Análisis de comparación múltiple de Dunnett del grupo A de *E. coli*.

En el grupo T la media de las zonas de inhibición bacteriana disminuyó en la semana 4, 6, 10, 12 y 14, mientras que aumentó en la semana 8 y 16 (Figura 22). Sin embargo, se encontró diferencia estadísticamente significativa en la comparación inicial con la semana 6 de 0.8742 ( $P = < 0.0001$ ) (Tabla 19).

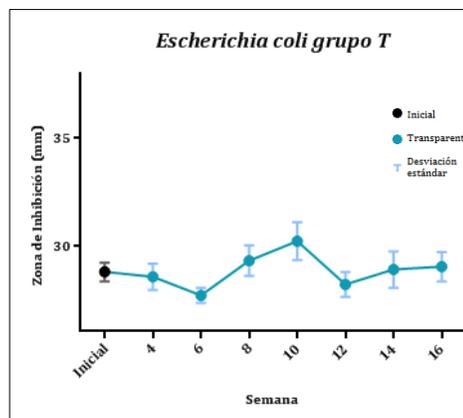


Figura 22. Gráfica del grupo T de *E. coli*.

Comparación múltiple de Dunnett	Media 1	Media 2	Diferencia de Media	Intervalo de Confianza 95%	Valor P Ajustado	Significancia Estadística
Inicial vs. 4	28,77	28,54	0,2304	-0.2736 to 0.7344	0,7231	No
Inicial vs. 6	28,77	27,68	1,092	0.5877 to 1.596	< 0.0001	Sí
Inicial vs. 8	28,77	29,3	-0,5271	-1.031 to -0.02312	0,0362	Sí
Inicial vs. 10	28,77	30,21	-1,435	-1.939 to -0.9310	< 0.0001	Sí
Inicial vs. 12	28,77	28,19	0,585	0.08103 to 1.089	0,0151	Sí
Inicial vs. 14	28,77	28,88	-0,11	-0.6140 to 0.3940	0,9911	No
Inicial vs. 16	28,77	29,01	-0,2437	-0.7477 to 0.2602	0,6721	No

Tabla 19. Análisis de comparación múltiple de Dunnett del grupo T de *E. coli*.

La diferencia de la media de cada prueba quincenal comparada con la media de la semana inicial fue oscilatoria, esto quiere decir que en las semanas que se observó diferencia significativa la media de las zonas de inhibición disminuía en algunas ocasiones y aumentaba en otras, por lo que no es certera una disminución o aumento de la efectividad antibacteriana a través del tiempo.

## 1.2. EFECTO ANTIMICROBIANO EN FUNCIÓN DE SU EXPOSICIÓN A LA LUZ.

Para evaluar el efecto antimicrobiano del CTZ en función de su exposición a la luz ambiental se realizó el análisis de comparación múltiple de Sidak en el cual se analizó la media obtenida de cada semana del grupo A comparada con la media de esa misma semana pero del grupo T. La comparación se realizó en cada especie bacteriana.

Se tomaron en cuenta únicamente las comparaciones con significancia estadística ( $P = < 0.05$ ). En *P. aeruginosa* hubo diferencia en la comparación del grupo A y T de la semana 8 y 10; en *S. aureus* hubo diferencia significativa en la comparación del grupo A y T de la semana 4; en *E. faecalis* la comparación del grupo A y T de la semana 8, 10 y 12 mostraron significancia; en *E. coli* existió significancia en la comparación del grupo A y T de la semana 6. En las comparaciones estadísticamente significativas que se obtuvieron, la media del grupo A siempre fue mayor que la del grupo T. A continuación se mencionan los detalles obtenidos para cada especie bacteriana.

- ***Pseudomonas aeruginosa***

Al realizar la comparación de los grupos A con los grupos T de cada semana (Figura 23), se observó diferencia estadísticamente significativa en la semana 8 en donde la media del grupo A fue mayor que la del grupo T (diferencia de 0,5442 mm,  $P= 0.0278$ ); y en la semana 10 en donde la media del grupo A fue mayor que la del grupo T (diferencia de 0,9075 mm,  $P= <0.0001$ ) (Tabla 20).

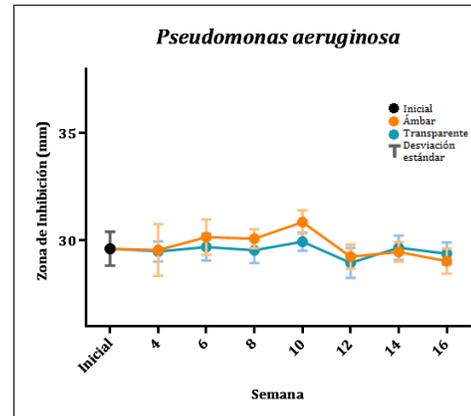


Figura 23. Gráfica comparativa del grupo A y grupo T de *P. aeruginosa*.

Comparación múltiple de Sidak	Media 1	Media 2	Diferencia de Media	Intervalo de Confianza 95%	Valor P Ajustado	Significancia Estadística
4 A vs. 4 T	29,56	29,48	0,07333	-0.4337 to 0.5804	0,9998	No
6 A vs. 6 T	30,16	29,7	0,465	-0.04207 to 0.9721	0,0927	No
8 A vs. 8 T	30,08	29,54	0,5442	0.03710 to 1.051	0,0278	Sí
10 A vs. 10 T	30,86	29,95	0,9075	0.4004 to 1.415	< 0.0001	Sí
12 A vs. 12 T	29,24	28,96	0,2817	-0.2254 to 0.7887	0,6369	No
14 A vs. 14 T	29,46	29,66	-0,1971	-0.7042 to 0.3100	0,9134	No
16 A vs. 16 T	29,03	29,39	-0,3538	-0.8608 to 0.1533	0,3543	No

Tabla 20. Análisis de comparación múltiple de Sidak entre el grupo A y T de *P. aeruginosa*.

### *Staphylococcus aureus*

En la comparación de los grupos A con los grupos T de cada semana (Figura 24), se observó diferencia estadísticamente significativa en la semana 4 en donde la media del grupo A fue mayor que la del grupo T (diferencia de 2,065 mm,  $P= 0,0002$ ) (Tabla 21).

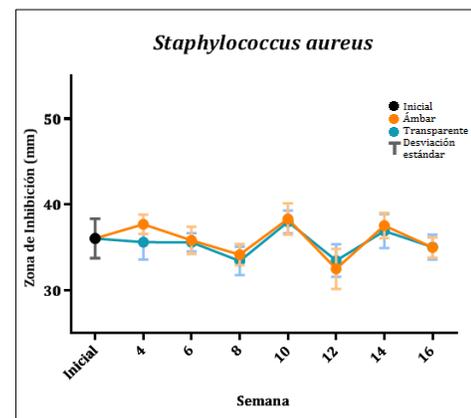


Figura 24. Gráfica comparativa del grupo A y grupo T de *S. aureus*.

Comparación múltiple de Sidak	Media 1	Media 2	Diferencia de Media	Intervalo de Confianza 95%	Valor P Ajustado	Significancia Estadística
4 A vs. 4 T	37,69	35,62	2,065	0.7553 to 3.375	0,0002	Sí
6 A vs. 6 T	35,81	35,59	0,2175	-1.092 to 1.527	0,9994	No
8 A vs. 8 T	34,15	33,41	0,7316	-0.5781 to 2.041	0,6304	No
10 A vs. 10 T	38,31	37,98	0,3271	-0.9826 to 1.637	0,9923	No
12 A vs. 12 T	32,48	33,46	-0,9842	-2.294 to 0.3255	0,2666	No
14 A vs. 14 T	37,54	36,9	0,6428	-0.6669 to 1.952	0,7636	No
16 A vs. 16 T	34,98	35,04	-0,0625	-1.372 to 1.247	> 0.9999	No

Tabla 21. Análisis de comparación múltiple de Sidak entre el grupo A y T de *S. aureus*.

- **Enterococcus faecalis**

Al realizar la comparación de los grupos A con los grupos T de cada semana (Figura 25), se observó diferencia estadísticamente significativa en la semana 8 en donde la media del grupo A fue mayor que la del grupo T (diferencia de 0,6881 mm,  $P=0.0160$ ); en la semana 10 en donde la media del grupo A fue mayor que la del grupo T (diferencia de 0,9271 mm,  $P<0.0003$ ); y en la semana 12 en donde la media del grupo A fue mayor que la del grupo T (diferencia de 0.7063 mm,  $P=0.0123$ ) (Tabla 22).

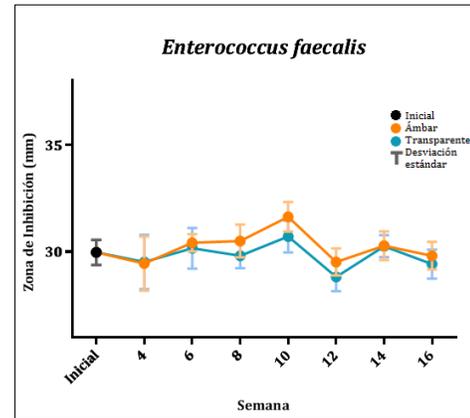


Figura 25. Gráfica comparativa del grupo A y grupo T de *E. faecalis*.

Comparación múltiple de Sidak	Media 1	Media 2	Diferencia de Media	Intervalo de Confianza 95%	Valor P Ajustado	Significancia Estadística
4 A vs. 4 T	29,45	29,53	-0,07792	-0.6826 to 0.5268	0.9999	No
6 A vs. 6 T	30,42	30,16	0,2592	-0.3455 to 0.8638	0.8462	No
8 A vs. 8 T	30,51	29,82	0,6881	0.08346 to 1.293	0.0160	Sí
10 A vs. 10 T	31,64	30,71	0,9271	0.3224 to 1.532	0.0003	Sí
12 A vs. 12 T	29,53	28,82	0,7063	0.1016 to 1.311	0.0123	Sí
14 A vs. 14 T	30,29	30,26	0,02792	-0.5768 to 0.6326	>0.9999	No
16 A vs. 16 T	29,82	29,42	0,3975	-0.2072 to 1.002	0.4289	No

Tabla 22. Análisis de comparación múltiple de Sidak entre el grupo A y T de *E. faecalis*.

- **Escherichia coli**

Al realizar la comparación de los grupos A con los grupos T de cada semana (Figura 26), se observó diferencia estadísticamente significativa en la semana 6 en donde la media del grupo A fue mayor que la del grupo T (diferencia de 0,8742 mm,  $P<0.0001$ ) (Tabla 18).

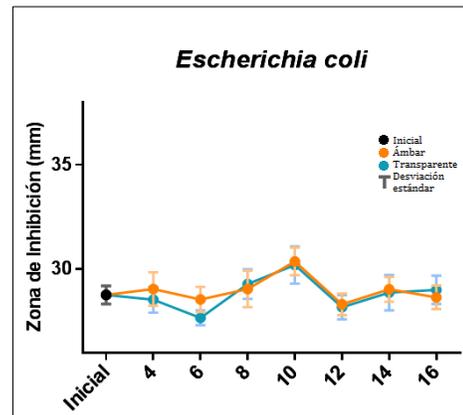


Figura 26. Gráfica comparativa del grupo A y grupo T de *E. coli*.

Comparación múltiple de Sidak	Media 1	Media 2	Diferencia de Media	Intervalo de Confianza 95%	Valor P Ajustado	Significancia Estadística
4 A vs. 4 T	29,06	28,54	0,5163	-0.002513 to 1.035	0,0519	No
6 A vs. 6 T	28,55	27,68	0,8742	0.3554 to 1.393	< 0.0001	Sí
8 A vs. 8 T	29,06	29,3	-0,2408	-0.7596 to 0.2779	0,8098	No
10 A vs. 10 T	30,38	30,21	0,17	-0.3488 to 0.6888	0,9636	No
12 A vs. 12 T	28,32	28,19	0,1358	-0.3829 to 0.6546	0,9898	No
14 A vs. 14 T	29,04	28,88	0,1621	-0.3567 to 0.6808	0,9719	No
16 A vs. 16 T	28,66	29,01	-0,3583	-0.8771 to 0.1604	0,3665	No

Tabla 23. Análisis de comparación múltiple de Sidak entre el grupo A y T de *E. coli*.

Como se puede observar, los resultados obtenidos son oscilatorios, ya que en algunas ocasiones la media obtenida tanto para el grupo A como para el grupo T no presentaba diferencia estadísticamente significativa, o en otros casos, el grupo A presentaba una media mayor que la del grupo A. Esto significa que la exposición a la luz ambiental no disminuye o aumenta el efecto antibacteriano.

### 1.3. EFECTO ANTIMICROBIANO DEL COMPUESTO CTZ ENTRE CADA ESPECIE BACTERIANA.

Para evaluar el efecto antibacteriano de cada especie estudiada, se realizó el análisis de comparación múltiple de Tukey, en el cual se tomó la media obtenida de los resultados de las semanas 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 y se agruparon de acuerdo a su cepa. La especie con mayor inhibición bacteriana durante todo el estudio fue *Staphylococcus aureus* con una media de 35.67 mm  $\pm$  1.79, seguido de *Enterococcus faecalis* con una media de 30,02 mm  $\pm$  0.67, en tercer lugar *Pseudomona aeruginosa* con una media de 29.65 mm  $\pm$  0.48 y la cepa con menor inhibición fue *Escherichia coli* con una media de 28.91 mm  $\pm$  0.70 (Figura 27).

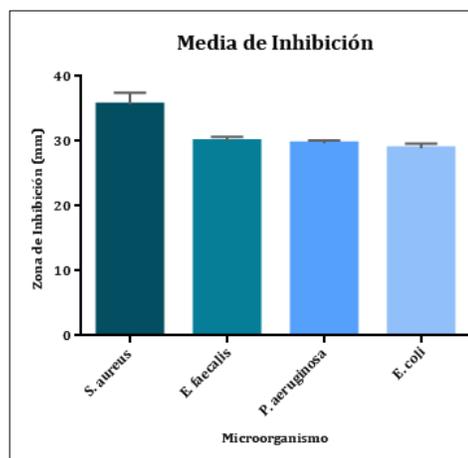


Figura 27. Gráfica de medias de zona de inhibición de *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* y *E. coli*.

Se observó diferencia estadísticamente significativa en la comparación de las medias de *S. aureus* con *P. aeruginosa* (diferencia de 6.022,  $P = <0.0001$ ); en *S. aureus* con *E. faecalis* (diferencia de 5.644 mm,  $P = <0.0001$ ); en *S. aureus* con *E. coli* (diferencia de 6,757 mm,  $P = <0.0001$ ); y en *E. faecalis* con *E. coli* (diferencia de 1.113 mm,  $P = 0.0255$ ). *S. aureus* y *E. faecalis* fueron los microorganismos que mostraron mayor inhibición bacteriana, mientras que *P. aeruginosa* y *E. coli* mostraron medias de inhibición bacteriana menores. (Tabla 24).

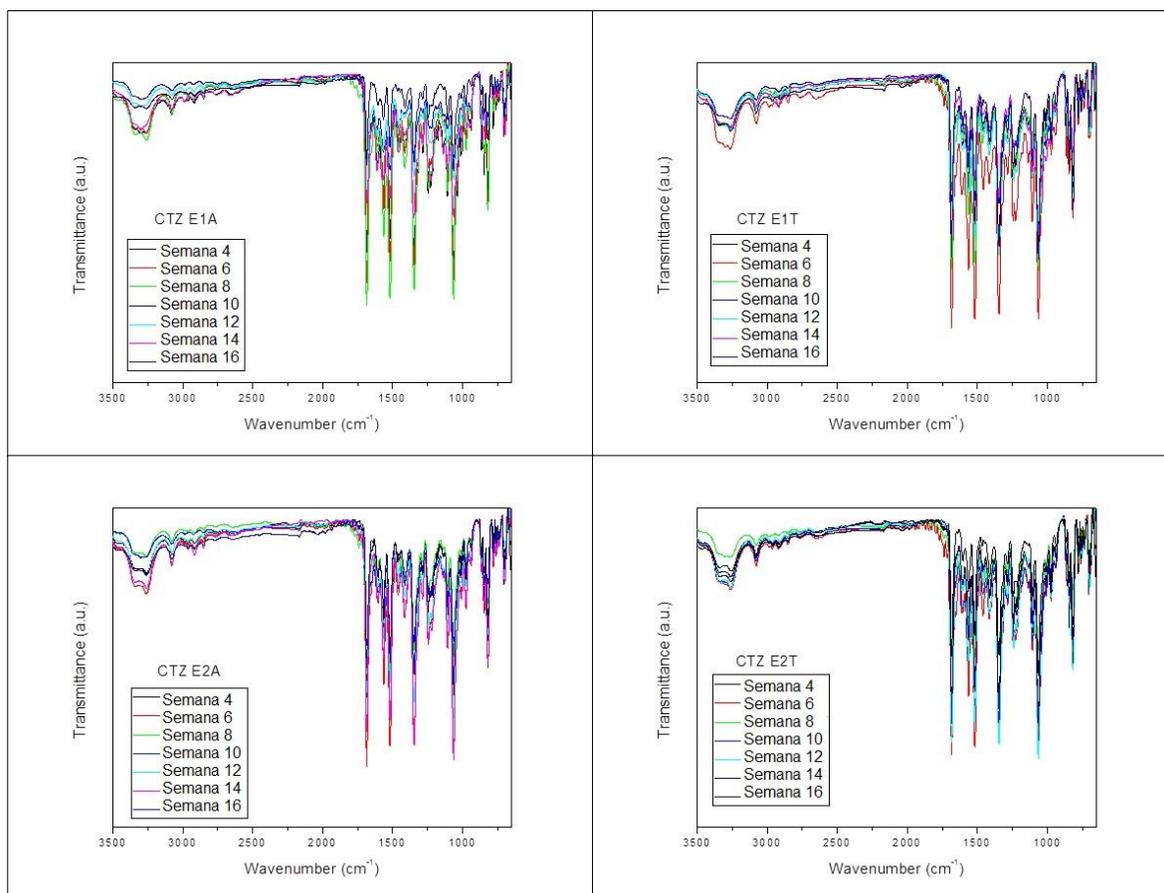
Comparación múltiple de Tukey	Media 1	Media 2	Diferencia de Media	Intervalo de Confianza 95%	Valor P Ajustado	Significancia Estadística
<i>P. aeruginosa</i> vs. <i>S. aureus</i>	29,65	35,67	-6,022	-7.033 to -5.011	< 0.0001	Sí
<i>P. aeruginosa</i> vs. <i>E. faecalis</i>	29,65	30,02	-0,378	-1.389 to 0.6331	0,7558	No
<i>P. aeruginosa</i> vs. <i>E. coli</i>	29,65	28,91	0,7353	-0.2758 to 1.746	0,2292	No
<i>S. aureus</i> vs. <i>E. faecalis</i>	35,67	30,02	5,644	4.633 to 6.655	< 0.0001	Sí
<i>S. aureus</i> vs. <i>E. coli</i>	35,67	28,91	6,757	5.746 to 7.768	< 0.0001	Sí
<i>E. faecalis</i> vs. <i>E. coli</i>	30,02	28,91	1,113	0.1022 to 2.124	0,0255	Sí

Tabla 24. Análisis de comparación múltiple de Tukey entre la media de zona de inhibición obtenida por cada microorganismo.

## 1.4. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO.

El estudio de espectroscopía de infrarrojo se realizó para observar los cambios estructurales que podía llegar a presentar el compuesto CTZ conforme transcurría el tiempo de almacenamiento y se exponía total y parcialmente a la luz ambiental.

Se realizó la comparación gráfica de los espectros obtenidos en cada grupo de frasco ámbar (A) y frasco transparente (T), tanto de la mezcla 1 (E1A y E1T) como de la mezcla 2 (E2A y E2T) cada dos semanas. En los grupos E1A, E1T, E2A Y E2T no se observan cambios significativos en su estructura. Esto significa que no existen cambios estructurales en los componentes del CTZ (Figura 28).



**Figura 28. Espectros obtenidos en el análisis FT-IR de los grupos E1A, E1T, E2A Y E2T.**



## 2. DISCUSIÓN

Alrededor de 1960 las técnicas para el tratamiento de necrosis pulpar de dientes primarios se limitaba a la limpieza de la cámara, seguido de la colocación de una pasta antibiótica, dejando los canales radiculares necróticos intactos. En 1964 Cappiello realizó este tipo de tratamientos colocando pasta antibiótica CTZ, sin embargo, no justifica la elección de los dos antibióticos tetraciclina y cloranfenicol en la preparación de la misma, ya que ambos son antibióticos bacteriostáticos que actúan inhibiendo la síntesis de proteínas bacterianas, son de amplio espectro, activos contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Se considera que son los componentes del CTZ porque estos medicamentos eran los antibióticos disponibles en ese momento (4,63,65).

No se han encontrado reportes en la literatura sobre cuál es el tiempo de almacenamiento indicado del compuesto CTZ después de haber sido preparado a partir de la presentación comercial del cloranfenicol, tetraciclina y óxido de zinc sin endurecedor, únicamente se menciona en un manual de la Universidad Cayetano Heredia de Perú de 1994 que puede almacenarse en un frasco ámbar por dos semanas, pero esta información carece de evidencias (104).

Existen reportes de estudios *in vitro*, en los cuales Guedes-Amorim en 2006 y Piva en 2008 y 2009 comparan la efectividad antibacteriana de diferentes materiales para la obturación de conductos radiculares en pulpectomías y pulpotomías de dientes primarios. Las pastas que se compararon fueron Guedes-Pinto, ZOE, hidróxido de calcio, CTZ, Vitapex, Calen, MTA y L&C. Se realizó el método de difusión por agar en placas de inoculadas con *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Candida albicans*. Los resultados obtenidos de estos estudios se reportaron cualitativamente mediante los parámetros de “presencia de crecimiento/ineficacia” y “ausencia de crecimiento/eficacia”. La pasta CTZ y Guedes-Pinto obtuvieron los mejores resultados en comparación de las otras pastas analizadas (82–84).

Con base en lo anterior, para este estudio se realizó la prueba de difusión por agar, el cual se emplea comúnmente para evaluar la actividad antimicrobiana. De acuerdo a Estrela y cols. la zona de inhibición depende de la solubilidad y difusión en el agar de la sustancia a analizar; de esta manera, el potencial antimicrobiano de sustancias con diferente consistencia no puede ser comparado directamente (105), sin embargo en nuestro estudio la consistencia del compuesto CTZ con eugenol siempre fue similar y controlada al colocar la misma cantidad de polvo con la cucharilla prefabricada y de eugenol en cada grupo comparativo y durante las pruebas realizadas.

Se emplearon cepas de referencia de ATCC durante todo el estudio. Se incluyeron las cepas bacterianas *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis* y *E. coli* con referencia a los estudios realizados por Guedes-Amorim y Piva, puesto que estos microorganismos tienen diferente Gam y morfología (*P. aeruginosa* y *E. faecalis* son bacilos Gram-negativos; *S. aureus* y *E. faecalis* son cocos Gram-positivos). *P. aeruginosa* y *E. faecalis*



se relaciona con infecciones endodóncicas recurrentes, mientras que *S. aureus* se ha aislado de abscesos orales. *E. coli* es una bacteria entérica, sin embargo se ha aislado e identificado como parte de la microflora normal de la boca (17,85,89,90).

Se realizó el compuesto CTZ con base a la proporción indicada por Costa y cols. (103) Se emplearon cápsulas de diferente contenido (500 mg en el caso de tetraciclina y 250 mg en el caso de cloranfenicol), debido a la falta de disponibilidad de presentaciones en el mercado, sin embargo esta diferencia no es significativa en el estudio, ya que el polvo de las cápsulas de ninguno de los dos medicamentos contiene excipiente, además de que se realizó el pesado correspondiente de acuerdo a la proporción ya mencionada.

La hipótesis planteada no se cumple, ya que el efecto antibacteriano y la presencia de grupos funcionales del CTZ fue el mismo durante los 4 meses evaluados y no cambió significativamente con la presencia total y parcial de luz ambiental. Considerando las condiciones de almacenamiento del compuesto CTZ mencionadas por Heredia y cols. (104) éste debe almacenarse en un frasco color ámbar y tiene una caducidad de dos semanas a partir de que es preparado. Sin embargo, en el presente estudio no se observaron diferencias significativas en la comparación de los resultados de la inhibición bacteriana ni en la presencia de grupos funcionales durante las 16 semanas que fueron evaluados. De acuerdo a lo mencionado por Tripathi (65) el cloranfenicol y la tetraciclina son antibióticos fotosensibles, por lo que no pueden exponerse a la luz directamente. Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos en la comparación del compuesto almacenado en frasco ámbar y frasco de vidrio no muestran diferencias significativas, por lo que se puede inferir que los antibióticos no modifican sus propiedades antimicrobianas en presencia de luz durante las 16 semanas evaluadas.



### 3. CONCLUSIONES

El efecto antibacteriano del compuesto CTZ se mantiene constante durante los 4 meses evaluados para todos los microorganismos evaluados, sin mostrar diferencias significativas por el tipo de almacenamiento (frasco ámbar o transparente).

El compuesto CTZ tuvo mayor efecto antibacteriano contra cocos Gram-positivos aerobios (*S. aureus*) y cocos Gram-positivos anaerobios facultativos (*E. faecalis*).

La estructura química de los componentes del CTZ no se alteró conforme al almacenamiento ni su exposición a la luz ambiental.

Con esto se puede concluir que el compuesto CTZ puede almacenarse en frascos de vidrio transparente durante un periodo de 4 meses con seguridad de que el efecto antibacteriano será el mismo que el CTZ preparado en el momento operatorio.

Es importante preparar el CTZ de acuerdo a las proporciones mencionadas por Costa y cols. con ayuda de una balanza, puesto que en la presentación en cápsulas de los antibióticos pueden haber menos miligramos de los indicados en las cajas, sobre todo en medicamentos genéricos. Debe considerarse la fecha de caducidad de los componentes del CTZ durante el tiempo que se quiere almacenar para que pueda ser utilizado con seguridad. Es relevante mencionar que el óxido de zinc empleado debe ser sin endurecedor y que el compuesto obtenido al mezclar el CTZ con eugenol en el momento operatorio debe tener un color amarillo claro y una consistencia ligera.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la contribución de este estudio es estandarizar la preparación del compuesto CTZ y las condiciones de almacenamiento para su uso clínico en el que se recomienda un adecuado uso por hasta 4 meses y puede almacenarse indistintamente en frasco ámbar y transparente.

Al estandarizar el método de preparación del CTZ se abren líneas de investigación *in vitro* sobre el mecanismo de acción del CTZ, así como de su difusión a través de los túbulos dentinarios. Las áreas de oportunidad para el mismo compuesto en estudios *in vivo* sería el estudio clínico en pacientes para evaluar su porcentaje de éxito comparado con el de otros materiales empleados para el tratamiento de necrosis pulpar en dientes primarios.



#### 4. BIBLIOGRAFÍA

1. Imparato JCP, Duarte DA, Manfro ARG. Odontopediatria: Práctica de saúde baseada em evidencias. 1st ed. Sao Paulo: Elsevier; 2013.
2. Antoniazzi BF, Pires CW, Bresolin CR, Weiss RN, Praetzel JR. Antimicrobial activity of different filling pastes for deciduous tooth treatment. *Braz Oral Res.* 2015;29(1):1-6.
3. Nedley MP. The pulpectomy in primary teeth. *J Mich Dent Assoc.* 2002;84:38-42.
4. Bruno G de B, Alves APN, Menezes VA, Maia MCG, Bruno JA, Viana GS de B. Biocompatibility evaluation of an antibiotic paste after pulpotomy in dogs. *Brazilian J Oral Sci.* 2007;6(22):1397-401.
5. Ranly DM, Garcia-Godoy F. Current and potential pulp therapies for primary and young permanent teeth. *J Dent.* 2000;28:153-61.
6. Cleghorn BM, Boorberg NB, Christie WH. Primary human teeth and their root canal systems. *Endod Top.* 2010;23(1):6-33.
7. Ruvière D, MR L, LAB S, Ito I, P N-F. Assessment of the microbiota in root canals of human primary teeth by checkerboard DNA-DNA hybridization. *J Dent Child.* 2007;74(2):118-23.
8. Takushige T, Cruz E V, Asgor Moral A, Hoshino E. Endodontic treatment of primary teeth using a combination of antibacterial drugs. *Int Endod J.* 2004;37(2):132-8.
9. Hoshino E. Sterilization of carious lesions by drugs. *Jpn Dent J.* 1990;9:32-7.
10. Chagas-Oliveira M, Sucasas-Costa L. Desempenho clínico de pulpotomias com pasta CTZ em molares decíduos: Estudo retrospectivo. *ROBRAC.* 2006;15(40):55.63.
11. Passos I, JM M, Moreira P. Utilização da pasta CTZ em dente decíduo com necrose pulpar: relato de caso. *Odontol Clin -Cient.* 2008;7(1):63-5.
12. Denari W. É possível tratar dentes decíduos com fístula sem instrumentação. *Rev da APCD.* 1996;50((2)):186-7.
13. González-Núñez D, Trejo-Quiroz P, León-Torres C, Carmona-Ruiz D. Técnica de endodoncia no instrumentada mediante el uso de la pasta CTZ. *Rev Estomat.* 2010;18(2):27-32.
14. Walther L. Endodontic treatment for primary molars. *Rev Gauch Odontol.* 1965;13(1):8-11.
15. Pérez P, Curioca S RR. Efectividad terapéutica de la pasta CTZ vs. Biomecánica convencional en pulpa necrótica de escolares de 4-8 años. *Odontopediatria Actual.* 2012;1(3):28-36.
16. Capiello J. Tratamientos pulpares en incisivos primarios. *Rev assoc odont argentina.* 1964;6:53-70.
17. Gorixto-Gil B, Abarrategui-López I. Consideraciones morfológicas de la dentición temporal. In: Boj



- J, Catalá M, García-Ballesta C, Mendoza A, editors. *Odontopediatría*. 1st ed. Madrid: Masson; 2004. p. 27–36.
18. King N, Anthonappa RP, King NM, Anthonappa RP, Itthagaran A. The importance of the primary dentition to children - Part 1 : Consequences of not treating carious teeth. *Honk Kong Pract*. 2007;29:52–61.
  19. Almeida-Ribeiro R, MSN P-C, Ribeiro de Rezende-Sucasas da Costa L. Tratamiento pulpar de dientes deciduos. In: Pires-Corrêa M, editor. *Odontopediatría en la primera infancia*. 1st ed. Madrid: Santos; 2009. p. 465–90.
  20. A R. Pulp Therapy. In: Rao A, editor. *Principles and practice of pedodontics*. 3rd ed. Nueva Delhi: Jaypee; 2012. p. 279–309.
  21. Barbería-Leache E. Terapéutica pulpar. In: Barbería-Leache E, Boj-Quesada J, Catalá-Pizarro M, García-Ballesta C, Mendoza-Mendoza A, editors. *Odontopediatría*. 2nd ed. Barcelona: Masson; 2002. p. 255–69.
  22. González-Rodríguez E, Ruiz-Linares M. Diagnóstico y tratamiento pulpar en dentición temporal. In: Boj J, Catalá M, García-Ballesta C, Mendoza A, editors. *Odontopediatría*. Masson. Barcelona: Masson; 2004. p. 173–83.
  23. Scott J, Simons N. *Introduction to dental anatomy*. 9th ed. Londres: Churchill & Livingstone; 1982.
  24. Salama FS, Anderson RW, McKnight-Hanes C, Barenie JT, Myers DR. Anatomy of primary incisor and molar root canals. *Pediatr Dent*. 2003;14(2):117–8.
  25. Lewis T, Law D. Pulpal treatment of primary teeth. In: Finn S, editor. *Clinical pedodontics*. 4th ed. Filadelfia: WB Saunders; 1973.
  26. Dummett C, Kopel H. Pediatric endodontics. In: Ingle J, Bakland L, editors. *Endodontics*. 5th ed. Londres: BC Decker; 2002. p. 861–902.
  27. Nunn R, Murray A, Sandler J. Loss of deciduous teeth: Is timing important to the GDP? *Dent Update*. 2011;38(1):55–8,61–4.
  28. Cordeiro M, MJ R. The effects of periradicular inflammation and infection on a primary tooth and permanent successor. *J Clin Pediatr Dent*. 2005;29(3):193–200.
  29. Barenie JT, Mckinney MSR V, Singh B. Scientific Articles Histopathology of furcation lesions associated with. *Pedia*. 1987;9(4):1980–3.
  30. López J. Etiología , clasificación y patogenia de la patología pulpar y periapical. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2004;9(1):52–62.
  31. Cabral F. La periodoncia en la primera infancia. In: MSN P-C, editor. *Odontopediatría en la primera infancia*. 2. 1st ed. madrid: Santos; 2009. p. 345–60.



32. Al-Ghutaimel H, Riba H, Al-Kahtani S, Al-Duhaimi S. Common periodontal diseases of children and adolescents. *Int J Dent*. 2014;2014.
33. Betancourt M, Valcarcel J, Fernández M. Lesiones pulpares y periapicales en escolares del área de atención del policlinico docente de playa. *Rev Habanera Ciencias Médicas*. 2009;8(2):1-8.
34. Pinkham J. *Infancy through adolescence*. 4th ed. Saunders: W.B.; 2005.
35. Harokopakis-Hajishengallis E. Physiologic root resorption in primary teeth:molecular and histological events. *J Oral Sci*. 2007;49(1):1-12.
36. Fouad A, GTJ H. Inflammation and immunological responses. In: Ingle J, LK B, JG B, editors. *Endodontics*. 6th ed. Canadá: Decker Inc; 2008. p. 343-76.
37. Carrotte P. Endodontic treatment for children. *Br Dent J*. 2005;198(1):9-15.
38. Rodd HD, Waterhouse PJ, Fuks a B, Fayle S a, Moffat M a. UK National Clinical Guidelines in Paediatric Dentistry Pulp therapy for primary molars. *Int J Paediatr Dent*. 2006;16(1):15-23.
39. Grossmn L. *Endodontic practice*. 11th ed. Barcelona: Lea & Febiger; 1988.
40. Mohammad G, Jerin F, Jebin S. *Pulpal Diagnosis of Primary Teeth: Guidelines for Clinical Practice*. Bangladesh *J Dent Res Educ*. 2012;2(2):65-8.
41. Marwah N. Pediatric endodontics. In: Marwah N, editor. *Textbook of pediatric dentistry*. 2nd ed. Nueva Delhi: Jaypee; 2009. p. 456-90.
42. Pumarola J, Canalda C. Patología de la pulpa y del periápice. In: Canalda C, Brau E, editors. *Endodoncia*. 2nd ed. Madrid: Masson; 2001.
43. Simring M, Golberg M. The pulpal pocket approach: retrograde periodontitis. *J Periodontol*. 1964;35:22-48.
44. Ahmed A, Hossam A, Abdelaziz K. Lesion Sterilization Tissue Repair as Adjunct to Conventional Root Canal Treatment of Combined Periodontic-Endodontic Cases. *World J Dent*. 2014;5(1):47-52.
45. Siqueira J, Rôcas I, Souto R, Uzeda M, Colombo A. Actinomyces species, streptococci and Enterococcus faecalis in primary root canal infections. *J Endod*. 2002;28(3):168-72.
46. Da Silva LAB, Nelson-Filho P, Faria G, De Souza-Gugelmin MCM, Ito IY. Bacterial profile in primary teeth with necrotic pulp and periapical lesions. *Braz Dent J*. 2006;17(2):144-8.
47. Pazelli LC, Freitas AC De, Ito IY, Souza-Gugelmin MCM De, Medeiros AS, Nelson-Filho P. Prevalence of microorganisms in root canals of human deciduous teeth with necrotic pulp and chronic periapical lesions. *Pesqui Odontol Bras*. 2003;17(4):367-71.
48. Fabris AS, Nakano V, Avila-Campos MJ. Bacteriological analysis of necrotic pulp and fistulae in primary teeth. *J Appl oral Sci*. 2014;22(2):118-24.



49. Bhandari S, Prajapati U, Anita. Root canal obturation of primary teeth: Disposable injection technique. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2012;30(1):13.
50. Guideline on pulp therapy for primary and immature permanent teeth. Chicago; 2009. Report No.: 6.
51. Siegl R, Lenzi T, Politano G, Benedetto M, Imperato J, Pinheiro S. Two endodontics techniques analysis in primary molars with fistula. *Rev Gauch Odontol.* 2015;63(2):187-94.
52. Perona G, Mungi S. Tratamiento Endodóntico no Instrumentado en dientes deciduos Terapia Endodôntica sem Instrumentação na dentição decídua Non Instrumental Endodontic Treatment in Primary Teeth Abstract. *Rev odontopediatria Latinoam.* 2014;4(1):53-64.
53. Calizto-Chanca K, Correa-Olaya E, Anchelia-Ramírez S. Efectividad clínica y radiográfica de dos pastas antibióticas empleadas en necrosis pulpar en niños de un hospital nacional del Perú clinical and radiographic effectiveness of two antibiotic pastes. *KIRU.* 2014;11(2):115-22.
54. Cruz E V., Kota K, Huque J, Iwaku M, Hoshino E. Penetration of propylene glycol into dentine. *Int Endod J.* 2002;35(4):330-6.
55. Agarwal M, Das UM, Vishwanath D. A comparative evaluation of noninstrumentation endodontic techniques with conventional ZOE pulpectomy in deciduous molars: An in vivo study. *World J Dent.* 2011;2:187-92.
56. Anila B, Murali H, Cheranjeevi J, Kapil R. Lesion sterilization and tissue repair (LSTR): A review. *J Sci Dent.* 2014;4(2):49-55.
57. Vijayaraghavan R, Mathian V, AM S. Triple antibiotic paste in root canal therapy. *J Pharm Bioallied Sci.* 2012;4:230-3.
58. Windley W, Texeira F, Trope M. Disinfection of immature teeth with a triple antibiotic paste. *J Endo2.* 2005;31(6):439-43.
59. Grieve A. A clinical trial of three root canal medicaments. *Br Dent J.* 1973;134(5):188-93.
60. Prabhakar A, Taur S, Hadakar S. Comparison of antibacterial efficacy of calcium hydroxide paste, 2% chlorhexidine gel and turmeric extract as an intracanal medicament and their effect on microhardness of root dentin: an in vitro study. *Int J ClinPediatr Dent.* 2013;6(3):171-7.
61. Rabinowitch B. Pulp management in primary teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1953;6:542-50.
62. Leal S, Bezerra A, AO. T. Orientações terapêuticas utilizadas pelos cursos de especialização em Odontopediatria no Brasil para a cárie severa da infância. *Rev ABENO.* 2004;4(1):57-62.
63. Mariana Amorim Chagas de OLIVEIRA \* LR de RS da C. Clinical Outcomes of Ctz Pulpotomies in Deciduous Molars : a Retrospective Study. *Rev Odontológica do Bras Cent.* 2006;15(40).



64. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Produtos para Saúde. Disponible en <http://portal.anvisa.gov.br>
65. Tripathi M. Tetraciclinas, cloranfenicol y antibióticos aminoglucósidos. In: Tripathi M, editor. *Farmacología en odontología*. 1st ed. New Delhi: Editorial Médica Panamericana; 2008. p. 419–34.
66. Mortazavi M, Mesbahi M. Comparison of zinc oxide and eugenol, and vitapex for root canal treatment of necrotic primary teeth. *Int J Paediatr Dent*. 2004;14(6):417–24.
67. Özlü N, Saroglu I, Sönmez H. Evaluation of various root canal filling materials in primary molar pulpectomies: an in vivo study. *Am J Dent*. 2005;18(6):347–50.
68. Binoy D, Sajjan G, Peddireddi S, Rama-Kumar M, Bhavana V, Rama-Raju S. A Comparative Evaluation of Sealing Ability, pH and Rheological Properties of Zinc Oxide Eugenol Sealer Combined with Different Antibiotics: An In Vitro Study. *J Clin Diagnostic Res*. 2014;8(11):5–8.
69. Hegde M, Hegde N, Puri A, Kurami S, Sanjeev G, Sheety S. Value Addition Property of Zinc Oxide Eugenol after Electron Beam Radiation. *RJPBCS*. 2013;4(2):243–6.
70. Rezende EDF, Mendes-Costa MC, Fonseca JC, Ribeiro AO. Evaluation of the genotoxicity of zinc oxide-eugenol cement to *Allium cepa* L. *Acta Sci Biol Sci*. 2013;35(4):563–9.
71. Martínez AP, Ibarra JG, Rivas LC. Efecto del eugenol residual en los conductos radiculares sobre la adhesión de endopostes lumínicos prefabricados, cementados con resina compuesta. *Rev Odontol Mex*. Elsevier; 2014;18(1):14–8.
72. Camps J, Pommel L, Bukiet F, About I. Influence of the powder/liquid ratio on the properties of zinc oxide-eugenol-based root canal sealers. *Dent Mater*. 2004;20(10):915–23.
73. Jaya A, Praveen P, Anantharaj A, Venkataraghavan K, Prathibha Rani S. *In Vivo* Evaluation of Lesion Sterilization and Tissue Repair in Primary Teeth Pulp Therapy Using Two Antibiotic Drug Combinations. *J Clin Pediatr Dent*. 2012;37(2):189–91.
74. Hoshino E, Kota K, Sato M, Ando N. Bactericidal efficacy of Metronidazol against bacteria of human carious dentin in vivo. *Caries Res*. 1996;23:78–80.
75. Capiello J. Nuevos enfoques en odontología infantil. *Odontol Uruguay*. 1967;23:23–30.
76. Guedes-Pinto A. *Odontopediatria clínica*. 1st ed. Sao Paulo: Artes Medicas; 1998.
77. Bruno G, Menezes VA, Bruno JA, Wagner De Almeida M, Socorro De Barros Viana G. Avaliações hematológicas e bioquímicas do sangue de cães submetidos a pulpotomias com cimento de antibiótico. *Rev Odontol da UNESP*. 2006;35(3):125–33.
78. Vanden-Berghe D, Vlietinck A. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: Dey P, Harbone J, editors. *Methods in plant biochemistry*. 1st ed. Londres: Academic Press; 1991. p. 47–69.



79. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal. Elsevier*; 2015;6(2):1-9.
80. Das K, Tiwari R, Shrivastava D. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: current methods and future trends. *J Med Plants Res.* 2010;4:104-11.
81. Acar J, Goldstein F. Disk susceptibility test. In: Lorian V, editor. *Antibiotics in laboratory medicine.* 4th ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1996. p. 1-51.
82. de Amorim LFG, de Toledo OA, Estrela CRA, de Decurcio DA, Estrela C. Antimicrobial analysis of different root canal filling pastes used in pediatric dentistry by two experimental methods. *Braz Dent J.* 2006;17(4):317-22.
83. Piva F, Medeiros I, Junior F, Estrela C. Antimicrobial Activity of Different Root Canal Filling Pastes Used in Deciduous Teeth. *Mater Res.* 2008;11(2):171-3.
84. Piva F, Faraco Junior IM, Feldens CA, Estrela CR de A. Ação antimicrobiana de materiais empregados na obturação dos canais de dentes decíduos por meio da difusão em ágar: Estudo in vitro. *Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr.* 2009;9(1):13-7.
85. Selezska K. *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited under environmental focus. Technischen Universität Carolo-Wilhelmina; 2010.
86. Chugani S, Greenberg E. The influence of human respiratory epithelia on *Pseudomonas aeruginosa* gene expression. *Microb Pathog.* 2007;42:29-35.
87. Goldberg J, Pier G. The role of the CFTR in susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Trends Microbiol.* 2000;8:514-20.
88. Abinader-Silva S, Esmeraldo-Silva L, Cunha-Kalil M, Leal B, Correa L, Santos D, et al. evaluation of antimicrobial activity of mta and portland cement in enterococcus faecalis and pseudomonas aeruginosa. *Rev Flum Odontol.* 2011;17(36):47-52.
89. Harris LG, Foster SJ, Richards RG, Lambert P, Stickler D, Eley A. An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: Review. *Eur Cells Mater.* 2002;4:39-60.
90. Howard B, Kloss W. *Staphylococci.* In: Howard B, Klass J, Rubin S, Weissfeld A, Tilton R, editors. *Clinical and pathogenic microbiology.* 1st ed. Washington D.C.: Mosby; 1987. p. 231-44.
91. Bueris V, Pimenta FC, Ito IY, Marin JM. Oral incidence of *Staphylococcus aureus* and antimicrobials agents resistance. *Brazilian J Oral Sci.* 2005;4(12):676-9.
92. Sherman J. The streptococci. *Bacteriol Rev.* 1937;1:3-97.
93. Valadares M, Soares J, Nogueira C. The efficacy of a cervical barrier in preventing microleakage of *Enterococcus faecalis* in endodontically treated teeth. *Gen Dent.* 2011;59(1):32-7.

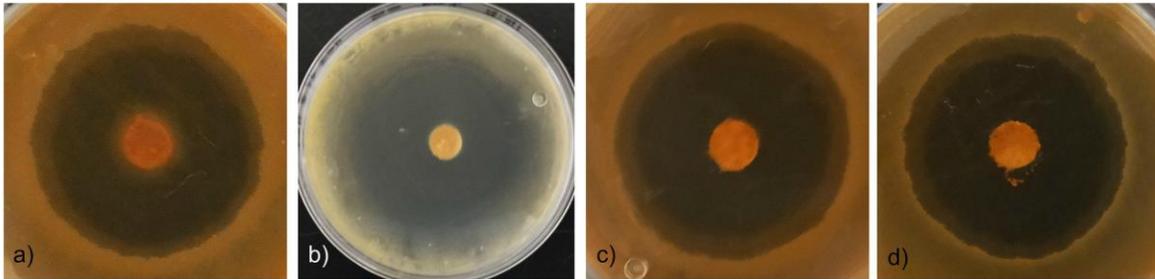


94. Vidana R, Sullivan A, Billstrom H, Ahlquist M, Lund B. Enterococcus faecalis infection in root canals -host derived or exogenous source? *Lett Appl Microbiol.* 2011;52(2):109-15.
95. Bhardwaj SB. Role of Enterococci faecalis in failure of Endodontic treatment. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 2013;2(8):272-7.
96. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic Escherichia coli. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(2):123-40.
97. Sweeney N. The Escherichia coli K-12 gntP gene allows E.coli F-18 to occupy a distinct nutritional niche in the streptomycin-treated mouse large intestine. *Infect Immun.* 1996;64:3497-503.
98. Daniluk T, Fiedoruk K, Sciepuk M, Zaremba ML, Rozkiewicz D, Cylwik-Rokicka D, et al. Aerobic bacteria in the oral cavity of patients with removable dentures. *Adv Med Sci.* 2006;51:86-90.
99. Barriol J, Rivail J. *Spectroscopies de la molecul.* 1st ed. France: Presses Universitaires de France; 1970.
100. Stuart B, George B, McIntyre P. *Modern infrared spectroscopy.* 2nd ed. Wiley; 1996. 200 p.
101. Günzler H, Gremlich H-U. *IR spectroscopy: An Introduction.* 1st ed. Wiley-VCH; 2002. 361 p.
102. Stuart B. *Infrared spectroscopy: Fundamentals and applications.* 1st ed. Wiley; 2004. 244 p.
103. Costa C, Banatti-Neto C, Abdalla R, Gonzaga H, Lia R. No Estudo preliminar da compatibilidade biológica de um cimento à base de antibiótico e óxido de zinco e eugenol quando implantado em tecido subcutâneo de rato. *Rev Odontol Univ São Paulo.* 1994;8(1):65-70.
104. Heredia-Azerrat C, Acosta-Quinones J, Flores-Mori M, Gonzales-Vega B, Melgar-Hermoza R, Yamamoto-Umazaki F. *Manual de procedimientos clínicos.* Lima; 1994.
105. Estrela C, Ribeiro R, Estrela C, Pécora J, Sousa-Neto M. Antimicrobial effect of 2% Sodium Hypochlorite and 2% Chlorhexidine tested by different methods. *Braz Dent J.* 2003;14:58-62.

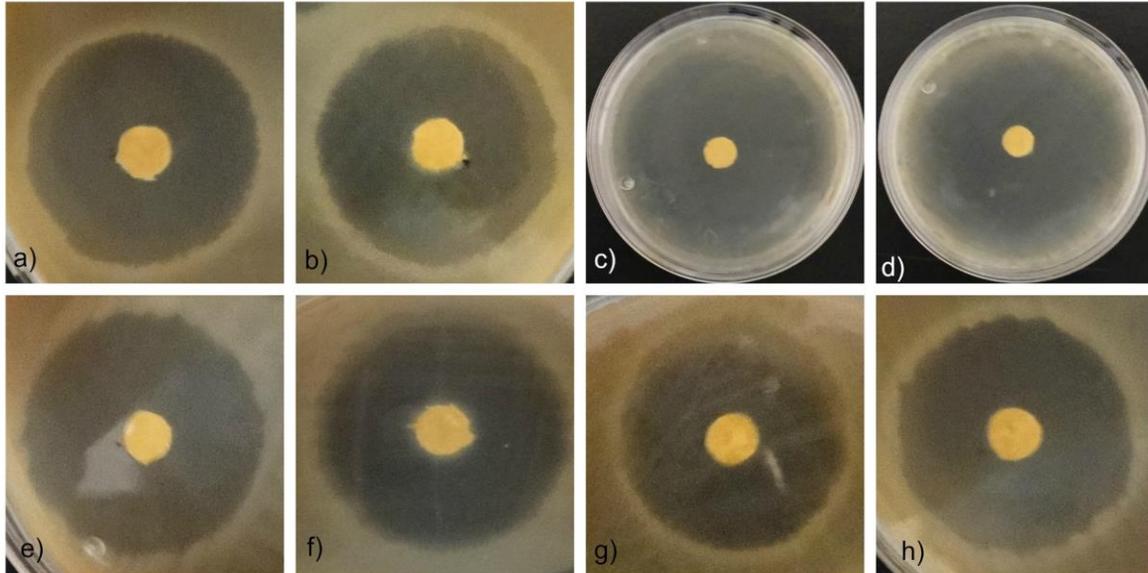
# ANEXOS

---

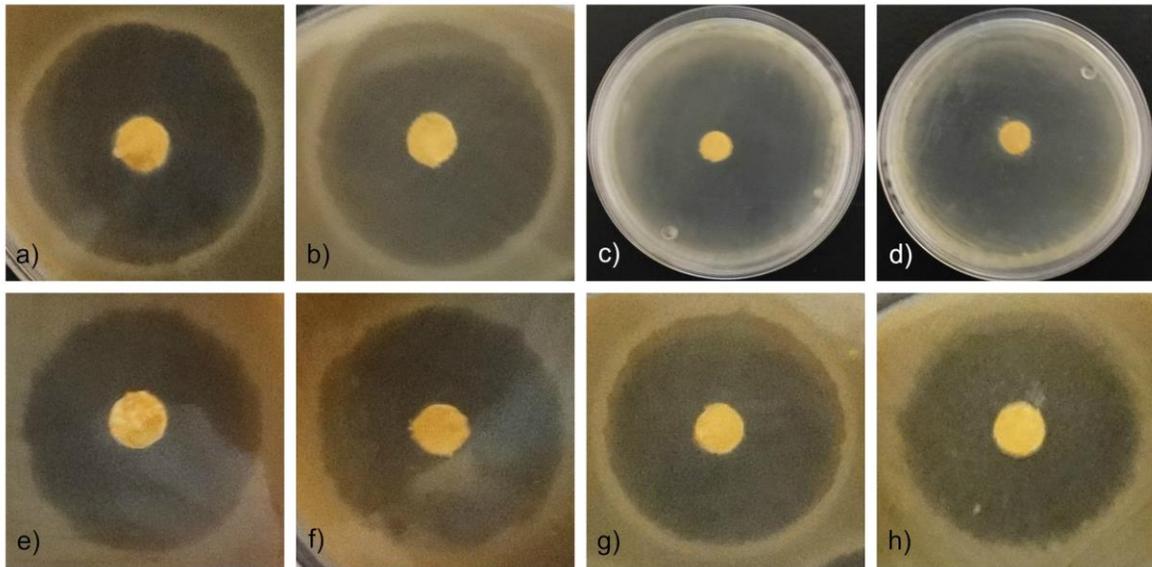
ANEXO 1. Zonas de inhibición de la semana inicial. a) *P. aeruginosa*; b) *S. aureus*; c) *E. faecalis*; d) *E. coli*



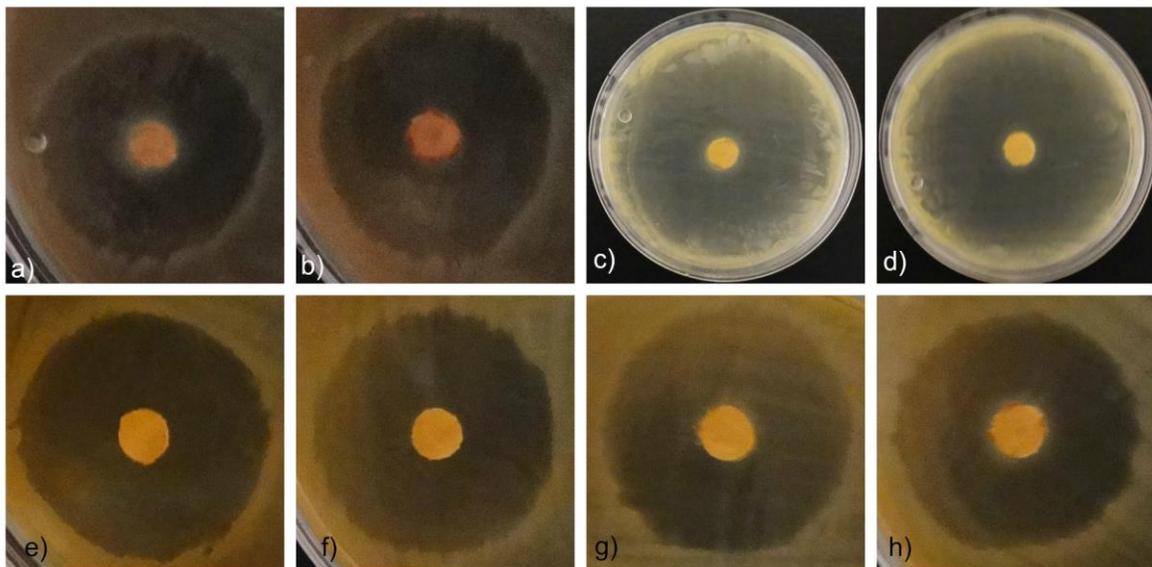
ANEXO 2. Zonas de inhibición de la semana 4. a) *P. aeruginosa* grupo A; b) *P. aeruginosa* grupo T; c) *S. aureus* grupo A; d) *S. aureus* grupo T; e) *E. faecalis* grupo A; f) *E. faecalis* grupo T; g) *E. coli* grupo A; h) *E. coli* grupo T



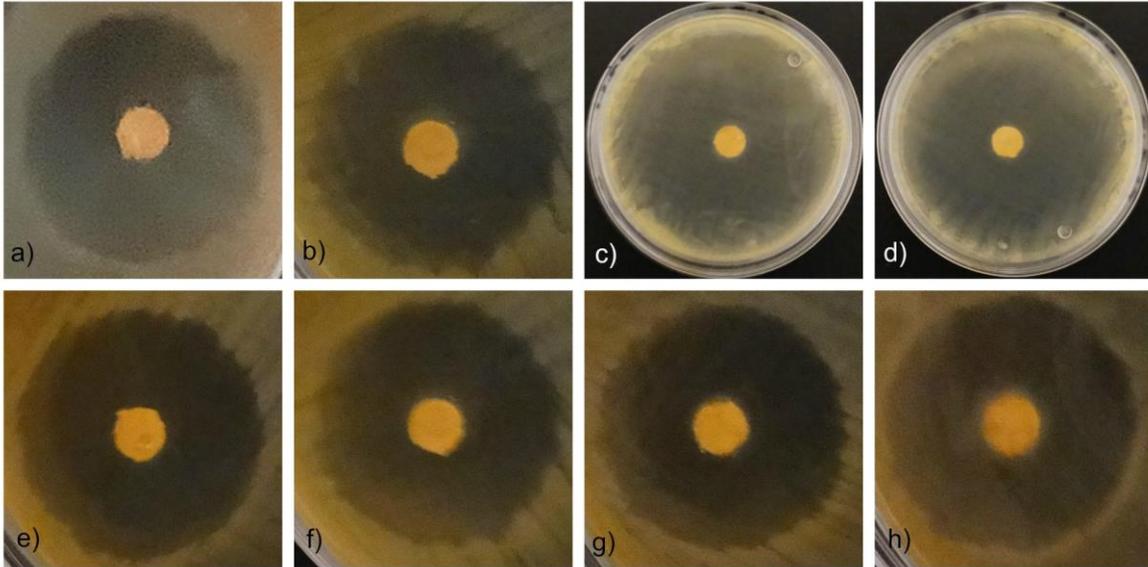
ANEXO 3. Zonas de inhibición de la semana 6. a) *P. aeruginosa* grupo A; b) *P. aeruginosa* grupo T; c) *S. aureus* grupo A; d) *S. aureus* grupo T; e) *E. faecalis* grupo A; f) *E. faecalis* grupo T; g) *E. coli* grupo A; h) *E. coli* grupo T



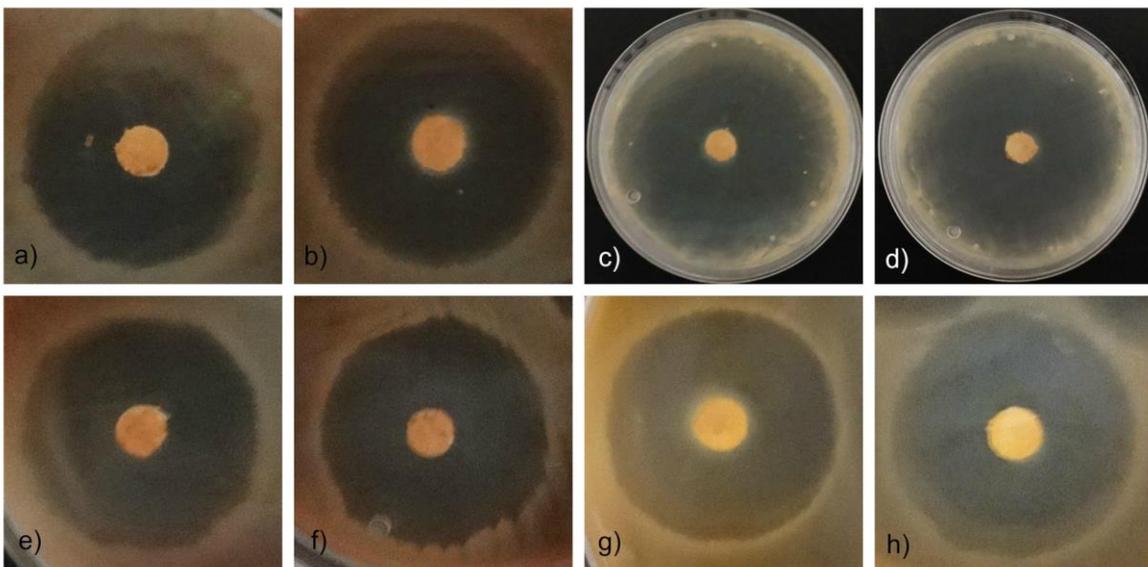
ANEXO 4. Zonas de inhibición de la semana 8. a) *P. aeruginosa* grupo A; b) *P. aeruginosa* grupo T; c) *S. aureus* grupo A; d) *S. aureus* grupo T; e) *E. faecalis* grupo A; f) *E. faecalis* grupo T; g) *E. coli* grupo A; h) *E. coli* grupo T



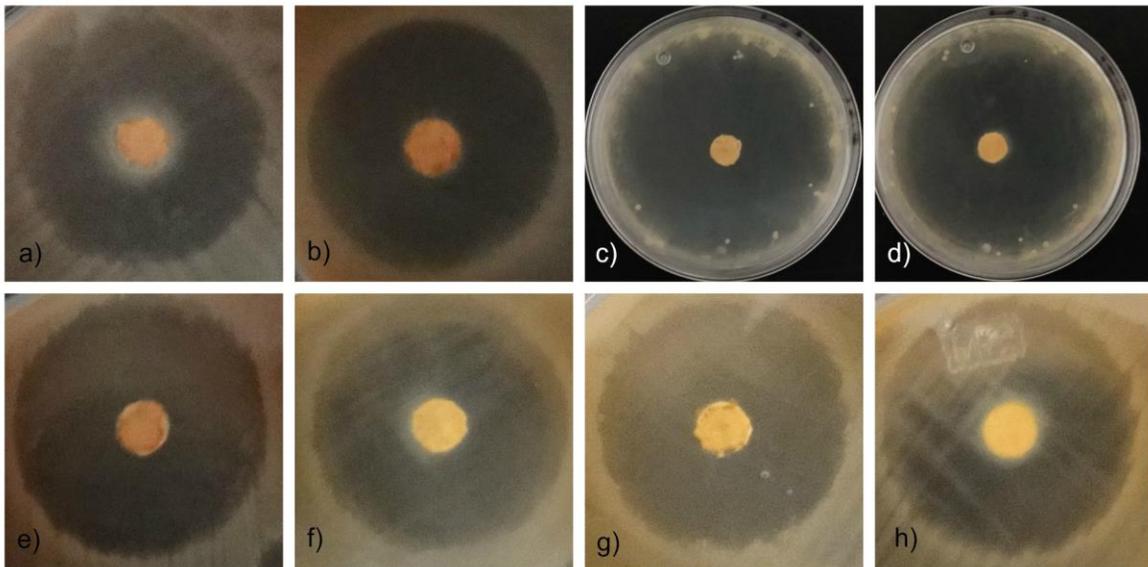
ANEXO 5. Zonas de inhibición de la semana 10. a) *P. aeruginosa* grupo A; b) *P. aeruginosa* grupo T; c) *S. aureus* grupo A; d) *S. aureus* grupo T; e) *E. faecalis* grupo A; f) *E. faecalis* grupo T; g) *E. coli* grupo A; h) *E. coli* grupo T



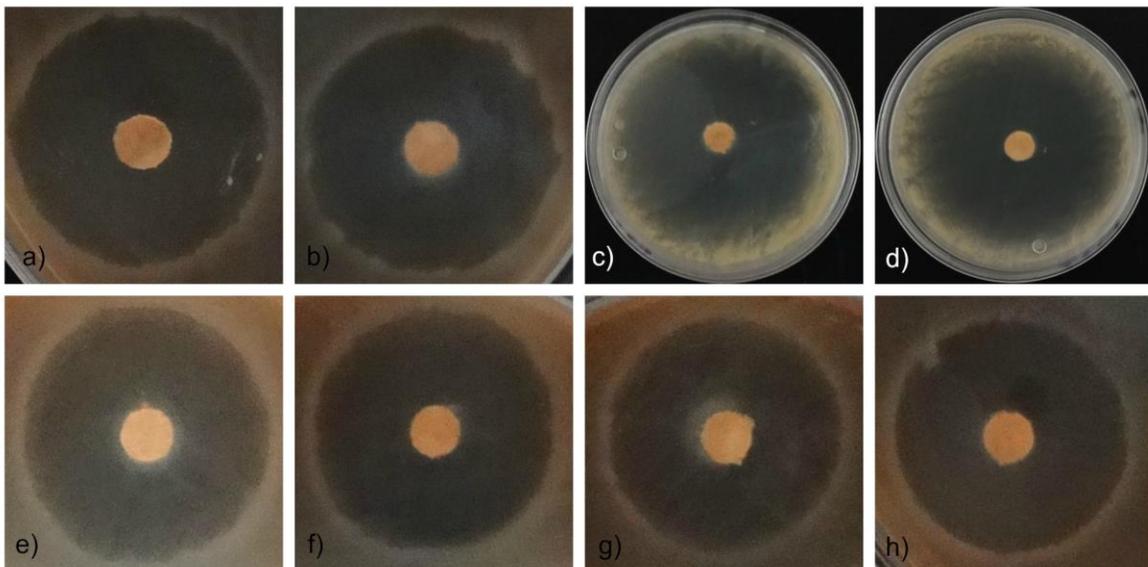
ANEXO 6. Zonas de inhibición de la semana 12. a) *P. aeruginosa* grupo A; b) *P. aeruginosa* grupo T; c) *S. aureus* grupo A; d) *S. aureus* grupo T; e) *E. faecalis* grupo A; f) *E. faecalis* grupo T; g) *E. coli* grupo A; h) *E. coli* grupo T



ANEXO 7. Zonas de inhibición de la semana 14. a) *P. aeruginosa* grupo A; b) *P. aeruginosa* grupo T; c) *S. aureus* grupo A; d) *S. aureus* grupo T; e) *E. faecalis* grupo A; f) *E. faecalis* grupo T; g) *E. coli* grupo A; h) *E. coli* grupo T



ANEXO 8. Zonas de inhibición de la semana 16. a) *P. aeruginosa* grupo A; b) *P. aeruginosa* grupo T; c) *S. aureus* grupo A; d) *S. aureus* grupo T; e) *E. faecalis* grupo A; f) *E. faecalis* grupo T; g) *E. coli* grupo A; h) *E. coli* grupo T





## ANEXO 9. Registro de las zonas de inhibición de la semana inicial

### INICIAL

11 de diciembre 2015

M1															
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
P. aeruginosa	28,78	28,42	28,73	28,36	28,57	29,85	30,49	29,89	30,58	30,20	29,55	29,67	29,52	29,51	29,56
S. aureus	37,11	37,05	38,90	36,62	37,42	34,40	37,46	35,75	35,10	35,68	37,81	40,24	38,87	39,14	39,02
E. faecalis	29,44	29,97	29,60	30,16	29,79	29,26	30,45	30,69	30,32	30,18	29,01	29,89	29,55	28,94	29,35
E. coli	28,87	29,19	29,18	29,37	29,15	28,30	28,52	29,04	29,26	28,78	28,65	28,52	28,96	29,29	28,86

M2															
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
P. aeruginosa	29,42	29,14	29,73	29,55	29,46	31,18	30,76	30,59	30,85	30,85	28,98	29,05	28,90	29,23	29,04
S. aureus	36,37	33,61	37,22	36,74	35,99	34,45	30,50	33,73	34,01	33,17	32,00	35,78	35,90	36,34	35,01
E. faecalis	29,69	29,88	29,60	30,30	29,87	29,72	29,92	29,74	29,89	29,82	30,40	31,20	30,57	31,16	30,83
E. coli	28,81	29,69	28,27	27,84	28,65	28,62	29,10	28,60	28,31	28,66	28,55	28,43	28,38	28,74	28,53



## ANEXO 10. Registro de las zonas de inhibición de la semana 4

### Semana 4 (prueba 1)

08 de enero 2016

	M1A														
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
P. aeruginosa	30,54	30,76	31,69	31,86	31,21	29,87	29,92	29,23	30,04	29,77	29,74	30,18	29,82	30,66	30,10
S. aureus	36,49	38,84	39,19	37,77	38,07	38,42	38,69	38,93	37,16	38,30	37,15	36,12	38,14	35,90	36,83
E. faecalis	28,15	28,79	28,81	27,04	28,20	27,87	28,80	29,18	28,51	28,59	28,95	26,70	28,97	30,68	28,83
E. coli	30,48	29,35	29,29	29,37	29,62	29,65	30,09	30,39	30,17	30,08	27,85	27,60	28,30	28,74	28,12

	M1T														
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
P. aeruginosa	29,39	29,31	28,88	29,16	29,19	30,01	29,67	29,54	30,31	29,88	29,66	29,27	29,46	29,41	29,45
S. aureus	36,20	37,65	36,83	39,48	37,54	35,77	36,68	39,98	35,09	36,88	32,00	35,52	36,41	38,16	35,52
E. faecalis	32,47	31,50	31,99	31,99	31,99	29,43	28,38	29,00	28,99	28,95	28,07	28,83	28,67	28,23	28,45
E. coli	28,07	28,19	28,23	27,28	27,94	29,79	28,57	28,96	29,63	29,24	27,87	28,35	28,11	27,87	28,05

	M2A														
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
P. aeruginosa	28,06	27,84	27,13	28,36	27,85	28,62	28,91	27,93	28,30	28,44	30,43	29,86	29,72	29,89	29,98
S. aureus	38,21	36,96	35,47	38,84	37,37	36,14	38,89	38,14	36,91	37,52	39,11	38,23	36,87	37,97	38,05
E. faecalis	30,86	30,88	30,30	30,16	30,55	29,82	31,82	30,62	30,36	30,66	29,27	29,47	30,68	30,11	29,88
E. coli	29,45	30,03	28,21	28,89	29,15	28,78	28,58	29,15	29,02	28,88	28,42	28,85	28,16	28,53	28,49

	M2T														
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
P. aeruginosa	29,93	29,62	30,05	29,96	29,89	28,91	29,10	29,23	28,43	28,92	29,61	29,07	29,24	30,38	29,58
S. aureus	34,85	34,22	34,72	35,21	34,75	37,55	35,53	35,76	33,97	35,70	32,50	33,88	32,74	34,28	33,35
E. faecalis	29,42	28,61	28,29	29,38	28,93	28,47	29,31	28,85	29,44	29,02	29,69	29,10	30,27	30,29	29,84
E. coli	28,56	28,04	28,41	28,42	28,36	29,82	29,03	28,52	28,96	29,08	28,82	28,35	28,38	28,73	28,57



## ANEXO 11. Registro de las zonas de inhibición de la semana 6

### Semana 6 (prueba 2)

22 de enero 2016

M1A															
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
P. aeruginosa	29,76	30,66	30,27	29,89	30,15	28,87	29,04	28,47	28,79	28,79	29,90	30,53	29,12	30,05	29,90
S. aureus	37,50	36,77	36,06	36,59	36,73	37,10	35,17	36,76	35,80	36,21	34,66	36,75	36,93	32,52	35,22
E. faecalis	30,30	30,48	30,16	30,09	30,26	30,38	30,37	30,71	30,43	30,47	30,94	30,56	29,78	29,89	30,29
E. coli	29,12	28,98	28,44	28,32	28,72	28,04	28,27	28,05	27,81	28,04	28,17	28,48	28,37	28,28	28,33

M1T															
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
P. aeruginosa	29,73	29,35	29,48	30,27	29,71	29,72	30,64	30,36	30,32	30,26	29,68	30,13	30,26	29,99	30,02
S. aureus	35,78	36,11	35,54	34,80	35,56	34,74	34,67	33,51	35,32	34,56	34,82	38,25	36,20	36,11	36,35
E. faecalis	30,36	29,82	28,72	30,21	29,78	30,40	30,46	31,28	30,81	30,74	30,94	31,76	32,39	31,70	31,70
E. coli	28,36	28,09	28,05	27,78	28,07	28,18	27,76	27,71	27,88	27,88	28,14	27,70	27,33	27,62	27,70

M2A															
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
P. aeruginosa	30,51	30,84	30,93	30,96	30,81	31,49	30,46	29,41	30,81	30,54	30,56	30,76	31,08	30,68	30,77
S. aureus	37,71	37,93	36,80	37,92	37,59	36,36	35,73	34,85	35,22	35,54	33,38	32,91	33,79	34,11	33,55
E. faecalis	29,64	29,81	30,09	30,94	30,12	30,54	30,81	30,36	30,50	30,55	30,89	30,47	31,03	30,98	30,84
E. coli	29,53	29,32	29,12	29,45	29,36	29,00	28,90	28,65	29,35	28,98	28,59	28,16	27,46	27,41	27,91

M2T															
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
P. aeruginosa	28,21	28,39	28,95	28,59	28,54	29,86	30,36	30,01	29,80	30,01	29,63	29,63	29,69	29,63	29,65
S. aureus	36,18	35,27	36,14	34,36	35,49	36,57	36,36	36,58	36,40	36,48	36,85	33,56	34,88	35,10	35,10
E. faecalis	29,58	30,01	29,75	29,13	29,62	29,89	29,44	29,78	29,86	29,74	29,75	28,90	28,71	30,28	29,41
E. coli	27,83	27,38	27,04	27,42	27,42	27,41	27,13	27,30	27,51	27,34	28,05	27,78	27,17	27,67	27,67



## ANEXO 12. Registro de las zonas de inhibición de la semana 8

### Semana 8 (prueba 3)

05 de febrero 2016

M1A															
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
P. aeruginosa	30,04	30,73	30,24	30,08	30,27	30,52	30,31	30,09	30,11	30,26	30,39	30,25	30,77	30,41	30,46
S. aureus	33,52	33,75	32,27	32,07	32,90	33,27	35,95	35,57	35,76	35,14	32,43	32,56	34,50	33,18	33,17
E. faecalis	30,28	30,49	30,04	30,47	30,32	30,69	31,05	30,84	30,37	30,74	29,64	29,97	30,22	29,40	29,81
E. coli	30,45	30,26	29,90	29,94	30,14	29,85	29,32	29,95	29,41	29,63	29,11	30,25	29,91	29,30	29,64

M1T															
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
P. aeruginosa	29,59	30,17	29,84	29,47	29,77	30,01	29,74	29,47	29,30	29,63	29,77	30,22	29,99	29,73	29,93
S. aureus	31,44	30,88	32,33	36,19	32,71	35,80	35,38	34,11	35,17	35,12	36,64	33,77	33,89	33,44	34,44
E. faecalis	29,86	29,97	29,85	30,44	30,03	29,63	30,03	30,64	30,25	30,14	29,82	30,84	30,06	30,37	30,27
E. coli	29,25	28,98	29,91	29,53	29,42	29,86	29,84	30,48	30,35	30,13	29,28	30,15	30,68	29,66	29,94

M2A															
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
P. aeruginosa	30,05	30,15	29,42	29,75	29,84	30,06	30,00	29,13	30,33	29,88	29,91	29,11	29,56	30,62	29,80
S. aureus	35,23	36,44	33,06	33,93	34,67	34,39	33,94	33,40	34,18	33,98	35,55	34,82	34,73	35,01	35,03
E. faecalis	31,08	31,41	31,76	30,33	31,15	30,79	30,15	30,56	30,22	30,43	31,75	31,43	30,95	28,31	30,61
E. coli	28,59	28,07	28,35	28,13	28,29	28,25	27,38	28,98	28,98	28,40	28,31	28,38	27,89	28,40	28,25

M2T															
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
P. aeruginosa	29,78	29,45	30,52	30,15	29,98	29,00	28,98	28,23	28,01	28,56	29,36	29,35	29,04	29,80	29,39
S. aureus	33,56	32,89	33,01	33,68	33,29	32,02	34,25	34,29	31,67	33,06	31,13	32,52	31,07	32,82	31,89
E. faecalis	29,81	29,18	28,89	28,68	29,14	29,15	28,70	29,30	29,81	29,24	30,33	30,46	29,76	29,85	30,10
E. coli	28,20	28,98	29,24	28,61	28,76	28,69	28,77	28,54	28,17	28,54	28,51	29,22	29,49	28,75	28,99



## ANEXO 13. Registro de las zonas de inhibición de la semana 10

### Semana 10 (prueba 4)

19 de febrero 2016

M1A															
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
P. aeruginosa	30,55	30,01	30,28	30,34	30,30	30,36	30,96	31,27	29,93	30,63	29,82	30,80	31,06	30,64	30,58
S. aureus	36,79	35,28	36,00	36,01	36,02	36,87	38,19	37,31	39,74	38,03	40,18	40,50	40,32	42,01	40,75
E. faecalis	31,61	31,29	32,37	31,96	31,81	30,64	31,70	31,06	30,90	31,08	31,83	32,82	31,83	32,72	32,30
E. coli	31,48	29,92	30,20	30,75	30,59	30,58	29,98	30,41	30,70	30,42	31,18	30,87	30,82	31,68	31,14

M1T															
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
P. aeruginosa	29,75	29,02	30,07	29,78	29,66	30,80	30,37	30,44	29,88	30,37	29,30	29,84	30,07	30,09	29,83
S. aureus	40,10	38,74	38,08	36,38	38,33	37,63	34,31	38,48	38,67	37,27	38,44	38,82	37,43	37,53	38,06
E. faecalis	31,13	30,35	30,38	30,46	30,58	30,31	30,81	30,71	30,61	30,61	28,73	29,87	29,67	29,33	29,40
E. coli	31,19	32,46	32,29	30,29	31,56	29,51	29,90	30,21	28,62	29,56	30,41	29,59	29,08	31,30	30,10

M2A															
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
P. aeruginosa	31,36	31,62	31,32	31,55	31,46	31,84	31,29	30,60	31,26	31,25	30,84	30,89	31,13	30,84	30,93
S. aureus	40,71	40,14	39,12	39,58	39,89	37,53	39,07	37,94	36,65	37,80	38,83	36,03	38,15	36,53	37,39
E. faecalis	31,21	30,41	30,82	31,28	30,93	31,50	31,51	31,85	31,57	31,61	32,70	32,33	32,58	30,83	32,11
E. coli	30,51	30,93	30,45	29,89	30,45	29,37	30,06	30,16	29,17	29,69	30,17	29,94	29,00	30,79	29,98

M2T															
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
P. aeruginosa	30,42	29,85	29,25	29,62	29,79	29,94	30,06	29,76	30,67	30,11	29,85	29,72	30,29	29,94	29,95
S. aureus	36,27	38,96	39,46	38,89	38,40	39,00	38,18	39,48	38,35	38,75	38,22	36,56	36,05	37,60	37,11
E. faecalis	31,15	31,36	30,73	31,05	31,07	30,91	31,30	30,80	31,28	31,07	31,28	32,10	31,49	31,26	31,53
E. coli	30,29	29,89	29,91	29,51	29,90	29,86	30,88	29,92	30,19	30,21	30,14	29,73	30,16	29,60	29,91



## ANEXO 14. Registro de las zonas de inhibición de la semana 12

### Semana 12 (prueba 5)

04 de marzo 2016

M1A															
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
P. aeruginosa	29,60	29,44	29,37	28,44	29,21	28,87	28,97	29,07	28,65	28,89	28,93	30,23	29,48	29,08	29,43
S. aureus	32,85	34,25	34,53	33,20	33,71	33,29	35,32	32,49	34,87	33,99	33,12	34,74	33,51	34,08	33,86
E. faecalis	29,24	29,70	29,47	29,70	29,53	29,92	30,19	29,21	29,42	29,69	29,96	30,12	30,85	31,16	30,52
E. coli	28,96	28,34	28,58	29,11	28,75	27,33	27,83	27,51	27,81	27,62	28,08	28,76	28,98	28,65	28,62

M1T															
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
P. aeruginosa	28,52	29,73	29,18	28,26	28,92	29,67	28,14	27,79	30,42	29,01	29,74	29,22	29,67	29,06	29,42
S. aureus	36,05	35,51	35,17	35,42	35,54	34,70	34,45	35,14	34,93	34,81	31,94	33,20	29,48	30,12	31,19
E. faecalis	29,10	28,96	29,46	29,61	29,28	28,61	28,22	28,29	28,80	28,48	28,79	29,30	29,47	29,45	29,25
E. coli	28,78	28,73	29,19	28,88	28,90	28,21	28,71	28,27	27,54	28,18	27,80	27,55	26,93	27,08	27,34

M2A															
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
P. aeruginosa	28,21	28,90	29,08	30,17	29,09	29,88	29,58	29,36	29,83	29,66	29,29	30,04	29,12	28,19	29,16
S. aureus	34,57	31,31	32,40	32,79	32,77	34,04	33,42	28,33	31,38	31,79	29,76	29,26	29,94	25,99	28,74
E. faecalis	28,82	28,67	28,94	28,75	28,80	29,85	28,76	28,93	29,17	29,18	29,21	29,57	29,74	29,34	29,47
E. coli	27,59	28,25	27,44	28,73	28,00	28,92	28,48	28,48	28,36	28,56	28,73	28,04	28,50	28,25	28,38

M2T															
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
P. aeruginosa	28,59	28,56	28,61	28,55	28,58	28,55	28,33	29,63	28,31	28,71	28,34	28,56	30,02	29,57	29,12
S. aureus	32,83	34,27	33,70	35,95	34,19	34,02	32,32	31,59	35,36	33,32	31,46	32,16	30,99	32,30	31,73
E. faecalis	28,41	28,04	29,54	29,21	28,80	29,52	28,89	28,43	29,88	29,18	28,14	27,48	28,63	27,51	27,94
E. coli	27,44	28,33	27,84	28,34	27,99	28,23	28,43	28,57	28,51	28,44	27,88	28,85	28,23	28,13	28,27



## ANEXO 15. Registro de las zonas de inhibición de la semana 14

### Semana 14 (prueba 6)

18 de marzo 2016

M1A															
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
	P. aeruginosa	29,65	30,52	29,88	29,58	29,91	29,72	29,95	29,39	28,72	29,45	28,91	29,16	29,24	28,85
S. aureus	38,77	39,22	37,60	37,10	38,17	37,66	39,55	39,22	39,25	38,92	38,97	37,83	38,33	39,33	38,62
E. faecalis	30,65	30,30	30,89	31,73	30,89	30,71	29,97	30,02	29,48	30,05	31,88	31,29	30,74	30,86	31,19
E. coli	29,12	29,17	28,64	30,43	29,34	27,77	29,03	28,33	28,51	28,41	28,96	29,59	29,87	29,81	29,56

M1T															
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
	P. aeruginosa	30,19	29,60	30,42	30,35	30,14	28,94	28,77	28,90	28,83	28,86	29,28	29,68	29,81	29,23
S. aureus	38,77	37,06	37,17	39,19	38,05	39,37	37,06	39,12	36,59	38,04	40,13	37,00	37,47	37,52	38,03
E. faecalis	31,07	30,73	29,87	30,25	30,48	30,27	29,99	29,81	30,12	30,05	29,92	30,68	29,90	30,79	30,32
E. coli	28,82	28,96	28,61	29,07	28,87	30,15	29,41	28,88	30,03	29,62	30,41	29,85	29,61	29,66	29,88

M2A															
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
	P. aeruginosa	29,25	28,88	30,01	30,09	29,56	28,81	29,34	29,14	29,31	29,15	29,78	29,46	29,84	29,66
S. aureus	37,23	36,97	37,54	36,51	37,06	34,88	36,70	35,62	38,65	36,46	37,90	35,93	35,79	34,53	36,04
E. faecalis	30,06	30,11	29,79	29,73	29,92	30,30	29,84	29,67	29,88	29,92	30,00	29,69	29,46	29,82	29,74
E. coli	29,49	29,23	29,52	29,56	29,45	28,42	29,21	28,99	28,85	28,87	28,35	28,86	28,45	28,86	28,63

M2T															
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
	P. aeruginosa	28,92	29,53	29,05	29,60	29,28	30,31	30,48	30,32	30,33	30,36	29,98	29,59	29,92	29,84
S. aureus	39,77	38,85	36,79	37,13	38,14	35,90	34,94	35,30	33,80	34,99	34,52	34,33	33,50	34,37	34,18
E. faecalis	30,74	30,01	29,79	30,30	30,21	30,65	30,66	31,44	30,24	30,75	30,03	29,16	30,28	29,50	29,74
E. coli	28,25	28,55	28,77	28,52	28,52	29,13	28,69	28,09	28,47	28,60	26,82	28,83	28,19	27,36	27,80



## ANEXO 16. Registro de las zonas de inhibición de la semana 16

### Semana 16 (prueba 7)

01 de abril 2016

M1A															
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
P. aeruginosa	30,12	29,12	30,02	30,04	29,83	29,02	28,84	28,73	29,31	28,98	28,07	28,51	28,52	27,66	28,19
S. aureus	33,43	34,54	32,75	34,73	33,86	36,02	36,71	34,07	36,56	35,84	35,82	34,02	36,12	35,16	35,28
E. faecalis	30,88	30,37	30,70	30,23	30,55	30,12	29,47	28,54	29,29	29,36	29,72	30,20	29,50	29,81	29,81
E. coli	27,90	27,81	27,90	28,54	28,04	29,34	28,30	28,67	28,90	28,80	29,47	29,55	28,62	29,15	29,20

M1T															
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
P. aeruginosa	29,52	29,92	30,35	29,78	29,89	29,15	29,47	29,69	29,74	29,51	29,15	28,95	29,95	29,25	29,33
S. aureus	33,17	34,11	33,39	33,14	33,45	34,58	34,11	33,02	33,28	33,75	37,78	35,37	33,85	34,85	35,46
E. faecalis	29,92	29,49	30,72	31,06	30,30	29,84	29,94	30,56	29,87	30,05	29,68	29,57	29,41	29,02	29,42
E. coli	29,21	28,71	28,82	29,10	28,96	29,94	29,82	29,99	29,82	29,89	29,10	30,05	29,99	29,71	29,71

M2A															
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
P. aeruginosa	28,74	28,73	28,79	28,80	28,77	29,20	28,73	29,34	28,95	29,06	29,80	29,29	29,23	29,23	29,39
S. aureus	34,93	35,01	34,18	33,13	34,31	34,27	33,40	34,58	36,36	34,65	36,83	35,08	35,84	35,92	35,92
E. faecalis	31,11	30,18	30,14	30,08	30,38	29,37	29,72	29,87	29,65	29,65	28,39	29,46	29,21	29,61	29,17
E. coli	29,30	29,17	28,42	29,14	29,01	29,16	28,98	28,56	28,86	28,89	27,94	27,91	28,04	28,11	28,00

M2T															
	DISCO 1				PROM	DISCO 2				PROM	DISCO 3				PROM
P. aeruginosa	29,61	29,05	29,21	29,00	29,22	28,44	29,27	28,70	28,22	28,66	29,61	29,67	30,19	29,39	29,72
S. aureus	37,31	35,25	34,76	36,85	36,04	34,73	35,78	34,26	36,44	35,30	36,24	36,04	35,07	37,58	36,23
E. faecalis	29,28	28,75	29,09	29,03	29,04	28,76	28,74	29,12	28,57	28,80	28,97	28,99	29,17	28,53	28,92
E. coli	29,48	28,78	28,09	28,36	28,68	28,40	28,48	28,58	28,03	28,37	28,55	28,47	28,07	28,79	28,47