

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

PROGRAMA DE ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA



**ANÁLISIS ANTIMICROBIANO Y CITOTÓXICO DE LA MEDICACIÓN
DE HIDRÓXIDO DE CALCIO EN COMBINACIÓN CON DIFERENTES
VEHÍCULOS FRENTE A *ENTEROCOCCUS FAECALIS***

**TRABAJO TERMINAL QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

PRESENTA

C.D. DAYANA STEPHANIE RIVAS MENDEZ

PRESIDENTE

(DIRECTORA DEL PROYECTO)

DRA. DULCE YICEL MAGAÑA MANCILLAS

SINODAL

(CO-DIRECTORA DEL PROYECTO)

DRA. EVA VIVIANA SARMIENTO GUTIÉRREZ

SINODAL

(CO-DIRECTOR DEL PROYECTO)

DR. JULIO CÉSAR GARCÍA BRIONES

SINODAL

(CO-DIRECTOR DEL PROYECTO)

DR. LEONARDO DANIEL ACOSTA TORRES VERY

TIJUANA, BAJA CALIFORNIA; MÉXICO

JUNIO 2024

**ANÁLISIS ANTIMICROBIANO Y CITOTÓXICO DE LA
MEDICACIÓN DE HIDRÓXIDO DE CALCIO EN
COMBINACIÓN CON DIFERENTES VEHÍCULOS FRENTE
A *ENTEROCOCCUS FAECALIS*.**

"2024, año de los pueblos yumaros, pueblos originarios y de las personas
afromexicanas"
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA

Tijuana, Baja California a, 31 de mayo de 2024

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **ANÁLISIS
ANTIMICROBIANO Y CITOTÓXICO DE LA MEDICACIÓN DE HIDRÓXIDO DE
CALCIO EN COMBINACIÓN CON DIFERENTES VEHÍCULOS FRENTE A
ENTEROCOCCUS FAECALIS.**

Propuesto por la **C.D. DAYANA STEPHANIE RIVAS MENDEZ**, fue revisado y ha
sido aprobado para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

ATENTAMENTE
"POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL SER"



DRA. DULCE YICEL MAGAÑA MANCILLAS
PRESIDENTE

"2024, año de los pueblos yumaros, pueblos originarios y de las personas
afromexicanas"

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

Tijuana, Baja California a, 31 de mayo de 2024

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **ANÁLISIS
ANTIMICROBIANO Y CITOTÓXICO DE LA MEDICACIÓN DE HIDRÓXIDO DE
CALCIO EN COMBINACIÓN CON DIFERENTES VEHÍCULOS FRENTE A
ENTEROCOCCUS FAECALIS.**

Propuesto por la **C.D. DAYANA STEPHANIE RIVAS MENDEZ**, fue revisado y ha
sido aprobado para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

**A T E N T A M E N T E
"POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL SER"**


DRA. EVA VIVIANA SARMIENTO GUTIÉRREZ
SINODAL

"2024, año de los pueblos yumaros, pueblos originarios y de las personas
afromexicanas"

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

Tijuana, Baja California a, 31 de mayo de 2024

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **ANÁLISIS
ANTIMICROBIANO Y CITOTÓXICO DE LA MEDICACIÓN DE HIDRÓXIDO DE
CALCIO EN COMBINACIÓN CON DIFERENTES VEHÍCULOS FRENTE A
ENTEROCOCCUS FAECALIS.**

Propuesto por la **C.D. DAYANA STEPHANIE RIVAS MENDEZ**, fue revisado y ha
sido aprobado para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

**ATENTAMENTE
"POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL SER"**


DR. JULIO CÉSAR GARCÍA BRIONES
SINODAL

Ccp.- Archivo.

"2024, año de los pueblos yumaros, pueblos originarios y de las personas
afromexicanas"

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

Tijuana, Baja California a, 31 de mayo de 2024

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **ANÁLISIS
ANTIMICROBIANO Y CITOTÓXICO DE LA MEDICACIÓN DE HIDRÓXIDO DE
CALCIO EN COMBINACIÓN CON DIFERENTES VEHÍCULOS FRENTE A
ENTEROCOCCUS FAECALIS.**

Propuesto por la **C.D. DAYANA STEPHANIE RIVAS MENDEZ**, fue revisado y ha
sido aprobado para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

**A T E N T A M E N T E
"POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL SER"**



DR. LEONARDO DANIEL ACOSTA TORRES VERY
SINODAL

**ANÁLISIS ANTIMICROBIANO Y CITOTÓXICO DE LA MEDICACIÓN
DE HIDRÓXIDO DE CALCIO EN COMBINACIÓN CON DIFERENTES
VEHÍCULOS FRENTE A *ENTEROCOCCUS FAECALIS*.**


PRESENTA



C.D. DAYANA STEPHANIE RIVAS MÉNDEZ

PRESIDENTE

(DIRECTORA DEL PROYECTO)



DRA. DULCE YICEL MAGAÑA MANCILLAS

SINODALES

(CO-DIRECTORES DEL PROYECTO)



DRA. EVA VIVIANA SARMIENTO



DR. JULIO CÉSAR GARCÍA



DR. LEONARDO DANIEL ACOSTA TORRES VERY

Tijuana, Baja California, junio de 2024

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente a la doctora Gabriela Carrillo Vázquez, coordinadora de la especialidad en endodoncia, por darme la oportunidad de formar parte de esta gran experiencia; su incansable trabajo es una guía constante para alcanzar el desarrollo tanto profesional como personal.

A la Dra. Dulce Yicel Magaña Mancillas, Directora de este proyecto, por su apoyo, disposición y su paciencia para orientarme en este proceso.

Quiero agradecer a la Dra Viviana Sarmiento por su invaluable contribución a este proyecto. Su dedicación, experiencia y apoyo constante fueron fundamentales para poder llevar acabo este trabajo.

Agradezco al Dr. Julio César García Briones y al Dr. Leonardo Acosta, mis sinodales, por su orientación en el desarrollo de esta tesis.

El agradecimiento más especial es para mi mamá por su apoyo incondicional para que pudiera realizar mi especialidad en endodoncia. Su constante aliento, comprensión y sacrificio han sido el motor que me ha permitido alcanzar mis metas profesionales.

Agradezco a mi hermano por su constante apoyo y comprensión durante los momentos difíciles de mi especialidad. Por darme ánimos cuando más los necesitaba.

Agradezco a mi familia por su apoyo incondicional, por animarme y motivarme en cada etapa de mi desarrollo académico. A la Dra Laura Ramos por sus constantes consejos, su dedicación y compromiso para ayudarme a ser una mejor profesionista.

A mi novio Mishael Caldera gracias por tu cariño, comprensión, apoyo y motivación cada vez que lo necesitaba. Gracias por estar a mi lado en cada paso y alentarme a dar lo mejor de mí.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis maestros de la especialidad por su dedicación en mi formación académica. En especial, quiero reconocer y agradecer al Dr. Miguel Angel Ramírez por su amistad y por su apoyo incondicional durante todo este tiempo.

Quiero agradecer a mis amigas Andrea Badilla y Mishell Méndez por todo su cariño y apoyo a lo largo de este camino, por todas las bonitas experiencias que vivimos juntas. Sin duda este tiempo no hubiese sido tan especial sin ustedes.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Quiero agradecer a las siguientes instituciones:

A CONACyT por la beca otorgada No. CVU 1226565

A la Universidad Autónoma de Baja California por permitirme formarme académicamente.

Agradezco al Laboratorio Zapata por la cepa clínica de *E. Faecalis*.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	<i>i</i>
AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES	<i>ii</i>
CONTENIDO	<i>iii</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>vi</i>
ÍNDICE DE TABLAS	<i>vii</i>
ÍNDICE DE GRÁFICAS	<i>viii</i>
LISTA DE ABREVIATURAS	<i>ix</i>
I. RESUMEN	<i>1</i>
II. INTRODUCCIÓN	<i>5</i>
2.1. ENDODONCIA	<i>5</i>
2.2. BIOFILM EN ENDODONCIA	<i>5</i>
2.3. BIOFILM INTRARRADICULAR	<i>6</i>
2.3.1. Mecanismo de acción	<i>7</i>
2.3.2. Composición bacteriana	<i>8</i>
2.4. MEDICACIÓN INTRACONDUCTO	<i>8</i>
2.4.1. Características de la medicación intraconducto	<i>10</i>
2.5. HIDRÓXIDO DE CALCIO	<i>11</i>
2.5.1. Mecanismo de actividad antimicrobiana	<i>11</i>
2.5.2. Efectos sobre la endotoxina	<i>13</i>
2.5.3. Hidróxido de calcio en endodoncia	<i>13</i>
2.5.4. Añadido de sustancias al hidróxido de calcio	<i>14</i>
2.6. VEHÍCULOS	<i>17</i>

2.6.1. Hipoclorito de sodio (NaOCl).....	17
2.6.2. Suero o solución fisiológica.....	18
2.6.3. Soluciones anestésicas, mepivacaína (Scandonest 2 % Special)	19
2.6.4. Soluciones de superoxidación (SSO)	20
2.6.4.1. Mecanismo de acción de Microdacyn 60.....	21
2.6.5 Extracto hidroetanólico de <i>Allium sativum</i>	22
2.7. INHIBICIÓN BACTERIANA	23
2.7.1. Método de difusión en agar	23
2.8. EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO A TRAVÉS DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA	23
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
IV. JUSTIFICACIÓN	26
V. HIPÓTESIS.....	27
5.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO	27
5.2 HIPÓTESIS NULA (H0).....	27
5.3 HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H1).....	27
VI. OBJETIVOS.....	28
6.1 OBJETIVO GENERAL	28
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
VII. VARIABLES.....	29
7.1 VARIABLES INDEPENDIENTES.....	29
7.2 VARIABLES DEPENDIENTES	29
7.3 OPERACIÓN DE VARIABLES	30
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	32
8.1. TIPO DE ESTUDIO.....	32
8.2 UNIVERSO DE ESTUDIO.....	32
8.2.1 Método de evaluación de la actividad antibacteriana.....	32
8.2.2. Método de evaluación de citototoxicidad en eritrocitos.....	32

8.3. MATERIALES E INSTRUMENTAL.....	33
8.4. METODOLOGÍA.....	34
8.4.1. Evaluación de la actividad antibacteriana.....	34
8.4.1.1 Preparación del extracto hidroetanólico de allium sativum	34
8.4.1.2. Clasificación de las placas Agar Gelosa Sangre al 5 %	35
8.4.1.3. Inoculación de las placas:	36
8.4.1.4. Preparación de las mezclas de hidróxido de calcio	38
8.4.1.5. Incubación:	39
8.4.1.6. Medición de los halos de inhibición:	39
8.4.2. Evaluación del efecto citotóxico a través de la actividad hemolítica	40
8.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	45
IX. RESULTADOS.....	46
9.1.....	46
9.1.1. Medición de los halos de inhibición a las 24 horas	46
9.1.2. Medición de los halos de inhibición a las 48 horas	48
9.1.3. Medición de los halos de inhibición a las 72 horas	50
9.2. ANÁLISIS DEL EFECTO CITOTÓXICO A TRAVÉS DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA.....	60
X. DISCUSIÓN.....	69
XI. CONCLUSIONES.....	78
XII. RECOMENDACIONES.....	81
XIII. BIBLIOGRAFÍA.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Composición bacteriana mixta..... 6

Figura 2. Medicación con hidróxido de calcio 9

Figura 3. Mecanismo de actividad antibacteriana 12

Figura 4. Hidróxido de calcio 14

Figura 5. Imagen radiográfica de un conducto medicado con hidróxido de calcio 16

Figura 6. Estructura química del hipoclorito de sodio 18

Figura 7. Solución CS Pisa 19

Figura 8. Composición de un cartucho de Mepivacaína (Scandonest 2 % Special) 2% 20

Figura 9. Solución de superoxidación..... 21

Figura 10. Edificio 3H de la Facultad de Oodontología 34

Figura 11. Agitación del Extracto hidroetanólico de Allium Sativum..... 35

Figura 12. Agar gelosa sangre al 5 % 36

Figura 13. Inoculación de las placas de agar sangre 37

Figura 14. Fabricación de los pozos 37

Figura 15. Fabricación y colocación de las mezclas de NaOCl..... 38

Figura 16. Incubación de los medios de cultivo 39

Figura 17. Medición de los halos de inhibición 40

Figura 18. Lavado de eritrocitos humanos 41

Figura 19. Centrifugación de tubos Eppendorf 42

Figura 20. Solución madre de eritrocitos al 4 % 43

Figura 21. Mezclas de Hidróxido de calcio con suspensión de glóbulos rojos 44

Figura 22. Espectrofotómetro lector de absorbancia 45

Figura 23. Halos de inhibición a las 24 horas grupo A y B 46

Figura 24. Halos de inhibición a las 24 horas grupo C y D..... 47

Figura 25. Halos de inhibición a las 24 horas grupo E 47

Figura 26. Halos de inhibición a las 48 horas grupo A y B 48

Figura 27. Halos de inhibición a las 48 horas grupo C y D..... 49

Figura 28. Halos de inhibición a las 48 horas grupo E. 49

Figura 29. Halos de inhibición a las 72 horas grupo A y B 50

Figura 30. Halos de inhibición a las 72 horas grupo C y D..... 51

Figura 31. Halos de inhibición a las 72 horas grupo E. 51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Muestra la operacionalización de variables del método de evaluación de la actividad antibacteriana.....	30
Tabla 2. Media de los halos de inhibición observados (expresada en mm).....	52
Tabla 3. Análisis comparativo de la diferencia estadísticamente significativa y valor de P con respecto a NaOCl 5.25 % a las 24 horas	54
Tabla 4. Análisis comparativo de la diferencia estadísticamente significativa y valor de P con respecto a SS a las 24 horas.....	55
Tabla 5. Análisis comparativo de la diferencia estadísticamente significativa y valor de P con respecto al grupo A a las 24 horas	56
Tabla 6. Análisis comparativo de la diferencia estadísticamente significativa y valor de P con respecto a NaOCl 5.25 % a las 48 horas	56
Tabla 7. Análisis comparativo de la diferencia estadísticamente significativa y valor de P con respecto a SS a las 48 horas.....	57
Tabla 8. Análisis comparativo de la diferencia estadísticamente significativa y valor de P con respecto al grupo A a las 48 horas	57
Tabla 9. Análisis comparativo de la diferencia estadísticamente significativa y valor de P con respecto al grupo A a las 72 horas	58
Tabla 10. Media de los niveles de absorbancia y porcentaje de hemólisis de los distintos grupos y controles (expresada en ABS y %).....	60
Tabla 11. Análisis de la citotoxicidad de las mezclas de hidróxido de calcio en comparación con detergente para células	62
Tabla 12. Análisis de la citotoxicidad de las mezclas de hidróxido de calcio en comparación con SS	64
Tabla 13. Análisis de la citotoxicidad de la mezcla de hidróxido de calcio con hipoclorito de sodio al 5.25 % respecto a las demás mezclas.....	64
Tabla 14. Análisis de la biocompatibilidad de las mezclas de hidróxido de calcio en comparación con detergente para células.....	66
Tabla 15. Análisis de la biocompatibilidad de las mezclas de hidróxido de calcio en comparación con SS	66

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Análisis de la actividad antibacteriana.....	53
Gráfica 2. Halos de inhibición de las mezclas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a las 72 h.	59
Gráfica 3. Porcentaje de hemólisis de los distintos grupos y controles.....	61
Gráfica 4. Porcentaje de hemólisis de las mezclas de hidróxido de calcio en comparación con detergente para células	63
Gráfica 5. Comparación del porcentaje de hemólisis entre el grupo A y los demás grupos	65
Gráfica 6. Porcentaje de biocompatibilidad de las mezclas de hidróxido de calcio en comparación con SS	67
Gráfica 7. Comparación del porcentaje de biocompatibilidad entre el grupo A y los demás grupos.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Por ciento
°C	Grados centígrados
ABS	Absorbancia
ANOVA	Análisis de varianza (por sus siglas en inglés)
Ca	Calcio
Ca(OH)₂	Hidróxido de calcio
<i>E. faecalis</i>	Enterococcus faecalis
<i>et. al</i>	Y otros (del latín)
g	Gramos
g/L	Gramo por litro
h	Horas
H⁺	Hidrógeno
LPS	Lipopolisacárido
ml	Mililitros
mm	Milímetros
NaCl	Cloruro de sodio
NaCl	Sal

LISTA DE ABREVIATURAS

NaOCl	Hipoclorito de sodio
nm	Nanómetros
OH⁻	Radical hidroxilo
pH	Potencial de Hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
SS	Solución fisiológica
μL	Microlitros

I. RESUMEN

Introducción: Para reducir la presencia de bacterias y microorganismos no eliminados completamente con la preparación químico-mecánica, se utilizan medicaciones intraconducto entre sesiones en endodoncia. Las pastas de hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) son las más empleadas debido a su alto pH, que inhibe el desarrollo microbiano. El efecto bactericida del hidróxido de calcio se basa en la liberación de iones hidroxilo (OH^-), que difunden a través de la dentina y destruyen la membrana celular bacteriana. El vehículo utilizado en la pasta de hidróxido de calcio debe permitir una liberación lenta y gradual de iones OH^- , facilitar la difusión tisular, y no afectar negativamente el pH ni la inducción de tejido duro. Evaluar la citotoxicidad de los materiales utilizados en endodoncia es esencial para determinar su biocompatibilidad, siendo la actividad hemolítica un indicador clave para saber si estos materiales pueden dañar las células sanguíneas. **Objetivo:** Evaluación del efecto antimicrobiano y citotóxico *in-vitro* del hidróxido de calcio combinado con vehículos como NaOCl 5.25 %, solución de superoxidación (microdacyn), mepivacaína (Scandonest 2 % Special), solución salina y extracto hidroetanólico de *Allium sativum* (ajo) contra la cepa clínica de *E. faecalis*. **Metodología:** A través del método de Agar Gelosa Sangre al 5 % inoculado con cepas bacterianas de *E. faecalis*, se utilizaron mezclas de hidróxido de calcio ($n=6$) con los distintos vehículos a estudiar (NaOCl al 5.25 %, solución de superoxidación, mepivacaína (Scandonest 2 % Special), SS y extracto hidroetanólico de *Allium sativum*), se evaluaron los halos de inhibición bacteriana de las diferentes asociaciones del hidróxido de calcio a las 24, 48 y 72 horas. Por otra parte, se emplearon eritrocitos humanos con las diversas combinaciones de hidróxido de calcio para evaluar su citotoxicidad. Estos fueron analizados utilizando un espectrofotómetro para determinar el porcentaje de hemólisis presente. Los datos recopilados se sometieron a análisis estadístico mediante ANOVA bidireccional para evaluar la eficacia antimicrobiana y ANOVA de una vía para examinar la citotoxicidad de las distintas mezclas; se utilizó el método de Tukey para comparar las diferencias entre

los grupos estudiados. **Resultados:** A las 48 y 72 horas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar la mezcla A (Ca(OH)_2 + NaOCl al 5.25%) con la mezcla B (Ca(OH)_2 + Microdacyn) y la mezcla del grupo E (Ca(OH)_2 + extracto de ajo) en términos de su efecto antimicrobiano sobre la cepa clínica de *E. faecalis*. Sin embargo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar la mezcla A (Ca(OH)_2 + NaOCl al 5.25%) con las mezclas de los grupos C (Ca(OH)_2 + Mepivacaína) y D (Ca(OH)_2 + solución salina) en cuanto a su efecto microbicida sobre la cepa clínica de *E. faecalis*. En cuanto al análisis del efecto citotóxico la mezcla D (Ca(OH)_2 + Mepivacaína) mostró el menor efecto citotóxico con un 37% de hemólisis. La mezcla con extracto de ajo presentó un porcentaje de hemólisis del 41.5%, mientras que la mezcla con Microdacyn mostró un porcentaje de hemólisis del 39.1%, ambos resultados inferiores al de la mezcla con hipoclorito de sodio, que tuvo un 63.6%. **Conclusión:** Todas las mezclas evaluadas demostraron actividad microbicida contra la cepa clínica de *Enterococcus faecalis*. En particular, las mezclas de hidróxido de calcio con Microdacyn y extracto de ajo mostraron una actividad antimicrobiana comparable a la mezcla con hipoclorito de sodio. Sin embargo, ambas mezclas presentaron un menor efecto citotóxico en comparación con la mezcla con hipoclorito de sodio, lo que las convierte en alternativas más seguras para su uso en endodoncia.

Palabras clave: Medicación intraconducto, hidróxido de calcio, actividad antibacteriana, efecto citotóxico.

ABSTRACT

Introduction: To reduce the presence of bacteria and microorganisms not completely eliminated with chemical-mechanical preparation, intracanal medications are used between sessions in endodontics. Calcium hydroxide pastes ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) are the most commonly used due to their high pH, which inhibits microbial growth. The bactericidal effect of calcium hydroxide is based on the release of hydroxyl ions (OH^-), which diffuse through dentin and destroy bacterial cell membranes. The vehicle used in the calcium hydroxide paste must allow a slow and gradual release of OH^- ions, facilitate tissue diffusion, and not negatively affect the pH or the induction of hard tissue. Evaluating the cytotoxicity of materials used in endodontics is essential to determine their biocompatibility, with hemolytic activity being a key indicator to know if these materials can damage blood cells. **Objective:** Evaluation of the in-vitro antimicrobial and cytotoxic effect of calcium hydroxide combined with vehicles such as NaOCl 5.25%, superoxidation solution (Microdacyn), mepivacaine (Scandonest 2% Special), saline solution, and hydroethanolic extract of *Allium sativum* (garlic) against the clinical strain of *E. faecalis*. **Methodology:** Using the method of 5% blood agar gel inoculated with *E. faecalis* bacterial strains, mixtures of calcium hydroxide ($n=6$) with the various vehicles under study (NaOCl 5.25%, superoxidation solution, mepivacaine (Scandonest 2% Special), saline solution, and hydroethanolic extract of *Allium sativum*) were evaluated for bacterial inhibition zones at 24, 48, and 72 hours. Human erythrocytes were used with the various combinations of calcium hydroxide to evaluate their cytotoxicity. These were analyzed using a spectrophotometer to determine the percentage of hemolysis present. The collected data were subjected to statistical analysis using two-way ANOVA to evaluate antimicrobial efficacy and one-way ANOVA to examine the cytotoxicity of the different mixtures; Tukey's comparative method was used to compare differences between the studied groups. **Results:** At 48 and 72 hours, no statistically significant differences were found when comparing mixture A ($\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{NaOCl}$ 5.25%) with mixture B ($\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{Microdacyn}$) and the mixture from group E ($\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{garlic}$

extract) in terms of their antimicrobial effect on the clinical strain of *E. faecalis*. However, statistically significant differences were found when comparing mixture A (Ca(OH)_2 + NaOCl 5.25%) with the mixtures from groups C (Ca(OH)_2 + mepivacaine) and D (Ca(OH)_2 + saline solution) in terms of their microbicidal effect on the clinical strain of *E. faecalis*. Regarding the cytotoxicity analysis, mixture D (Ca(OH)_2 + saline solution) showed the lowest cytotoxic effect with 37% hemolysis. The mixture with garlic extract showed a hemolysis percentage of 41.5%, while the mixture with Microdacyn showed a hemolysis percentage of 39.1%, both results being lower than that of the mixture with sodium hypochlorite, which had 63.6%.

Conclusion: All the evaluated mixtures demonstrated microbicidal activity against the clinical strain of *Enterococcus faecalis*. Notably, the mixtures of calcium hydroxide with Microdacyn and garlic extract showed antimicrobial activity comparable to the mixture with sodium hypochlorite. However, both mixtures exhibited a lower cytotoxic effect compared to the mixture with sodium hypochlorite, making them safer alternatives for use in endodontics.

Keywords: Intracanal medication, calcium hydroxide, antibacterial activity, cytotoxic effect.

II. INTRODUCCIÓN

2.1. ENDODONCIA

La Endodoncia es una especialidad de la Odontología, reconocida por la Asociación Dental Americana desde 1963, la cual se encarga del estudio de la morfología, la fisiología y la patología de la pulpa dental, así como la prevención y eliminación de las alteraciones pulpares y sus repercusiones sobre los tejidos perirradiculares (1,2).

El ámbito clínico de la endodoncia es muy amplio incluye el diagnóstico y el tratamiento del dolor de origen pulpar y/o periapical; los tratamientos para mantener la vitalidad de la pulpa; los tratamientos de conductos radiculares en casos de pulpitis irreversible o necrosis pulpar; el retratamiento no quirúrgico de dientes previamente tratados que por múltiples factores pudiesen fracasar, los tratamientos quirúrgicos para eliminar los tejidos periapicales inflamados y el tratamiento de la afectación pulpar por traumatismos (1,3).

El éxito de la terapia Endodóntica se ha basado en la conocida Triada Endodóntica, la cual está compuesta por tres principios básicos: asepsia, preparación biomecánica y sellado apical. Es por ello que el tratamiento de conducto radicular consiste en la eliminación total de la pulpa infectada, inflamada o necrótica y de todo el tejido remanente, una limpieza profusa, así como la configuración y obturación del sistema del conducto radicular, de manera que se pueda conservar el diente como una unidad funcional dentro de la cavidad oral (4,5).

2.2. BIOFILM EN ENDODONCIA

La eliminación de los microorganismos de los conductos radiculares infectados ha sido y es una constante preocupación en endodoncia. El término biopelícula se introdujo para designar las condensaciones en capas delgadas de microbios (por ejemplo, bacterias, hongos, protozoos) que pueden ocurrir en varias estructuras

superficiales en la naturaleza. Las bacterias flotantes que existen en un ambiente acuoso, los llamados microorganismos planctónicos, son un requisito previo para la formación de biopelículas. Tales películas pueden así establecerse sobre cualquier sustrato superficial orgánico o inorgánico donde predominen los microorganismos planctónicos en una solución a base de agua (6,7).

2.3. BIOFILM INTRARRADICULAR

El Biofilm podemos definirlo como una comunidad de microorganismos de una o varias especies integradas en una matriz extracelular de polisacáridos unidos a una superficie sólida. Los conductos radiculares con necrosis pulpar, son considerados como un ambiente ideal para la formación y proliferación del biofilm, esto ocurre debido a la presencia de superficies sólidas, un ambiente húmedo, medio fluido ideal para la proporción de nutrientes, y microorganismos procedentes de la cavidad bucal, en la Figura 1 se observa el biofilm presente en la pared del conducto radicular (7,8).



Figura 1. Composición bacteriana mixta. *En la Figura 1 se observa la población bacteriana que coloniza la pared de un conducto radicular (x2.200)(1).*

Es importante mencionar que el remanente infeccioso puede permanecer en las áreas apicales inaccesibles o complejidades anatómicas del conducto radicular, como lo pueden ser los túbulos dentinarios, conductos laterales, accesorios, istmos y deltas apicales, los cuales pueden no ser completamente desinfectados durante la preparación química y mecánica. Las bacterias ubicadas en estas áreas están protegidas de los efectos de las células y moléculas de defensa del huésped, los antibióticos administrados sistémicamente y de la acción de los instrumentos e irrigantes (4).

Existe una diferencia significativa en cuanto a la capacidad de defensa del biofilm intraradicular y las bacterias en suspensión las cuales se encuentran repartidas a lo largo del sistema de conductos radiculares. En este caso el biofilm presenta una mayor capacidad debido a la poca interacción que tiene con el medio donde vive, así como la poca dependencia hacia él, además de que su tasa de mitosis es mucho menor. Las bacterias asociadas al biofilm no fomentan infecciones agudas, sino crónicas, esto se asocia al tipo de metabolismo que presenta y sus características propias (6,7).

2.3.1. Mecanismo de acción

El biofilm bacteriano se caracteriza principalmente por su gran capacidad de resistencia. En el sistema de conductos radiculares, dicha característica es mucho más significativa, esto debido a que existen factores tales como la anatomía, la cual muchas veces presenta zonas de difícil acceso en las cuales resulta complicado que lleguen las soluciones irrigantes y desinfecte por completo los conductos radiculares. La matriz de polisacáridos presenta una barrera física y química, evitando así la penetración de agentes externos indeseables, cambios en el potencial de hidrógeno (pH), manteniendo un ambiente interior adecuado para la supervivencia y es considerado actualmente uno de los mecanismos más importantes. Las enzimas que genera el biofilm, favorecen la adhesión a otros sustratos o a otras bacterias, incluso logran inactivar la acción de los irrigantes utilizados durante el tratamiento de conductos. El biofilm utiliza una acción similar a

la distracción como otro mecanismo de acción, en la cual las bacterias sobrantes se van desprendiendo, distraendo a los mecanismos de defensa del huésped, esto genera un proceso crónico, el cual provoca en el paciente procesos infecciosos, con signos y síntomas, los cuales desaparecen o disminuyen tras la administración de antibióticos, pero sin eliminar el origen del foco de infección (7).

2.3.2. Composición bacteriana

Los tipos bacterianos observados en el Biofilm de origen endodóntico son, principalmente, cocos, bacilos y filamentos, y ocasionalmente se han detectado espiroquetas. Las especies del género *Prevotella* son muy frecuentes debido a su capacidad de autoagregación y coagregación. En el Biofilm de los conductos radiculares, podemos encontrar microorganismos principalmente gram positivos, destacando el *Enterococcus Faecalis* (*E. faecalis*), el cual puede prevalecer hasta en un 97.5 % en relación con los demás microorganismos presentes en los conductos radiculares. Este microorganismo es un coccus anaerobio, grampositivo y facultativo que causa infecciones oportunistas. Posee muchos mecanismos de supervivencia para vivir en condiciones desfavorables, como cultivar un ambiente con bajo nivel de oxígeno, un pH alto a un amplio rango de temperaturas y a una alta salinidad o en un ambiente con pocos nutrientes, *E. faecalis* puede usar líquido en el ligamento periodontal como alimento y formar biopelículas como protección contra la resistencia del huésped y los agentes desinfectantes (7–9).

2.4. MEDICACIÓN INTRACONDUCTO

Con el propósito de reducir la cantidad de bacterias y microorganismos que pueden no ser completamente erradicados mediante la preparación químico-mecánica, se recurre al uso de medicamentos intraconducto entre sesiones. Esta práctica implica la aplicación tópica de medicamentos dentro del sistema de conductos radiculares con el fin de lograr efectos terapéuticos locales y no a nivel sistémico. Estos medicamentos pueden ser de diferentes tipos, tales como antisépticos, corticosteroides, antibióticos y pastas de hidróxido de calcio para tratar el dolor e

inflamación, estas pastas también ayudan a reducir la hemorragia y estimulan la sanación de los tejidos periapicales. Las pastas de hidróxido de calcio constituyen la medicación tópica más empleada en endodoncia, ejemplo del cual podemos observar en la Figura 2 (10–12).

Se han enumerado algunas ventajas de la medicación intraconducto en el tratamiento de dientes con necrosis pulpar:

1. Eliminar las bacterias y microorganismos persistentes en el conducto radicular
2. Neutralizar los residuos tóxicos y antigénicos remanentes
3. Prevenir la proliferación bacteriana entre sesiones
4. Reducir la inflamación de los tejidos periapicales
5. Disminuir el exudados persistente en la zona apical
6. Formar una barrera mecánica ante la posible filtración de la obturación temporal entre una cita y otra

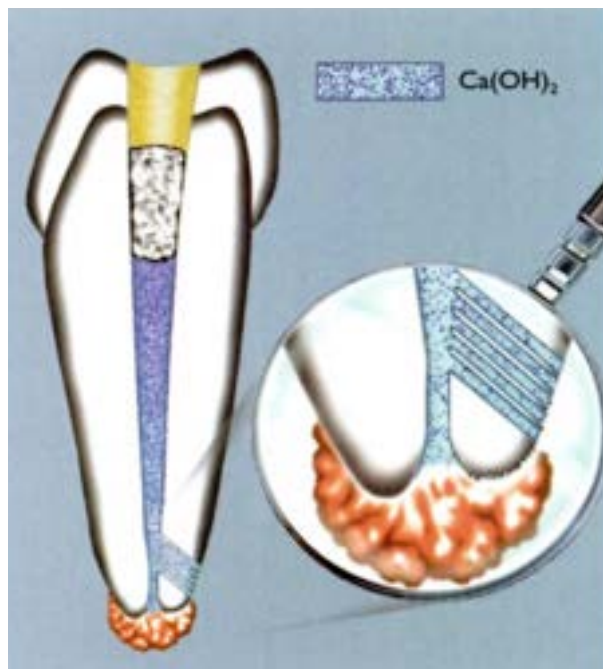


Figura 2. Medicación con hidróxido de calcio. En la Figura 2 se observa un conducto radicular lleno de hidróxido de calcio, en donde hay una difusión a través de los túbulos dentinarios (1).

Para que las medicaciones intraconducto sean efectivas, es crucial que se distribuyan de manera uniforme por todas las áreas anatómicas del sistema de conductos, incluyendo los túbulos dentinarios.

Se recomienda la medicación entre sesiones en el tratamiento de conductos cuando estos presentan una anatomía compleja, en la cual ciertas áreas no son accesibles a la instrumentación, sobre todo, cuando son dientes con necrosis pulpar y lesiones periapicales crónicas en los cuales el sistema de conductos radiculares está contaminado, logrando así una mejor desinfección (13,14).

2.4.1. Características de la medicación intraconducto

Un medicamento intraconducto ideal debe cumplir los siguientes requisitos:

1. Destruir todos los microorganismos del conducto radicular
2. Tener efecto antimicrobiano duradero
3. No ser afectado por el material orgánico
4. Ayudar a la remoción de tejido orgánico
5. Penetrar en el sistema de conductos radiculares y los túbulos dentinarios
6. No irritar los tejidos perirradiculares ni tener toxicidad sistémica
7. Tener propiedades inocuas
8. Inducir una barrera de calcificación en la unión con los tejidos perirradiculares
9. No tener efecto en las propiedades físicas del material de obturación temporal
10. No difundirse a través del material de obturación temporal
11. Fácil colocación y remoción

12. Ser radiopaco

13. No manchar el diente

2.5. HIDRÓXIDO DE CALCIO

El hidróxido de calcio con la fórmula Ca(OH)_2 y un peso molecular de 74.08, fue introducido en la terapia endodóntica desde 1920 cuando Hermann describió su utilización en el tratamiento de los dientes no vitales. Se presenta como un polvo blanco, que se obtiene haciendo reaccionar, con agua, óxido de calcio recién preparado; absorbe dióxido de carbono del aire transformándose en carbonato de calcio. Tiene baja solubilidad en agua (aproximadamente 1.2 g/L-1 a 25 °C), que disminuye a medida que aumenta la temperatura. La baja solubilidad es una buena característica clínica porque es necesario un largo período para que el Ca(OH)_2 se vuelva soluble en los fluidos tisulares cuando está en contacto directo con tejidos vitales (12,14,15).

El coeficiente de disociación de Ca(OH)_2 permite una lenta, liberación controlada de los iones de calcio e hidroxilo (15).

2.5.1. Mecanismo de actividad antimicrobiana

Según Siqueira *et. al.*, la actividad antimicrobiana del Ca(OH)_2 depende de la liberación de iones hidroxilo (OH^-) en un ambiente acuoso. Además, Siqueira y Lopes afirmaron que los iones hidroxilo son radicales libres altamente oxidantes que presentan una reactividad extrema con distintas biomoléculas. Esta reactividad es indiscriminada; debido a esta característica, este radical libre rara vez se difunde lejos de los sitios de generación. Los efectos letales de los iones hidroxilo en las células bacterianas probablemente se deban al daño que ejercen en la membrana citoplasmática bacteriana, a la desnaturalización de proteínas. Una vez que ocurre la exposición a una base fuerte, inician los tres mecanismos, a pesar de ello, es difícil establecer, en un sentido cronológico, cuál sería el principal mecanismo

causante de la muerte bacteriana, en la Figura 3 podemos observar una vista esquemática dichos mecanismos de actividad antimicrobiana (15,16).

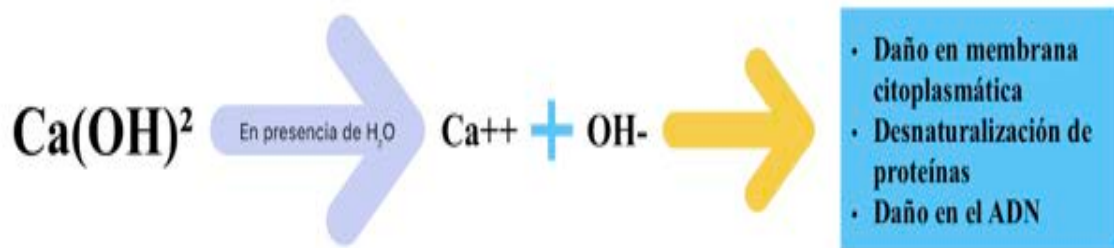


Figura 3. Mecanismo de actividad antibacteriana. En la Figura 3 observamos una vista esquemática de los mecanismos de la actividad antibacteriana del hidróxido de calcio, causantes de la muerte bacteriana (16).

Los sitios enzimáticos, los cuales los podremos encontrar en la membrana citoplasmática, serán el sitio en donde los iones hidroxilo del Ca(OH)_2 ejerzan su mecanismo de acción. Las enzimas extracelulares tienen la capacidad de descomponer nutrientes como carbohidratos, proteínas y lípidos mediante la hidrólisis, facilitando así el proceso de digestión. Las enzimas intracelulares ubicadas en la célula favorecen la actividad respiratoria de la estructura de la pared celular (15,16).

El gradiente de potencial de hidrógeno (pH) de la membrana citoplasmática se ve alterado por la alta concentración de iones hidroxilo que actúan sobre las proteínas de la membrana, a eso se le conoce como desnaturalización de las proteínas. El alto pH del Ca(OH)_2 será el encargado de alterar la integridad de la membrana citoplasma a través de un daño o una lesión química a los componentes orgánicos y el transporte de nutrientes o a través de la destrucción de fosfolípidos o ácidos grasos insaturados de la membrana citoplasma durante el proceso de peroxidación, la cual es una reacción de saponificación (15,16).

El ajuste del pH intracelular está influenciado por diferentes procesos celulares, tales como el metabolismo celular, las alteraciones en la forma, la movilidad, el ajuste de los transportadores y la polimerización de los componentes del citoesqueleto, la activación de la proliferación y el crecimiento celular, la

conductividad y el transporte a través de la membrana, y el volumen celular isosmótico. Por lo tanto, muchas funciones celulares pueden verse afectadas por el pH, incluido las enzimas que son esenciales para el metabolismo celular. Estrela *et al.*, encontraron que la inactivación de una enzima bacteriana en condiciones extremas de pH durante un largo período de tiempo es irreversible. El hidróxido de calcio ejerce efectos antibacterianos en el sistema de conductos radiculares siempre y cuando se mantenga un pH alto (16).

2.5.2. Efectos sobre la endotoxina

La endotoxina, podemos encontrarla en la capa exterior de la membrana celular de las bacterias gramnegativas, se compone de polisacáridos, lípidos y proteínas. A esta también se le conoce como lipopolisacárido (LPS), esta endotoxina será la responsable de sus efectos tóxicos. Cuando son libres de actuar, las endotoxinas no causan directamente un daño celular o tisular, sino que estimulan a las células competentes a liberar mediadores químicos, en este caso serán los macrófagos su principal objetivo. Por lo tanto, las endotoxinas no son intrínsecamente tóxicas. Durante el tratamiento del conducto radicular, el LPS se libera durante la multiplicación o la muerte bacteriana, causando así una serie de efectos biológicos, esto conlleva a una reacción inflamatoria y a la resorción ósea periapical (16).

Estudios *in vitro* han demostrado que el Ca(OH)_2 hidrolizó la molécula lipídica altamente tóxica que es responsable de los efectos dañinos de la endotoxina (16).

2.5.3. Hidróxido de calcio en endodoncia

El hidróxido de calcio desempeña un papel fundamental en endodoncia debido a varias razones: induce la formación de tejido duro, contribuye a la oclusión intratubular, muestra propiedades antibacterianas y tiene la capacidad de disolver tejido. Además, su capacidad para controlar la inflamación y su actividad antimicrobiana lo convierten en una opción ideal para su uso como medicación tópica entre citas o como parte de materiales de obturación temporales y definitivos. La acción antiséptica del hidróxido de calcio se debe principalmente a su alto pH, el

cual hace incompatible el desarrollo microbiano ante su contacto. El efecto bactericida del hidróxido de calcio se debe fundamentalmente a la concentración de iones OH^- resultado de la disolución de producto en iones calcio e hidróxilo, y su efecto a distancia depende de la difusión de dichos iones a través de la dentina. Existen diferentes marcas comerciales de su presentación en polvo la cual es la utilizada principalmente, en la Figura 4 podemos observar la marca Viarden Lab (14,15,17–19).



Figura 4. Hidróxido de calcio. En la Figura 4 tenemos la presentación comercial del hidróxido de calcio, el cual es utilizado como curativo de demora para el conducto radicular (36). Imagen tomada de internet:

<https://viardenlab.com/mx/producto/hidroxido-de-calcio>

2.5.4. Añadido de sustancias al hidróxido de calcio

La adición de compuestos al hidróxido de calcio cumple varios propósitos, como facilitar su aplicación clínica, conservar sus características biológicas (pH alto, disociación iónica), mejorar su fluidez, aumentar su visibilidad en radiografías, entre otros. Varios estudios han indicado que el tipo de vehículo utilizado está directamente relacionado tanto con la concentración y la velocidad de disociación iónica como con la actividad antimicrobiana cuando la pasta se aplica en un área

contaminada. Debido a que es difícil aplicar por sí solo el polvo seco de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, este puede ser mezclado con un vehículo, facilitando la manipulación y la correcta colocación (17–21).

Se considera que el vehículo ideal debe:

1. Permitir una disociación lenta y gradual de los iones calcio e hidroxilo.
2. Permitir una liberación lenta en los tejidos, con una solubilidad baja en sus fluidos.
3. No tener un efecto adverso en su acción de favorecer la aposición de tejidos calcificados.

De acuerdo con Fava *et al.*, un vehículo ideal, es aquel que logra permitir una lenta y gradual liberación de iones OH^- , una lenta difusión y solubilidad tisular, es importante mencionar que el vehículo no debe tener un efecto adverso en la inducción de aposición de tejido duro. Cuando el hidróxido de calcio se mezcla con estas sustancias se obtiene la liberación de iones calcio (Ca^{++}) y OH^- . Los vehículos promueven un alto grado de solubilidad cuando la pasta se deja en contacto directo con el tejido y el fluido tisular, causando rápidamente solubilización y absorción por los macrófagos, lo cual obliga a varios recambios hasta obtener el efecto deseado, incrementando el número de citas. La propagación del medicamento a las irregularidades del conducto y en los túbulos dentinales depende de su tensión superficial, en donde una baja tensión superficial aumenta la penetración del líquido en áreas inaccesibles. Debido a esto él demuestra cómo la adición de polvo de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a los vehículos tiende a aumentar la tensión superficial. En la Figura 5 podemos observar la medicación intraconducto de un conducto radicular (22-24).

El efecto antibacteriano es directamente proporcional al pH de la pasta; esto se debe a que al presentarse un aumento en el pH se otorga una propiedad bactericida, inhibiendo al mismo tiempo la actividad osteoclástica. El vehículo seleccionado no debe afectar o alterar el pH del hidróxido de calcio, ya que de lo contrario se alteran

las propiedades terapéuticas del mismo. Cuanto más alto sea el pH durante un período más largo, mayor será la inactivación bacteriana (22,23)

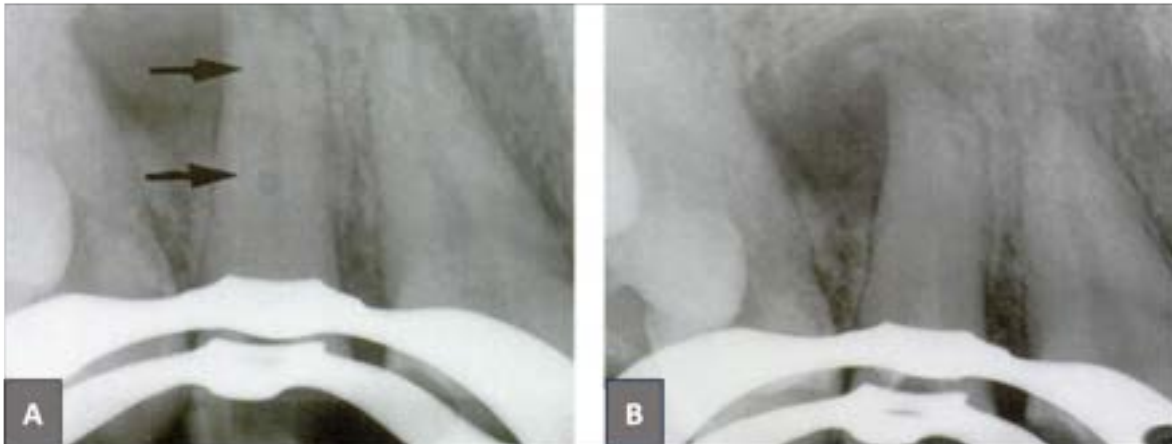


Figura 5. Imagen radiográfica de un conducto medicado con hidróxido de calcio.

Figura 5. en la imagen 5A se observa la presencia de espacios debido a una mala colocación de la medicación. 5B. El mismo conducto después de la complementación del llenado (1)

El hidróxido de calcio se emplea combinado con tres categorías principales de vehículos:

- **Acuosos:** Constituidos por sustancias solubles en agua. Principalmente, el agua se utiliza como vehículo acuoso, aunque también se han empleado solución salina, solución de metilcelulosa, anestésicos y otras soluciones acuosas. Esta preparación permite una liberación rápida de iones, facilitando su solubilización en los tejidos y su posterior reabsorción por los macrófagos. Luego de la disociación iónica, los iones OH^- se inactivan rápidamente al unirse a átomos de hidrógeno del vehículo utilizado, los cuales mantendrán una ligera carga positiva, pudiendo formar enlaces dipolo-dipolo con los iones OH^- que mantienen carga una negativa. Por otra parte, los iones OH^- reaccionan con los sistemas buffer de la dentina, reduciendo el tiempo de efectividad del hidróxido de calcio (15,16,23,24).

- **Viscosos:** Han sido utilizadas la glicerina, polietilenglicol y propilenglicol. Estos vehículos tienen un alto peso molecular, y son utilizados con el objetivo de disminuir

la solubilidad de la pasta, prolongar la liberación iónica, de tal manera que la inactivación de los iones Ca^{++} y OH^- ocurre más lentamente, al reducirles su capacidad de difusión. Estas sustancias presentan en sus estructuras químicas grupos OH^- con ligera carga negativa, los cuales pueden reaccionar con el ión Ca^{++} a través de enlaces ión-dipolo, así como átomos de hidrógeno que pueden reaccionar con los iones OH^- del hidróxido de calcio (15).

- **Oleosos:** son sustancias no solubles en agua con baja solubilidad y capacidad de difusión en los tejidos. Se ha empleado el uso de aceite de oliva, de silicona y diversos ácidos grasos, para formar una mezcla que permita estar en el interior de los conductos radiculares durante períodos prolongados de tiempo sin necesidad de renovar la medicación. A pesar de ello químicamente es imposible medir el pH de un aceite, puesto que no permiten la disociación de iones H^+ y OH^- , por lo anterior no se recomienda el uso del $\text{Ca}(\text{OH})_2$ con los aceites (15).

2.6. VEHÍCULOS

2.6.1. Hipoclorito de sodio (NaOCl)

Este se encuentra dentro de los principales vehículos acuosos empleados en la práctica diaria, según la Asociación Americana de Endodoncistas, se define como un líquido claro, pálido, verde amarillento, extremadamente alcalino, con fuerte olor clorino, que presenta una acción disolvente sobre el tejido necrótico y restos orgánicos; además es un potente agente antimicrobiano. La acción bactericida y de disolución de los tejidos del hipoclorito de sodio puede ser modificada por la concentración de este, la temperatura y el pH de la solución (25).

Su uso en clínica es generalizado, desde concentraciones más bajas a 0.5 % hasta otras más altas de 5.25 %. "A mayor concentración, mejores son las propiedades solventes y antibacterianas, pero también se incrementa su efecto tóxico". El pH del hipoclorito es aproximadamente de 11.6, siendo una solución alcalina (25). En la Figura 6 se observa la estructura química del hipoclorito de sodio compuesta por un catión de sodio (Na^+) y un anión de hipoclorito (OCl^- o ClO^-).

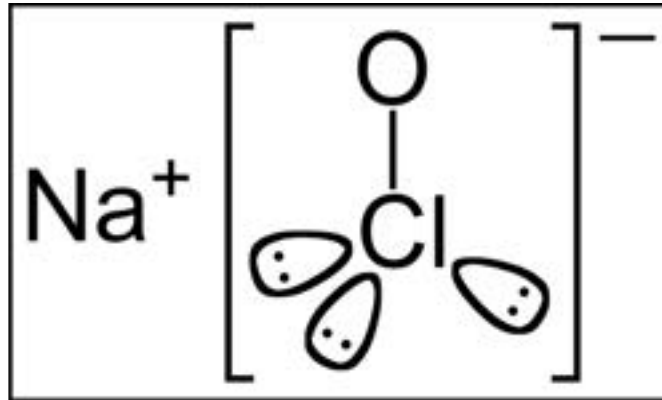


Figura 6. Estructura química del hipoclorito de sodio. En la figura 6 observamos la estructura química del hipoclorito de sodio con la fórmula NaOCl , que es un catión de sodio (Na^+) y un anión de hipoclorito (OCl^- o ClO^-) (37). Imagen tomada de internet: <https://www.laboratoriumdiscounter.nl/es/quimicos/a-z/n/hipoclorito-de-sodio/>

2.6.2. Suero o solución fisiológica

Es considerado como el irrigante más biocompatible que existe, no es cáustico en los tejidos periapicales, reduce la irritación e inflamación de los tejidos periapicales causada por la extrusión del hipoclorito de sodio. La solución salina es un irrigante débil, por lo que es utilizado como un irrigante auxiliar, el cual se utiliza alternándolo con otras soluciones y como solución irrigadora final cuando se desea eliminar los residuos de la solución anterior. En la Figura 7 podemos observar su presentación comercial (20)



Figura 7. Solución CS Pisa. *Presentación comercial de la solución salina de CS PISA, compuesta por cloruro de sodio al 0.9 % (38). Disponible en:* <https://www.pisa.com.mx/product/solucion-cs-pisa-frasco-50-ml-minioval-con-adaptador/>

2.6.3. Soluciones anestésicas, mepivacaína (Scandonest 2 % Special)

Otro vehículo que se ha utilizado en la medicación intraconducto, ya que es una solución fácilmente disponible, son las soluciones anestésicas. Estas sustancias químicas tienen la capacidad de bloquear de manera específica y reversible la conducción de los impulsos nerviosos. Son utilizadas con o sin vasoconstrictor, estériles y fáciles de manejar. Es interesante notar que la mayoría de estas soluciones tienen un pH ácido, pero cuando se mezclan con el polvo de hidróxido de calcio, la pasta final tiene un pH alto de 12.5 que se mantiene con el tiempo. Además, promueven una liberación iónica rápida (17). Un cartucho de Scandonest 2 % estará compuesto por adrenalina y clorhidrato de mepivacaína como podemos observar en la Figura 8.

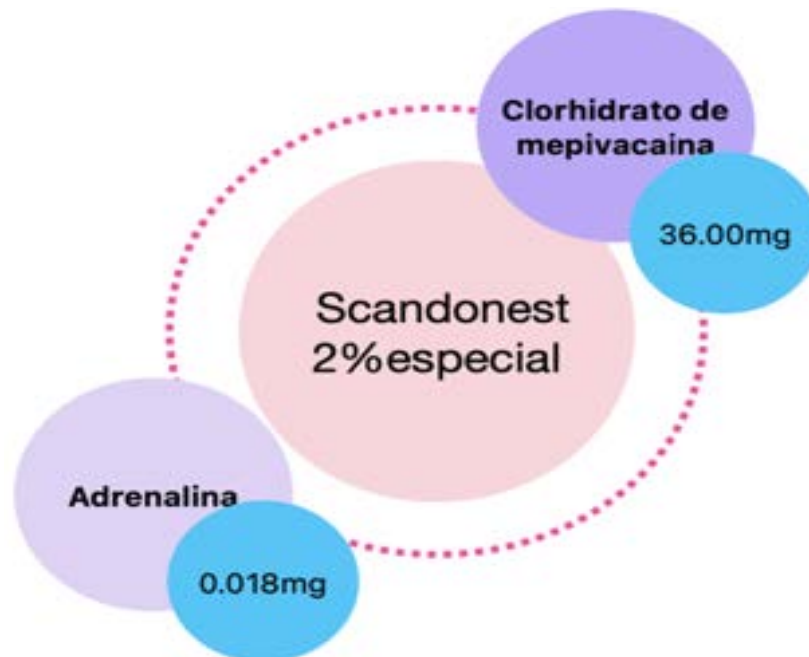


Figura 8. Composición de un cartucho de Mepivacaína (Scandonest 2 % Special) .
Composición cualitativa y cuantitativa de Scandonest 2% especial, la cual se compone de adrenalina y clorhidrato de mepivacaína (Scandonest 2 % Special) .

2.6.4. Soluciones de superoxidación (SSO)

Son soluciones con efecto desinfectante, esterilizante y antiséptico, tienen un pH neutro (6,4- 7,5), véase su presentación comercial en la

Figura 9. Estas soluciones son creadas mediante un proceso que utiliza agua común y sal (NaCl), que se someten a una cámara con electrodos donde se aplica corriente eléctrica. Este proceso da lugar a la generación de varios elementos, principalmente derivados de cloro, hidrógeno y oxígeno. Por lo tanto, se compone principalmente de ácido hipocloroso, cloro e hipoclorito sódico. Su espectro microbicida es amplio y efectivo contra una gran variedad de bacterias, hongos y virus (26,27).



Figura 9. Solución de superoxidación. *Presentación comercial de Microdacyn 60, la cual es una solución de superoxidación utilizada por sus propiedades antisépticas (39). Imagen tomada de internet: <https://microdacyn.com.mx/>*

2.6.4.1. Mecanismo de acción de Microdacyn 60

Efecto antimicrobiano: Microcyn 60 actúa al contacto con los microorganismos. Las especies reactivas de cloro y oxígeno en Microcyn 60 se encargarán de desnaturalizar las proteínas de la pared bacteriana y de las cápsidas virales. Provocando una alteración de las funciones básicas de los microorganismos; los cuales sufren un choque osmótico que termina por destruirlos. El tiempo en el que se logre la destrucción de los microorganismos, dependerá de la composición particular de cada uno, la presencia de materia orgánica contaminante como puede ser la sangre presente, suero, entre otros, la accesibilidad del Microcyn 60 al tejido, del volumen usado y del tiempo de exposición. En superficies inanimadas, por ejemplo, se logra la acción bactericida en un minuto y la desinfección de alto nivel en 15 minutos (26,27).

2.6.5 Extracto hidroetanólico de *Allium sativum*

Es una planta conocida comúnmente como ajo; el término *Allium* procede de la palabra All, que significa “ardiente o caliente” y “*sativum*” procede del latín que significa “cultivado”. El ajo esta compuesto por agua, carbohidratos como la fructosa, compuestos azufrados (alixina, alicina, aliina, ajo en, adenosina, alil metano tiosulfinato, dialil disulfuro, dialil trisulfuro, alil metil trisulfinato, S-alil mercaptocisteína, 2-vinil-4H-1,2-ditiina y 5-alilcisteína), fibra y aminoácidos libres. Contiene altos niveles de vitamina C y A. Está compuesto también por minerales (potasio, fósforo, magnesio, sodio, hierro y calcio). Por último posee un alto contenido de compuestos fenólicos, polifenoles y fitoesteroles (28–30).

Allium sativum es una de las plantas en uso más estudiadas desde la antigüedad debido a sus propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales y antioxidantes. El extracto exhibe una amplia gama de efectos inhibidores sobre el crecimiento de varias bacterias tanto bacterias gram-negativas como gram-positivas. debido a la presencia de tiosulfatos que incluyen sulfuro de dialilo, disulfuro de dialilo y sulfuro de metilo de alilo, que alteran la membrana celular de las bacterias y bloquean sus vías enzimáticas (28,30–32).

La alicina, un biocida, puede afectar el metabolismo esencial de la cisteína proteinasa dependiendo de la dosis utilizada. Esta influencia puede conducir a la destrucción de células eucariotas, ya que las células vivas contienen grupos tiol. Es por ello, que el efecto antimicrobiano es atribuido a la reacción química que presenta la alicina con los grupos tiol de las diferentes enzimas (28–31).

2.7. INHIBICIÓN BACTERIANA

2.7.1. Método de difusión en agar

El método de difusión en agar es el método de elección para determinar la eficacia antibacteriana o también conocido como la susceptibilidad a los antimicrobianos, en donde las zonas de inhibición se miden para determinar si un medicamento probado es o no tóxico para las bacterias que fueron sometidas en dicha prueba. Además, ofrece la posibilidad de probar simultáneamente varios aislados, poder detectar cultivos mixtos o poblaciones heterogéneas y flexibilidad en la selección de antibióticos y el rango de concentración a analizar (33,34).

El antibiograma define la actividad *in vitro* de un medicamento frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana (34).

Dentro de las ventajas que presenta la técnica de difusión en agar tenemos:

1. Es fácil de efectuar y de gran reproducibilidad
2. Bajo precio
3. No requiere equipo especial
4. Sus resultados son fácilmente interpretados por los clínicos
5. Es muy flexible a la hora de escoger los antibióticos a probar

2.8. EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO A TRAVÉS DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

La actividad hemolítica se puede definir como la capacidad de ciertas sustancias para dañar las células sanguíneas, principalmente los glóbulos rojos, provocando su ruptura o lisis. Este proceso, conocido como hemólisis, implica la destrucción o

pérdida estructural de los glóbulos rojos y la liberación de su contenido intracelular, lo que puede causar disfunción orgánica y otros problemas de salud (35,36).

Para determinar si un tratamiento es citotóxico, debemos identificar el tipo de muerte celular que provoca, lo que puede proporcionar una estimación de su biocompatibilidad. Cuando una célula es expuesta a agentes citotóxicos pueden desencadenar su necrosis o apoptosis. La necrosis celular, se caracteriza por la hinchazón seguida de una rápida lisis. Por otro lado, la apoptosis implica que los componentes internos de la célula colapsen hacia adentro, formando pequeños cuerpos vesiculares.(36–38).

En el caso particular de la endodoncia, evaluar el efecto citotóxico a través de la actividad hemolítica se enfoca, en identificar si los materiales utilizados durante el tratamiento de conductos pudieran causar cierto daño en las células sanguíneas. Esto es particularmente relevante para los materiales empleados en la obturación e irrigación del tratamiento.

Este estudio tiene como objetivo evaluar el efecto antimicrobiano y citotóxico *in-vitro* del hidróxido de calcio combinado con vehículos como NaOCl 5.25 %, solución de superoxidación (microdacyn), mepivacaína (Scandonest 2 % Special), solución salina y extracto hidroetanólico de *Allium sativum* (ajo) contra la cepa clínica de *E. faecalis*.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En este proyecto se propone investigar el efecto antimicrobiano y citotóxico de la medicación de hidróxido de calcio cuando se combina con diferentes vehículos, como el hipoclorito de sodio, solución salina, solución de superoxidación (microdacyn), mepivacaína (Scandonest 2 % Special) y extracto hidroetanólico de *Allium sativum* (ajo).

Se plantean las siguientes preguntas, ¿Se correlaciona un mayor efecto antibacteriano del hidróxido de calcio con un mayor efecto citotóxico?, ¿Existe alguna combinación con el hidróxido de calcio que conserve y prolongue su efecto antibacteriano mientras presenta un menor impacto citotóxico en los eritrocitos humanos?.

IV. JUSTIFICACIÓN

La medicación intraconducto se enfoca principalmente en disminuir la cantidad de microorganismos presentes en el sistema de conductos radiculares. El hidróxido de calcio es eficaz debido a los iones OH⁻ liberados, que se genera cuando el producto se disuelve en iones calcio e hidróxido. La eficacia de esta acción a distancia dependerá de la capacidad de difusión de estos iones a través de la dentina. La adición de sustancias facilita su aplicación, mantiene un pH alto, mejora la fluidez y la detección radiográfica. El vehículo utilizado influye en la disociación iónica y la actividad antimicrobiana. Este trabajo de investigación nos permitirá evaluar la capacidad antibacteriana del hidróxido de calcio cuando se mezcla con diferentes vehículos como medicación intraconducto en una infección causada por *Enterococcus faecalis*, mediante ensayos *in-vitro*. Además, se abordará la evaluación del efecto citotóxico a través de la actividad hemolítica para determinar si alguna de las mezclas estudiadas mantiene su capacidad antimicrobiana mientras minimiza el efecto citotóxico, lo que podría mejorar la seguridad durante el tratamiento endodóntico.

V. HIPÓTESIS

5.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO

La combinación de hidróxido de calcio con diferentes vehículos, como solución de superoxidación (Microdacyn), mepivacaína (Scandonest 2 % Special), solución salina y extracto hidroetanólico de *Allium sativum* (ajo), mostrará diferencias estadísticamente significativas en su actividad antimicrobiana y efecto citotóxico en comparación con la mezcla de hidróxido de calcio e hipoclorito de sodio al 5.25 % frente a una cepa clínica de *E. faecalis*.

5.2 HIPÓTESIS NULA (H0)

La combinación de hidróxido de calcio con diferentes vehículos, como solución de superoxidación (Microdacyn), mepivacaína (Scandonest 2 % Special), solución salina y extracto hidroetanólico de *Allium sativum* (ajo), no mostrará diferencias estadísticamente significativas en su actividad antimicrobiana y efecto citotóxico en comparación con la mezcla de hidróxido de calcio e hipoclorito de sodio al 5.25 % frente a una cepa clínica de *E. faecalis*.

5.3 HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H1)

Al menos una de las combinaciones del hidróxido de calcio con diferentes vehículos, como solución de superoxidación (Microdacyn), mepivacaína (Scandonest 2 % Special), solución salina y extracto hidroetanólico de *Allium sativum* (ajo), mostrará diferencias estadísticamente significativas en comparación con la mezcla de hidróxido de calcio e hipoclorito de sodio al 5.25 %, con un nivel de significancia de al menos ($P < 0.05$), ya sea en relación a la actividad antimicrobiana o en su efecto citotóxico frente a una cepa clínica de *E. faecalis*.

VI. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluación del efecto antimicrobiano y citotóxico *in-vitro* del hidróxido de calcio combinado con vehículos como NaOCl 5.25 %, solución de superoxidación (microdacyn), mepivacaína (Scandonest 2 % Special), solución salina y extracto hidroetanólico de *Allium sativum* (ajo) contra la cepa clínica de *E. faecalis*.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la actividad microbicida del hidróxido de calcio combinado con NaOCl 5.25 %, solución de superoxidación (microdacyn), mepivacaína (Scandonest 2 % Special), solución salina y extracto hidroetanólico de *Allium sativum* (ajo) contra la cepa clínica de *E. faecalis*.
2. Determinar el efecto citotóxico del hidróxido de calcio combinado con NaOCl 5.25 %, solución de superoxidación (microdacyn), mepivacaína (Scandonest 2 % Special), solución salina y extracto hidroetanólico de *Allium sativum* (ajo).
3. Evaluación del efecto hemolítico de las mezclas de hidróxido de calcio combinado con NaOCl 5.25 %, solución de superoxidación (microdacyn), mepivacaína (Scandonest 2 % Special), solución salina y extracto hidroetanólico de *Allium sativum* (ajo).
4. Realizar análisis estadísticos de los resultados mediante la prueba ANOVA bidireccional para evaluar la eficacia antimicrobiana y ANOVA de una vía para examinar la citotoxicidad de las distintas mezclas.

VII. VARIABLES

7.1 VARIABLES INDEPENDIENTES

Hidróxido de calcio asociado a *diferentes vehículos* (NaOCl al 5.25 %, solución de superoxidación, solución salina, mepivacaína Scandonest 2 % Special y extracto hidroetanólico de *Allium sativum*).

7.2 VARIABLES DEPENDIENTES

- Eliminación de *E. faecalis* mediante la formación de halos de inhibición en relación al efecto antimicrobiano en la medicación intraconducto.
- Efecto citotóxico a través de la actividad hemolítica.

Tabla 1. Muestra la operacionalización de variables del método de evaluación de la actividad antibacteriana

Variables	Conceptualización	Indicadores	Escala de medición	Valor / categorías
<u>Dependiente</u> Actividad antibacteriana	Capacidad de inactivar microorganismos, evitar su proliferación y/o impedir su acción patógena.	Se medirá a través del halo de inhibición del crecimiento bacteriano. Se expresa en milímetros.	Razón	En milímetros (mm)
<u>Independiente</u> Hidróxido de calcio asociado a distintos vehículos	Son medios a través de los cuales se llevará a cabo la disociación de los iones hidróxilo	- Hipoclorito de sodio al 5.25 % - Solución salina - mepivacaína (Scandonest 2 % Special) - Solución de superoxidación - Extracto hidroetanólico de <i>Allium Sativum</i>	Nominal	I. Hidróxido de calcio + Hipoclorito de sodio al 5.25 % II. Hidróxido de calcio + Solución salina III. Hidróxido de calcio + Mepivacaína (Scandonest 2 % Special) IV. Hidróxido de calcio + Solución de superoxidación V. Hidróxido de calcio + Extracto hidroetanólico de <i>Allium Sativum</i>

7.3 OPERACIÓN DE VARIABLES

A través del método de Agar Gelosa Sangre al 5 % inoculado con cepas bacterianas de *E. faecalis*, se evaluarán los halos de inhibición bacteriana de las diferentes asociaciones del hidróxido de calcio. Se procederá a medir los halos de inhibición bacteriana en milímetros de diámetro utilizando una regla de precisión tipo Pie de Rey (vernier).

Se tomará en consideración el promedio de los diámetros que se formen alrededor de cada sustancia evaluada, y se registrarán los resultados en la tabla de recopilación de datos. El tamaño de esta zona de inhibición estará directamente relacionado con la actividad antibacteriana de las combinaciones frente a la microflora bacteriana. Se realizó un análisis estadístico con el programa de GraphPad Prism Software (versión 10 para Windows, San Diego, California USA, 2024) mediante el análisis de varianza ANOVA bidireccional y se utilizó el método de Tukey para comparar las diferencias entre los grupos estudiados.

Por otra parte, se evaluó el efecto citotóxico inducido por cada una de las mezclas de hidróxido de calcio en células eritrocitarias humanas mediante la medición de la absorbancia a 600 nm en un lector multipozo. Se utilizó el programa GraphPad Prism Software (versión 10 para Windows, San Diego, California USA, 2024). Se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía y el método de comparación múltiple Tukey, para determinar si existían diferencias significativas entre las mezclas de hidróxido de calcio sobre la suspensión de eritrocitos.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. TIPO DE ESTUDIO

Experimental *in-vitro* y longitudinal

8.2 UNIVERSO DE ESTUDIO

8.2.1 Método de evaluación de la actividad antibacteriana

Grupo 1: Ca(OH)_2 + NaOCl al 5.25 %

Grupo 2: Ca(OH)_2 + Solución de superoxidación (microdacyn)

Grupo 3: Ca(OH)_2 + Mepivacaína (Scandonest 2 % Special)

Grupo 4: Ca(OH)_2 + Solución salina

Grupo 5: Ca(OH)_2 + Extracto hidroetanólico de *Allium sativum* (ajo)

Grupo 6 (Controles): NaOCl al 5.25 %, Solución salina.

n= 6 grupos

8.2.2. Método de evaluación de citototoxicidad en eritrocitos

Muestra de cultivo de eritrocitos al 4 % expuestos a las diferentes mezclas de hidróxido de calcio distribuidas de la siguiente manera

Grupo 1: Ca(OH)_2 + NaOCl al 5.25 %

Grupo 2: Ca(OH)_2 + Solución de superoxidación (microdacyn)

Grupo 3: Ca(OH)₂ + Mepivacaína (Scandonest 2 % Special)

Grupo 4: Ca(OH)₂ + Solución salina

Grupo 5: Ca(OH)₂ + Extracto hidroetanólico de *Allium sativum* (ajo)

Grupo control positivo: Detergente para células

Grupo control negativo: Solución salina

8.3. MATERIALES E INSTRUMENTAL

El antibiograma se realizará conforme a las normas de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) y European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing en placas Agar Gelosa Sangre al 5 % (Microbiología Médica CMI, México) las cuales serán inoculadas con cultivo Clínico de *Enterococcus Faecalis*, para tener un campo estéril se utilizará alcohol sólido 250 ml. (marca Fuego, México),

Para la experimentación del efecto antimicrobiano, se utilizaron guantes de látex estériles (Ambiderm), toallitas germicidas (Super Sani- Cloth), desinfectante en aerosol (Lysol), bolsas plásticas (ziploc), indumentaria de protección personal, alcohol al 70 % (Jaloma) para desinfección de área de trabajo, hisopos estériles (McKesson), pipeta Pasteur de vidrio estéril, plumón negro marcador permanente (sharpie), incubadora (HHD), regla calibradora vernier, micropipeta (VWR de 2-20 µL, 100-1000 µL), loseta de vidrio estéril, espátulas estériles, balanza analítica (Ohaus Pioneer), hojas de papel de pesaje blanco, lámparas de luz uv para esterilizar, cinta parafina, matraz. Para las diferentes asociaciones se utilizó hidróxido de calcio (Viarden Lab, Mission, Texas) siendo sus vehículos hipoclorito de sodio al 5.25 % (cloralex, México), microdacyn ® solución (Invekra, México), Scandonest 2 % special (*SEPTODONT, Francia*), solución CS Pisa (Pisa farmaceutica), extracto hidroetanólico de *Allium sativum* (ajo).

Para la elaboración del extracto de ajo se utilizo agua tridestilada (Aqua, ZEYCO), dientes de ajo (en bolsa de malla) balanza analítica (Ohaus Pioneer), hojas de papel

de pesaje blanco, tubo de centrifuga de 45 ml (VWR), Agitador de plataforma basculante y rotatorios 3D (barnstead thermolyne labquake), jeringa hipodérmica de 10ml (BD Plastipak).

La experimentación fue llevada a cabo en el laboratorio 12 del edificio 3H de la Facultad de Odontología campus Tijuana en abril del 2024.



Figura 10. Edificio 3H de la Facultad de odontología. *En la figura 10 se ilustra el edificio 3H de la Facultad de Odontología Campus Tijuana*

8.4. METODOLOGÍA

8.4.1. Evaluación de la actividad antibacteriana

8.4.1.1 Preparación del extracto hidroetanólico de allium sativum

Para la medición y preparación de la muestra se seleccionaron dientes de ajo los cuales fueron triturados con el apoyo de una licuadora. A través de una balanza

analítica se pesaron 7 g de ajo los cuales fueron agregados a un tubo de centrifuga con 14 ml de agua tridestilada. Esta muestra fue colocada en el agitador barnstead thermolyne labquake durante una hora y media como se observa en la Figura 11.



Figura 11. Agitación del Extracto hidroetanólico de *Allium sativum*. En la figura 11 se observa el extracto de ajo en el agitador barnstead thermolyne labquake.

8.4.1.2. Clasificación de las placas Agar Gelosa Sangre al 5 %

Las placas de agar gelosa sangre al 5 % fueron rotuladas en su exterior de acuerdo a la mezcla de hidróxido de calcio obtenida por las distintas asociaciones con los vehículos de interés para estudio.

Placa 1 parte superior para el grupo A: $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{NaOCl}$ al 5.25 %

Placa 1 parte inferior para el grupo B: $\text{Ca}(\text{OH})_2 +$ Solución de superoxidación (microdacyn)

Placa 2 parte superior para el grupo C: $\text{Ca}(\text{OH})_2 +$ Mepivacaína (Scandonest 2 % Special)

Placa 2 parte inferior para el grupo D: $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + Solución salina

Placa 3 para el grupo E: $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + Extracto hidroetanólico de *Allium sativum* (ajo)



Figura 12. Agar Gelosa-sangre 5 % . Presentación de las placas de agar gelosa sangre 5 % para su rotulación

8.4.1.3. Inoculación de las placas: Para mantener un entorno estéril, se dispusieron latas de alcohol sólido de 250 ml de la marca Fuego formando un triángulo. Durante la preparación de la inoculación, se procedió a abrir un tubo de cultivo en caldo que contenía la cepa clínica de *E. faecalis*. Se extrajeron 100 microlitros de la muestra con una micropipeta, los cuales fueron posteriormente depositados sobre la placa de agar sangre (Figura 13 panel A,B,C). Luego, utilizando un hisopo estéril, se distribuyó la cepa de manera uniforme por toda la superficie del agar mediante el método de agotamiento, como podemos observar en la Figura 13 panel D.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

Una vez completada la siembra, se esperó un período de tiempo de 3 a 5 minutos, durante el cual se absorbió el exceso de humedad.



Figura 13. Inoculación de las placas de agar sangre. La figura 13 ilustra el proceso de siembra de la bacteria *E. faecalis* mediante el uso de una micropipeta y la técnica de agotamiento.

En las placas, previamente rotuladas e inoculadas, emplearon pipetas Pasteur de vidrio estériles para crear pozos de 6 milímetros de diámetro, con una distancia aproximada entre cada uno de 15 a 26 mm



Figura 14. Fabricación de los pozos. En la figura 14 se ilustra la fabricación de los 6 pozos con una pipeta Pasteur de vidrio estéril.

8.4.1.4. *Preparación de las mezclas de hidróxido de calcio:* Se realizaron mediciones de 0.280 gramos aproximadamente de hidróxido de calcio para cada asociación mediante una balanza analítica (Figura 15 panel A). Los envases que contenían los 0.280 gramos de hidróxido de calcio se mezclaron con 200 μ L de cada vehículo a estudiar hasta lograr una consistencia de pasta (Figura 15 panel B y C). Las mezclas de hidróxido de calcio fueron colocadas en los pozos fabricados previamente, realizando triplicados de cada uno (Figura 15 panel D).

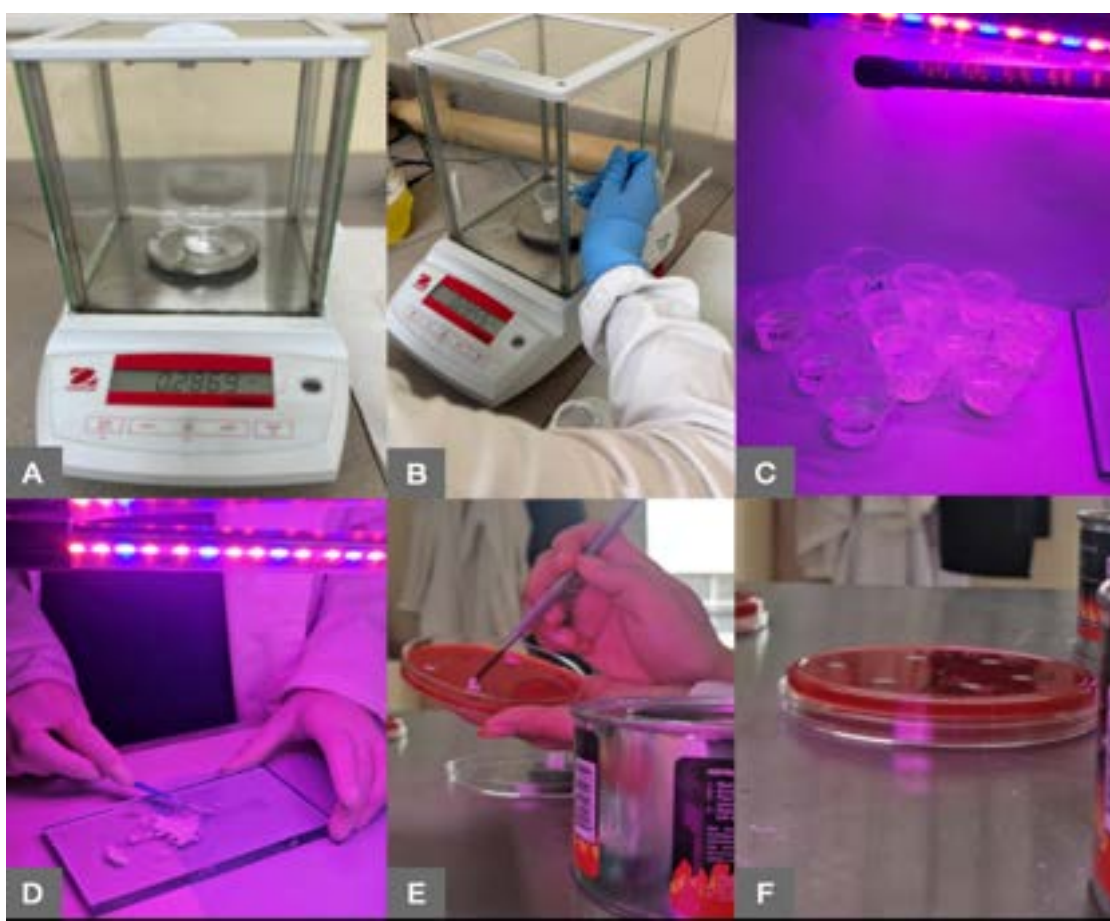


Figura 15. Fabricación y colocación de las mezclas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ con los distintos vehículos. En la figura 15 se muestra el proceso completo, desde el pesaje del hidróxido de calcio hasta la disposición final en forma de pasta dentro de los pozos creados en el agar.

8.4.1.5. Incubación: Posteriormente, las placas se trasladaron a una incubadora a 37 °C y, tras un período de incubación de 24, 48 y 72 horas, se llevaron a cabo las mediciones de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano respectivamente.



Figura 16. Incubación de los medios de cultivo. En la figura 16 observamos la incubación de las cajas petri a 37 °C durante un periodo de tiempo de 24, 48 y 72 horas.

8.4.1.6. Medición de los halos de inhibición:

A las 24 horas se procedió a medir los halos de inhibición bacteriana en milímetros de diámetro utilizando una regla calibradora vernier. Se calculó el promedio de los diámetros observados alrededor de cada sustancia evaluada y se registraron los resultados en la tabla de recolección de datos.

Es importante destacar que el diámetro de la zona de inhibición estaba directamente relacionado con la actividad antimicrobiana de las combinaciones estudiadas frente a la microflora bacteriana. El valor de 6 milímetros se consideró como ausencia de inhibición bacteriana, ya que correspondía al diámetro de los pozos utilizados en el experimento. Al transcurrir las 48 y 72 horas se repitió el mismo procedimiento para el registro de los datos.

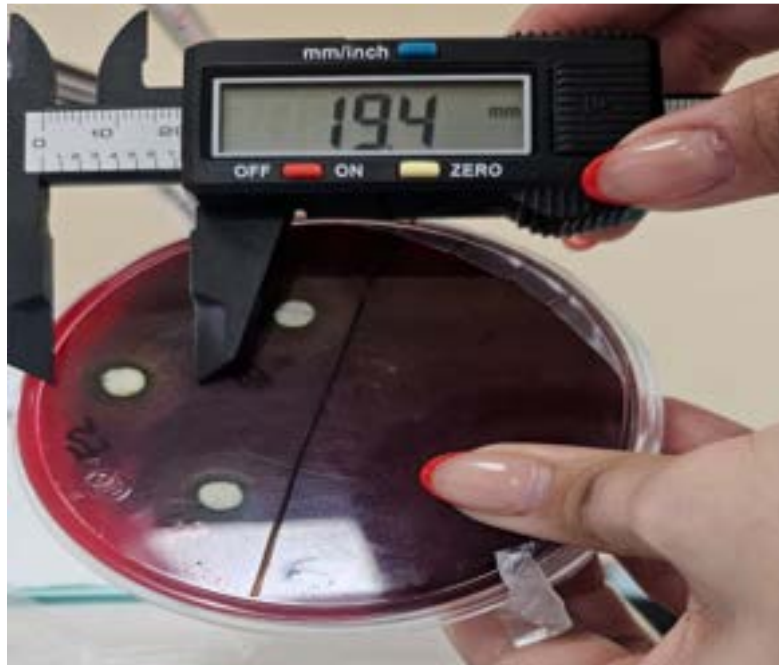


Figura 17. Medición de los halos de inhibición. *En la figura 17 se presenta cómo, tras 24, 48 y 72 horas, se midieron los halos de inhibición utilizando una regla calibradora vernier.*

8.4.2. Evaluación del efecto citotóxico a través de la actividad hemolítica

Se escogió a una varón de 34 años de edad que no presentaba historial de enfermedades sistémicas y que estaba en óptimas condiciones de salud. Se empleó alcohol etílico al 70 % para limpiar la zona de punción antes de recolectar la muestra sanguínea. La extracción se realizó con una jeringa hipodérmica de 10 ml (BD Plastipak). Las muestras se recolectaron en tubos con tapón morado conteniendo anticoagulante EDTA (BD VACUTAINER con EDTA K2). (Figura 18 panel A)

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la medición de la citotoxicidad a través de actividad hemolítica se utilizaron tubos eppendorf de 1.5 ml y de 45 ml, gradilla para tubos eppendorf, una centrífuga para tubos eppendorf (eppendorf, Centrifuge 5418), solución salina al 0.9 % (cloruro de sodio, CS PiSA), probeta graduada 50 ml, micropipetas (VWR de 2-20 μL , 100-1000 μL) y el lector de absorbancia el fotómetro de mesa multiparamétrico y medidor de pH (H183399 HANNA) y las mezclas de Hidróxido de calcio de interés para este estudio:

A: $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + NaOCl al 5.25 %

B: $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + Solución de superoxidación (microdacyn)

C: $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + Mepivacaína (Scandonest 2 % Special)

D: $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + Solución salina

E: $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + Extracto hidroetanólico de *Allium sativum* (ajo)

Para comenzar a preparar la solución de eritrocitos al 4 %, se inició con el lavado de los eritrocitos añadiendo 150 μL de eritrocitos en cada tubo Eppendorf de 1.5 ml (Figura 18 panel B y C), complementando el volumen restante con solución salina hasta alcanzar 1.5 ml (Figura 18 panel D).

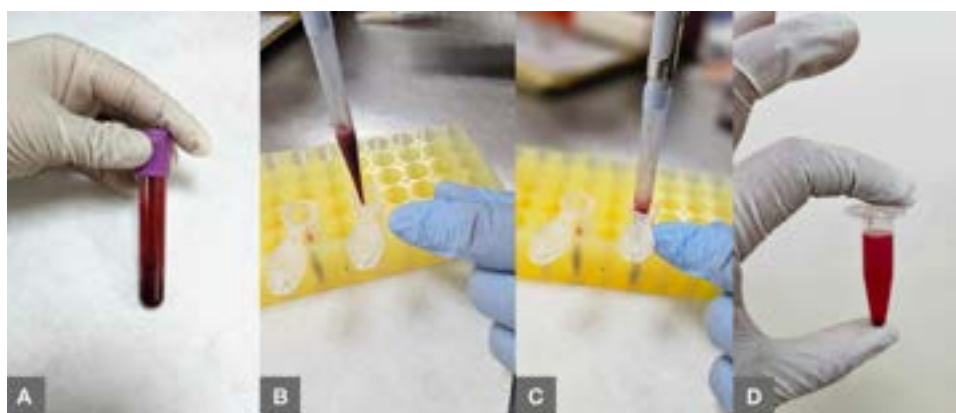


Figura 18. Lavado de eritrocitos humanos. En la Figura 18 se ilustra el proceso de extracción de 150 microlitros de eritrocitos humanos, los cuales son transferidos a un tubo Eppendorf, seguido de la adición de solución salina.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

Luego, se procedió a centrifugar durante 10 minutos a 3400 revoluciones por minuto (rpm) para separar los eritrocitos del suero. Una vez completada la centrifugación, se eliminó el sobrenadante, dejando los botones de glóbulos rojos. Este proceso de lavado se repitió durante cuatro ciclos adicionales, ajustando la velocidad de centrifugación a 2100 rpm en cada uno. Después de completar los cinco ciclos de lavado, se eliminó el último sobrenadante y se añadió solución salina suficiente para alcanzar un volumen total de 1 ml en los tubos Eppendorf de 1.5 ml se llevaron a refrigeración para su conservación.



Figura 19. Centrifugación de tubos Eppendorf. *En la figura 19 podemos observar la colocación de los tubos eppendorf para su centrifugación durante 10 minutos a 3400 rpm.*

Para preparar la solución madre de eritrocitos al 4 %, se procedió a eliminar el sobrenadante, dejando únicamente el botón de glóbulos rojos, repitiendo este proceso en todos los tubos Eppendorf disponibles. Utilizando una micropipeta, se extrajo el botón hasta alcanzar una cantidad de 1.2 ml de eritrocitos, los cuales fueron transferidos a una probeta graduada de 50 ml (Figura 20 panel A). Posteriormente, se agregó solución salina gradualmente hasta alcanzar un volumen

final de 40 ml (Figura 20 panel B). La solución resultante de eritrocitos al 4 % se transfirió a un tubo Eppendorf de 45 ml y se almacenó en refrigeración (Figura 20 panel C).



Figura 20. Solución madre de eritrocitos al 4 %. En la figura 20 Panel A: Extracción de 1.2 ml de eritrocitos de un tubo Eppendorf a una probeta graduada de 50 ml. Panel B: Preparación de la solución madre de eritrocitos al 4 % mediante la adición gradual de solución salina hasta alcanzar un volumen de 40 ml. Panel C: Almacenamiento de la solución de eritrocitos al 4 % en un tubo Eppendorf de 45 ml en refrigeración.

Los tubos Eppendorf de 1.5 ml fueron etiquetados para la evaluación de la actividad hemolítica de las distintas mezclas de hidróxido de calcio de interés en este estudio, además, se incluyeron controles para comparar resultados en donde la solución salina se utilizó como control negativo y detergente para células como control positivo.

A: $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{NaOCl}$ al 5.25 %

B: $\text{Ca}(\text{OH})_2 +$ Solución de superoxidación (microdacyn)

C: $\text{Ca}(\text{OH})_2 +$ Mepivacaína (Scandonest 2 % Special)

D: $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + Solución salina

E: $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + Extracto hidroetanólico de *Allium sativum* (ajo)

Control positivo: Detergente para células

Control negativo: Solución salina (SS)

En cada tubo, se agregaron 50 miligramos (0.0500 gramos) de cada mezcla a evaluar, colocados en una pared del tubo en su parte inferior, seguidos de la adición de 1 mililitro (1000 microlitros) de la solución de eritrocitos al 4 % utilizando una micropipeta. Una vez completados todos los tubos y habiendo realizado duplicados de cada mezcla a evaluar, se llevaron a incubación durante una hora a 37 °C.



Figura 21. Mezclas de Hidróxido de calcio con suspensión de glóbulos rojos. En la figura 21 se muestra el proceso de pesaje de 50 mg de cada mezcla de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ para luego colocarlas en tubos Eppendorf, donde se añadió la suspensión de glóbulos rojos.

Pasado el tiempo de incubación se llevaron a la centrifuga durante 5 minutos a 10000 rpm. Para evaluar el rendimiento de la hemoglobina en el sobrenadante, se empleó un espectrofotómetro modelo H183399 HANNA, en donde se registro dos veces la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm.



Figura 22. Espectrofotómetro lector de absorbancia. *En la figura 22 se aprecia una fotografía del espectrofotómetro utilizado, modelo H183399 HANNA.*

La cantidad de hemoglobina liberada se determinó en un espectrofotómetro y el porcentaje de hemólisis se calculó con la siguiente fórmula: porcentaje de hemólisis (%)= (tratamiento-solución isotónica/tween-solución isotónica) x 100.

8.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la evaluación de la actividad antibacteriana los datos se analizaron estadísticamente utilizando el software GraphPad Prism (versión 10 para Windows, San Diego, California, EE.UU., 2024). Se realizó un análisis de varianza bidireccional (ANOVA), para evaluar la eficacia antimicrobiana y ANOVA de una vía para examinar la citotoxicidad de las distintas mezclas; se utilizó el método de Tukey para comparar las diferencias entre los grupos estudiados. Se consideró que existía diferencia estadísticamente significativa cuando $p < 0.05$.

IX. RESULTADOS

9.1. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

En este estudio, se evaluó la actividad antibacteriana del hidróxido de calcio cuando se mezcla con diferentes vehículos acuosos como parte de la medicación intraconducto, en una infección causada por una cepa clínica de *Enterococcus faecalis*. Se prepararon cinco mezclas distintas, cada una adicionada con los vehículos a investigar, todas utilizando las mismas proporciones: 0.280 gramos de hidróxido de calcio añadidos a 0.20 mililitros de vehículo para estandarizar las mezclas.

9.1.1. Medicion de los halos de inhibición a las 24 horas

Para el *grupo A*: (Ca(OH)_2 + NaOCl al 5.25 %), se registró una media de 18.27 mm (representada por los pozos triplicados en la parte superior de la Figura 23). En el caso del *grupo B*: (Ca(OH)_2 + Solución de superoxidación), se observó una media de 19.67 mm (perteneciente a los pozos triplicados en la parte inferior de la Figura 23). Las medias obtenidas las podemos observar en la Tabla 2.

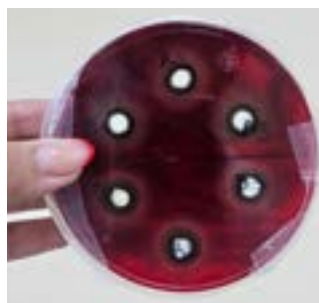


Figura 23. Halos de inhibición a las 24 horas grupo A y B. En la figura 23 podemos observar en la parte superior los halos de inhibición formados por la mezcla de Ca(OH)_2 + NaOCl al 5.25 %; mientras que en la parte inferior aquellos formados por la mezcla Ca(OH)_2 + Solución de superoxidación.

Para el grupo C: Ca(OH)_2 + Mepivacaína (Scandonest 2 % Special), se registró una media de 14.53 mm (representada por los pozos triplicados en la parte superior de la Figura 24. En el caso del grupo D: Ca(OH)_2 + Solución salina), se observó una media de 14.6 mm (perteneciente a los pozos triplicados en la parte inferior de la Figura 24. Las medias obtenidas las podemos observar en la Tabla 2.



Figura 24. Halos de inhibición a las 24 horas grupo C y D. En la figura 24 observamos en su parte superior los halos de inhibición formados por la mezcla de Ca(OH)_2 + Mepivacaína (Scandonest 2 % Special) y en la parte inferior se presentan los halos formados por la mezcla de Ca(OH)_2 + Solución salina.

Por ultimo el grupo E representado por la mezcla de Ca(OH)_2 + Extracto hidroetanólico de *Allium Sativum* registró una media de 19.3 mm (Tabla 2, Figura 25)



Figura 25. Halos de inhibición a las 24 horas grupo E. En la figura 25 se puede apreciar los halos formados por la mezcla de Ca(OH)_2 + Extracto hidroetanólico de *Allium sativum*.

9.1.2. Medicion de los halos de inhibición a las 48 horas

Para el *grupo A*: ($\text{Ca}(\text{OH})_2$ + NaOCl al 5.25 %), se registró una media de 20.63 mm representada por los pozos triplicados en la parte superior de la Figura 26. En el caso del *grupo B*: ($\text{Ca}(\text{OH})_2$ + Solución de superoxidación), se observó una media de 21.0 mm (perteneciente a los pozos triplicados en la parte inferior de la Figura 26). Las medias obtenidas las podemos observar en la Tabla 2.



Figura 26. Halos de inhibición a las 48 horas grupo A y B. En la figura 26 podemos observar en la parte superior los halos de inhibición a las 48 horas por la mezcla de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + NaOCl al 5.25 %; mientras que en la parte inferior aquellos formados por la mezcla $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + Solución de superoxidación.

Para el *grupo C*: ($\text{Ca}(\text{OH})_2$ + Mepivacaína (Scandonest 2 % Special), se registró una media de 18.4 mm (representada por los pozos triplicados en la parte superior de la Figura 27, Tabla 2). En el caso del *grupo D*: ($\text{Ca}(\text{OH})_2$ + Solución salina), se observó una media de 18.97 mm (Tabla 2) (perteneciente a los pozos triplicados en la parte inferior de la Figura 27)

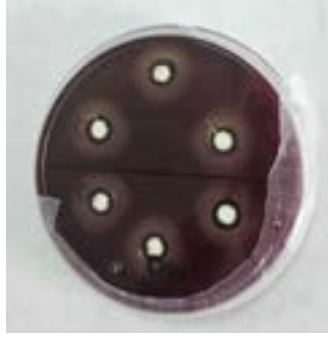


Figura 27. Halos de inhibición a las 48 horas grupo C y D. En la figura 27 observamos en su parte superior los halos de inhibición a las 48 horas por la mezcla de Ca(OH)_2 + Mepivacaína (Scandonest 2 % Special) y en la parte inferior se presentan los halos formados por la mezcla de Ca(OH)_2 + Solución salina.

Por ultimo el grupo E representado por la mezcla de Ca(OH)_2 + Extracto hidroetanólico de *Allium sativum* registró una media de 19.83 mm (Figura 28, Tabla 2).



Figura 28. Halos de inhibición a las 48 horas grupo E. En la figura 28 se puede apreciar los halos de inhibición a las 48 horas por la mezcla de Ca(OH)_2 + Extracto hidroetanólico de *Allium sativum*.

9.1.3. Medicion de los halos de inhibición a las 72 horas

Para el *grupo A*: ($\text{Ca}(\text{OH})_2$ + NaOCl al 5.25 %), se registró una media de 20.86 mm (representada por los pozos triplicados en la parte superior de la Figura 29). En el caso del *grupo B*: ($\text{Ca}(\text{OH})_2$ + Solución de superoxidación), se observó una media de 21.4 mm (perteneciente a los pozos triplicados en la parte inferior de la figura 29). Las medias obtenidas las podemos observar en la Tabla 2.

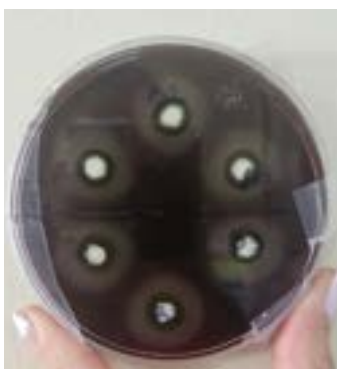


Figura 29. Halos de inhibición a las 72 horas grupo A y B. En la figura 29 podemos observar en la parte superior los halos de inhibición a las 72 horas por la mezcla de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + NaOCl al 5.25 %; mientras que en la parte inferior aquellos formados por la mezcla $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + Solución de superoxidación.

Para el *grupo C*: ($\text{Ca}(\text{OH})_2$ + Mepivacaína (Scandonest 2 % Special), se registró una media de 18.73 mm (representada por los pozos triplicados en la parte superior de la Figura 30). En el caso del *grupo D*: ($\text{Ca}(\text{OH})_2$ + Solución salina), se observó una media de 19.26 mm (perteneciente a los pozos triplicados en la parte inferior de la Figura 30).

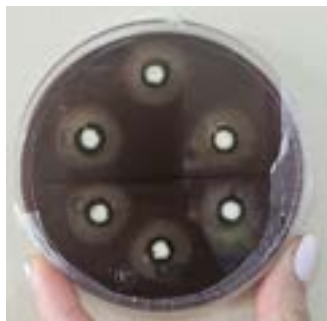


Figura 30. Halos de inhibición a las 72 horas grupo C y D. En la figura 30 observamos en su parte superior los halos de inhibición a las 72 horas por la mezcla de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + Mepivacaína (Scandonest 2 % Special) y en la parte inferior se presentan los halos formados por la mezcla de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + Solución salina.

Por ultimo el grupo E representado por la mezcla de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + Extracto hidroetanólico de *Allium sativum* registró una media de 20.56 mm (Figura 31).

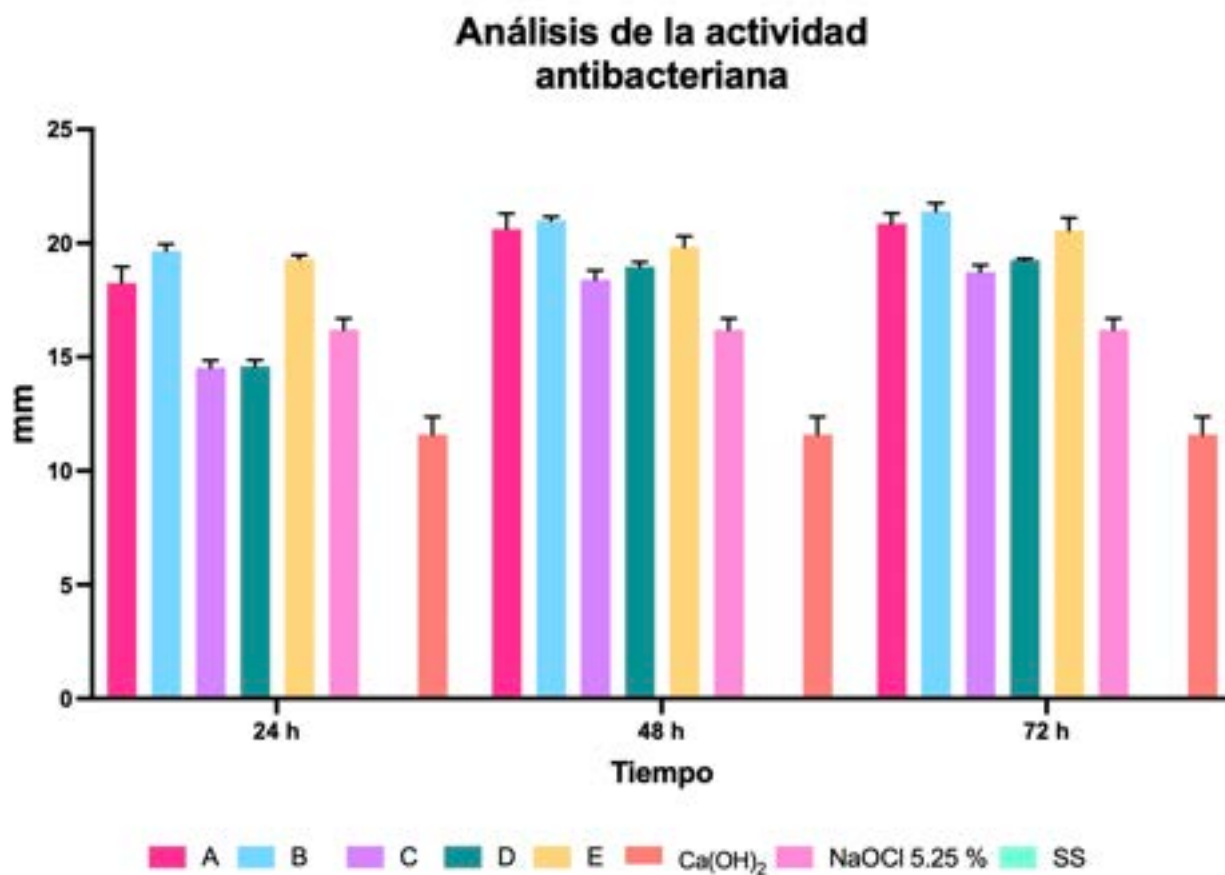


Figura 31. Halos de inhibición a las 72 horas grupo E. En la figura 31 se puede apreciar los halos de inhibición a las 72 horas por la mezcla de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + Extracto hidroetanólico de *Allium sativum*.

Tabla 2. Media de los halos de inhibición observados (expresada en mm)

	24 h (halo de inhibición)	48 h (halo de inhibición)	72 h (halo de inhibición)
Grupo A	18.27 mm	20.63 mm	20.86 mm
Grupo B	19.67 mm	21.0 mm	21.4 mm
Grupo C	14.53 mm	18.4 mm	18.73 mm
Grupo D	14.6 mm	18.97 mm	19.26 mm
Grupo E	19.3 mm	19.83 mm	20.56 mm
NaOCl 5.25 %	16.2 mm	16.2 mm	16.2 mm
SS	0 mm	0 mm	0 mm

Posteriormente para la evaluación de la actividad antibacteriana los datos se analizaron estadísticamente utilizando el software GraphPad Prism (versión 10 para Windows, San Diego, California USA, 2024). Se realizó análisis de varianza bidireccional (ANOVA) y el método de comparación múltiple de Tukey. Los resultados los podemos observar en la Gráfica 1.



Gráfica 1. Análisis de la actividad antibacteriana. *En la gráfica 1 se muestra la media de los halos de inhibición, expresada en milímetros, para cada grupo y sus controles, medida a las 24, 48 y 72 horas.*

Los resultados obtenidos después de **24 h** de incubación, revelaron lo siguiente:

Se identificó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos control NaOCl 5.25 % vs. SS (****) ($P < 0.0001$) con un nivel de significancia del 0.05 %.

El estadístico nos arrojó una diferencia estadísticamente significativa al comparar el grupo A y el NaOCl 5.25 % con un valor de $P < 0.0001$ (****). Por otro lado la comparación entre el grupo B con respecto al NaOCl 5.25 %, se identificó una diferencia estadísticamente significativa con un valor de $P < 0.0001$ (****), y un nivel de significancia del 0.05 %. Así mismo se observó una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo E y el NaOCl 5.25 % (****) ($P < 0.0001$), con un nivel de significancia del 0.05 %. Estos resultados se pueden observar en la Tabla 3.

Por otro lado, el estadístico nos arrojó una diferencia estadísticamente significativa al comparar el grupo C respecto al NaOCl 5.25 %, con un valor de $P = 0.0012$ (**). La comparación del grupo D con nuestro control NaOCl 5.25 % mostró una diferencia estadísticamente significativa con un valor de $P = 0.0020$, (**) y un nivel de significancia del 0.05 %. Estos resultados se pueden observar en la Tabla 3.

Tabla 3. Análisis comparativo de la diferencia estadísticamente significativa y valor de P con respecto a NaOCl 5.25 % a las 24 horas

24 h	Diferencia significativa	Valor de P	Resumen
NaOCl 5.25 % vs. SS	si	< 0.0001	****
A vs. NaOCl 5.25 %	si	< 0.0001	****
B vs. NaOCl 5.25 %	si	< 0.0001	****
C vs. NaOCl 5.25 %	si	0.0012	**
D vs. NaOCl 5.25 %	si	0.0020	**
E vs. NaOCl 5.25 %	si	< 0.0001	****
Ca(OH) ₂ vs. NaOCl 5.25 %	si	< 0.0001	****

Al comparar los grupos A, B, C, D y E contra nuestro grupo control negativo (SS), todos mostraron una diferencia estadísticamente significativa con un valor de $p < 0.0001$, (****) y con un nivel de significancia del 0.05 %. (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis comparativo de la diferencia estadísticamente significativa y valor de P con respecto a SS a las 24 horas

24 h	Diferencia significativa	Valor de P	Resumen
A vs. SS	si	< 0.0001	****
B vs. SS	si	< 0.0001	****
C vs. SS	si	< 0.0001	****
D vs. SS	si	< 0.0001	****
E vs. SS	si	< 0.0001	****
Ca(OH) ₂ vs. SS	si	< 0.0001	****

Se identificó una diferencia estadísticamente significativa al comparar el grupo A respecto al grupo B con un valor de $P = 0.0102$ (*). Sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el grupo A y el grupo E con un valor de $P = 0.1266$, y con un nivel de significancia del 0.05 %. Estos resultados se pueden observar en la Tabla 5.

Por último, el estadístico nos arrojó una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo A y el grupo C, con un valor de $P < 0.0001$ (****), y con un nivel de significancia del 0.05 %. Se obtuvieron los mismos resultados para la comparación entre el grupo A respecto al grupo D. Estos resultados se pueden observar en la Tabla 5.

Tabla 5. Análisis comparativo de la diferencia estadísticamente significativa y valor de P con respecto al grupo A a las 24 horas

24 h	Diferencia significativa	Valor de P	Resumen
A vs. B	si	0.0102	*
A vs. C	si	< 0.0001	****
A vs. D	si	< 0.0001	****
A vs. E	no	0.1266	ns

Los resultados obtenidos después de **48 horas** de incubación revelaron lo siguiente:

Se identificó diferencia estadísticamente significativa entre los grupos control NaOCl 5 % y SS (****) ($p < 0.0001$) y con un nivel de significancia del 0.05 %.

Al comparar el grupo A, B, C, D y E, respecto al control positivo el NaOCl 5.25 % el estadístico nos arrojó lo siguiente: existe una diferencia estadísticamente significativa con un valor de $P < 0.0001$ (****) y con un nivel de significancia del 0.05 %. Estos datos los podemos observar en la Tabla 6.

Tabla 6. Análisis comparativo de la diferencia estadísticamente significativa y valor de P con respecto a NaOCl 5.25 % a las 48 horas

48 h	Diferencia significativa	Valor de p	Resumen
NaOCl 5 % vs. SS	si	< 0.0001	****
A vs. NaOCl 5 %	si	< 0.0001	****
B vs. NaOCl 5 %	si	< 0.0001	****
C vs. NaOCl 5 %	si	< 0.0001	****
D vs. NaOCl 5 %	si	< 0.0001	****
E vs. NaOCl 5 %	si	< 0.0001	****
Ca(OH) ₂ vs. NaOCl 5 %	si	< 0.0001	****

Al comparar los grupos A, B, C, D y E contra el grupo control negativo (SS), todos mostraron una diferencia estadísticamente significativa con un valor de $P < 0.0001$ (****), y con un nivel de significancia del 0.05 % (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis comparativo de la diferencia estadísticamente significativa y valor de P con respecto a SS a las 48 horas

48 h	Diferencia significativa	Valor de p	Resumen
A vs. SS	si	< 0.0001	****
B vs. SS	si	< 0.0001	****
C vs. SS	si	< 0.0001	****
D vs. SS	si	< 0.0001	****
E vs. SS	si	< 0.0001	****
Ca(OH) ₂ vs. SS	si	< 0.0001	****

El estadístico nos arrojó una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo A y el grupo C con un valor de $P < 0.0001$ (****). Sin embargo, no se identificó una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo A y el grupo B con un valor de $P = 0.9747$, y con un nivel de significancia del 0.05 %. Estos valores los podemos identificar en la Tabla 8.

Al comparar el grupo A respecto al grupo D el estadístico identificó una diferencia estadísticamente significativa con un valor de $P = 0.0012$ (**) y con un nivel de significancia del 0.05 %. Sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el grupo A y el grupo E donde $P = 0.4017$, con un nivel de significancia del 0.05 % (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis comparativo de la diferencia estadísticamente significativa y valor de P con respecto al grupo A a las 48 horas

48 h	Diferencia significativa	Valor de p	Resumen
A vs. B	no	0.9747	ns
A vs. C	si	< 0.0001	****
A vs. D	si	0.0012	**
A vs. E	no	0.4017	ns

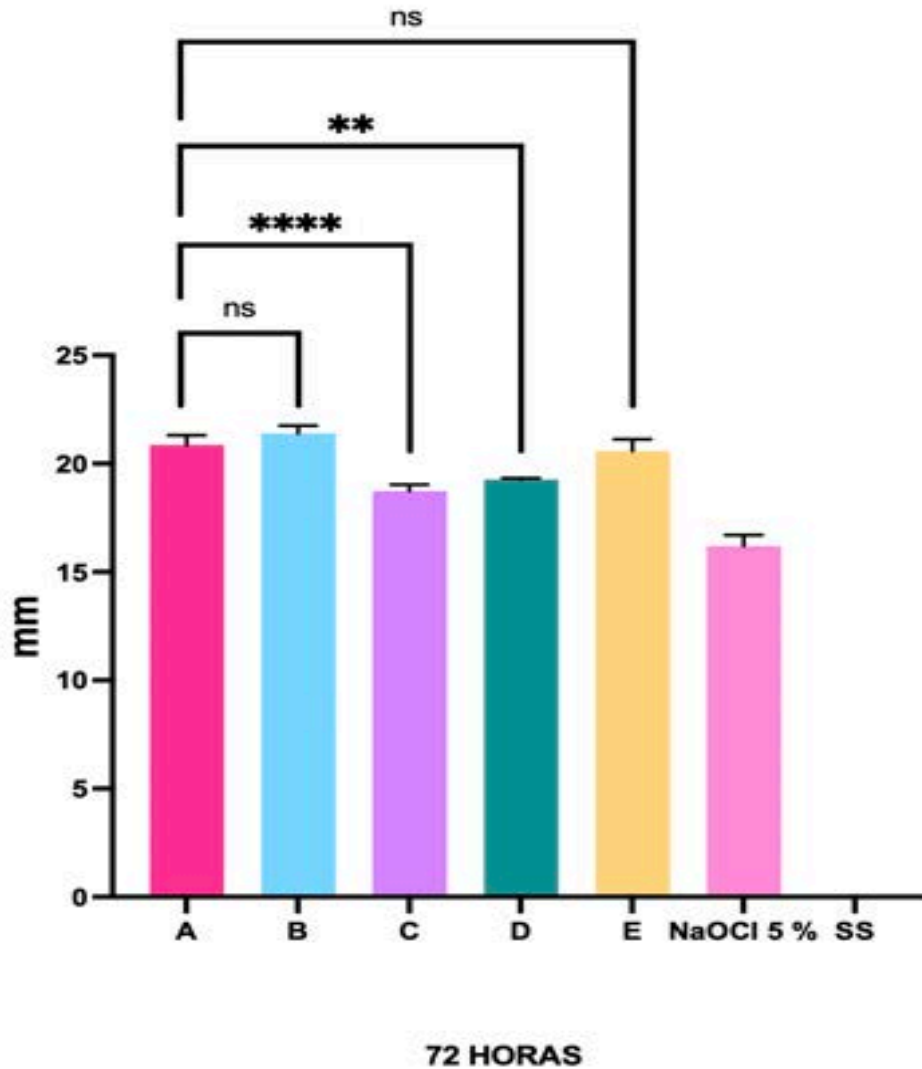
Los resultados obtenidos después de **72 horas** de incubación revelaron lo siguiente:

Los resultados del análisis estadístico a las 48 y 72 h fueron consistentes y similares entre sí. Sin embargo el análisis estadístico identificó valores distintos a los obtenidos en las 48 h; por ejemplo: al comparar el grupo A respecto al grupo B no se identificó una diferencia estadísticamente significativa con un valor de $P = 0.8385$, y con un nivel de significancia del 0.05 %. Por otra parte al realizar la comparación entre el grupo A respecto al grupo D se observó una diferencia estadísticamente significativa con un valor de $P = 0.0020$ (**). Sin embargo, no se identificó una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo A y el grupo E con un valor de $P = 0.992$, y con un nivel de significancia del 0.05 %. Se anexa Tabla 6, Tabla 7 y Tabla 9, así como la Gráfica 2, donde se pueden observar los resultados arrojados por el estadístico, es posible ver la tabla completa de las 72 h en anexos.

Tabla 9. Análisis comparativo de la diferencia estadísticamente significativa y valor de P con respecto al grupo A a las 72 horas

72 h	Diferencia significativa	Valor de P	Resumen
A vs. B	no	0.8385	ns
A vs. C	si	< 0.0001	****
A vs. D	si	0.0020	**
A vs. E	no	0.9921	ns

Análisis de la actividad antibacteriana



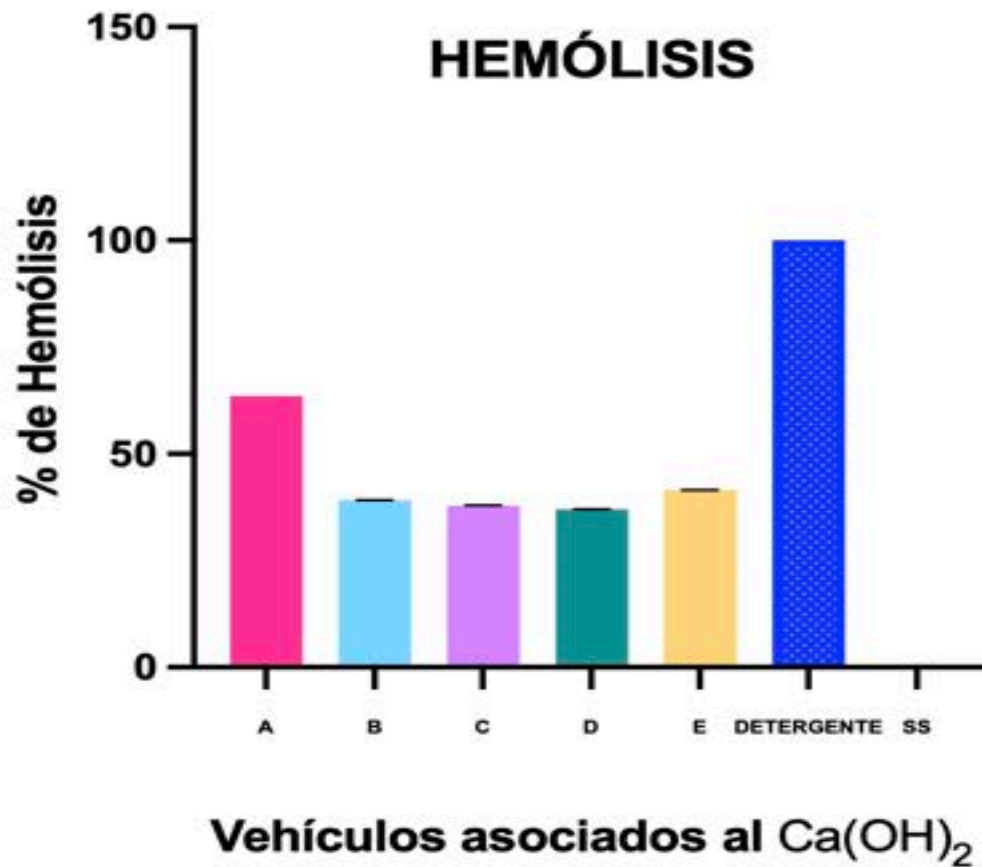
Gráfica 2. Halos de inhibición de las mezclas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a las 72 h. En la gráfica 2 se muestran las comparaciones entre la mezcla de hidróxido de calcio con hipoclorito de sodio (grupo A) respecto a los demás grupos. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo A y los grupos C y D, excepto con el grupo B y E, donde no hubo diferencia estadísticamente significativa.

9.2. ANÁLISIS DEL EFECTO CITOTÓXICO A TRAVÉS DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

Se realizó un análisis del efecto citotóxico para evaluar cómo las diferentes mezclas de hidróxido de calcio afectan la viabilidad de los eritrocitos. Se calcularon las medias de la absorbancia de las repeticiones de cada mezcla y, posteriormente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de una comparación de Tukey para identificar las diferencias entre los grupos estudiados. El porcentaje de hemólisis se determinó mediante la ecuación descrita en la metodología, lo que permitió deducir la citotoxicidad de las distintas mezclas. Los resultados se presentan en términos de porcentaje de hemólisis. Los resultados los podemos observar en la Tabla 10 y la Gráfica 3.

Tabla 10. Media de los niveles de absorbancia y porcentaje de hemólisis de los distintos grupos y controles (expresada en ABS y %).

Grupos	ABS	% Hemólisis
A	2.366	63.6 %
B	1.470	39.1 %
C	1.422	37.8 %
D	1.392	37 %
E	1.557	41.5 %
Detergente celular (control +)	0.035	100 %
SS (Control -)	0.036	0 %



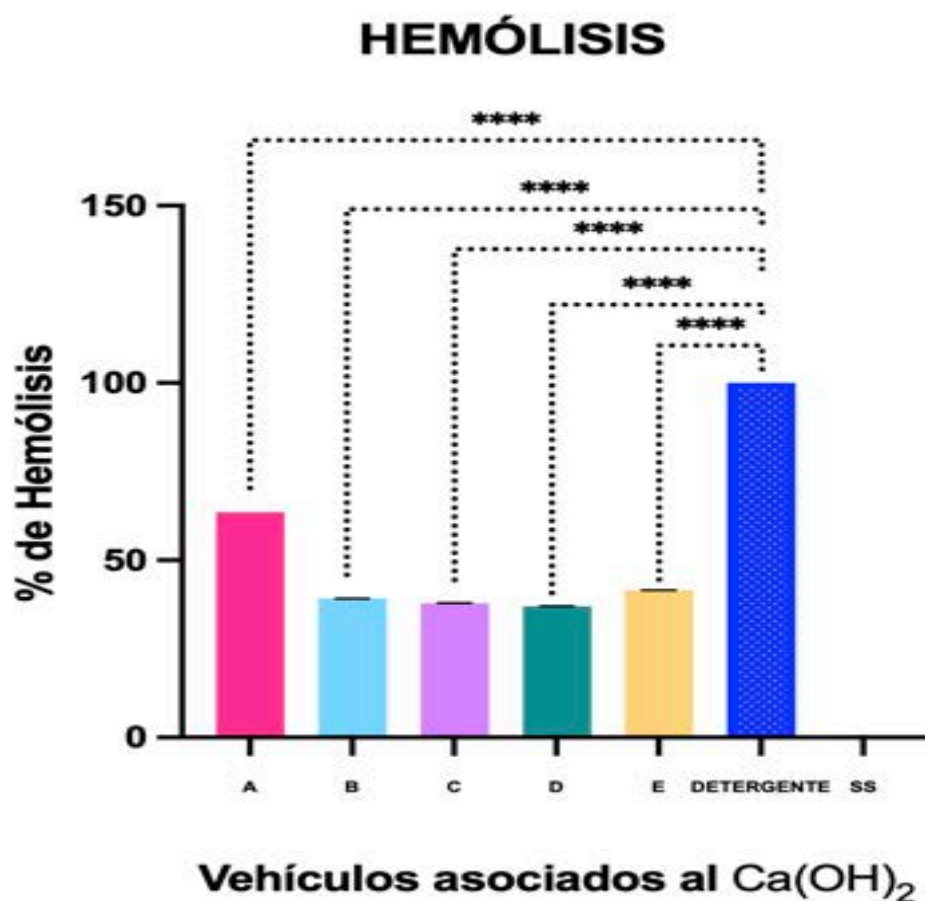
Gráfica 3. Porcentaje de hemólisis de los distintos grupos y controles. En la gráfica 3 se puede observar el porcentaje de hemólisis en cada uno de los grupos estudiados, así como en nuestros controles positivo y negativo. La evaluación se realizó por duplicado para cada toma de absorbancia, obteniendo así una media para mayor precisión.

El grupo A mostró una hemólisis del 63.6 %, mientras que el grupo B presentó un porcentaje del 39.1 %. Por otra parte, el grupo C mostró una hemólisis del 37.8 %, y el grupo D un 37 %. El grupo E presentó un porcentaje del 41.5 %. Además, se evaluó la hemólisis de los grupos de control: nuestro control positivo (detergente para células) mostró una hemólisis del 100 %, mientras que nuestro control negativo (SS) presentó un 0 % de hemólisis. Estos datos podemos observarlos en la Tabla 10 y la Gráfica 3.

El estadístico nos arrojó diferencias estadísticamente significativas al comparar los grupos A, B, C, D y E respecto al control positivo (detergente para células) con un valor de p menor a 0.0001 en todos los casos y con un nivel de significancia del 0.05 % (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis de la citotoxicidad de las mezclas de hidróxido de calcio en comparación con detergente para células

Grupo	Diferencia Estadísticamente significativa	Valor de p	Resumen
A vs. Detergente	Si	< 0.0001	****
B vs. Detergente	Si	< 0.0001	****
C vs. Detergente	Si	< 0.0001	****
D vs. Detergente	Si	< 0.0001	****
E vs. Detergente	Si	< 0.0001	****



Gráfica 4. Porcentaje de hemólisis de las mezclas de hidróxido de calcio en comparación con detergente para células. En la gráfica 4 se observa la comparación entre los grupos de interés de este estudio y el control positivo (detergente para células), mostrando una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.0001$) (****) en todos los casos.

En la Tabla 12 se presentan los resultados de las diferencias estadísticamente significativas de la *citotoxicidad* encontradas al comparar los grupos A, B, C, D y E respecto al control negativo (SS). Estas diferencias estadísticamente significativas se reflejan en los valores de $P < 0.0001$ en todos los casos. Con un nivel de significancia del 0.05 %.

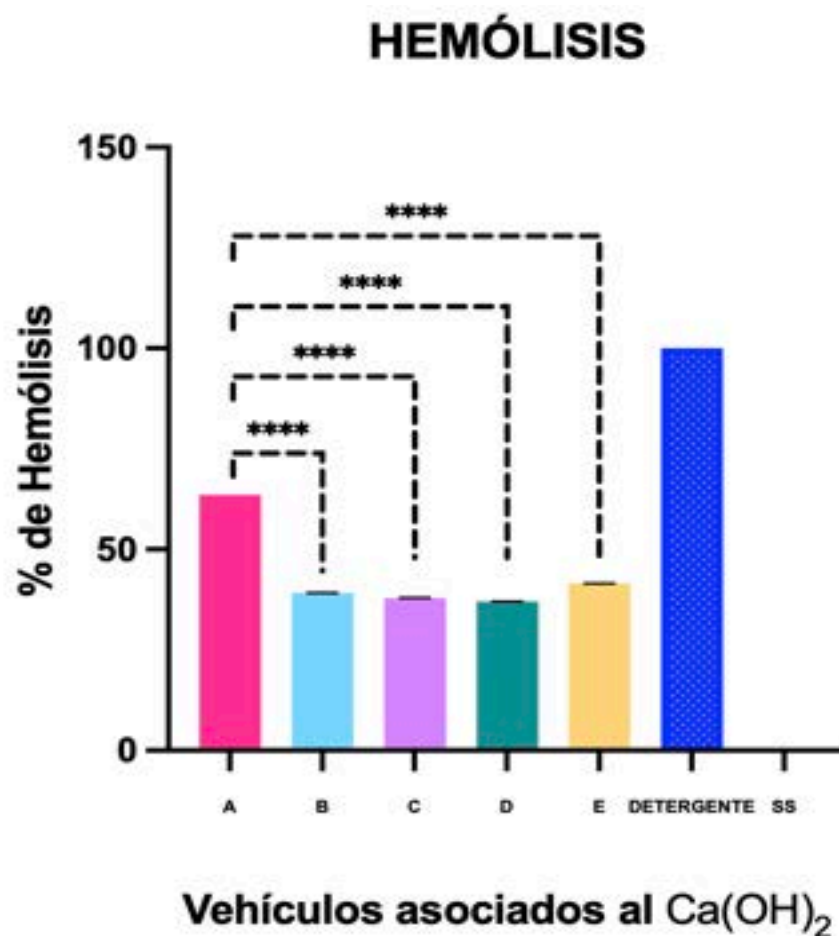
Tabla 12. Análisis de la citotoxicidad de las mezclas de hidróxido de calcio en comparación con SS

Grupo	Diferencia Estadísticamente significativa	Valor de p	Resumen
A vs. SS	Si	< 0.0001	****
B vs. SS	Si	< 0.0001	****
C vs. SS	Si	< 0.0001	****
D vs. SS	Si	< 0.0001	****
E vs. SS	Si	< 0.0001	****

Por otro lado la comparación del grupo A con respecto a los grupos B, C, D y E presentó una diferencia estadísticamente significativa con un valor de de $P < 0.0001$ (****) y un nivel de significancia del 0.05 %. Estos resultados se ven reflejados en la Tabla 13 y la Gráfica 5.

Tabla 13. Análisis de la citotoxicidad de la mezcla de hidróxido de calcio con hipoclorito de sodio al 5.25 % respecto a las demás mezclas.

Grupo	Diferencia Estadísticamente significativa	Valor de p	Resumen
A vs. B	Si	< 0.0001	****
A vs. C	Si	< 0.0001	****
A vs. D	Si	< 0.0001	****
A vs. E	Si	< 0.0001	****



Gráfica 5. Comparación del porcentaje de hemólisis entre el grupo A y los demás grupos. En la gráfica 5 se observa la comparación entre el grupo A respecto a los demás grupos, mostrando una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.0001$) (****) en todos los casos.

En la Tabla 14 se presentan los datos arrojados del análisis estadístico de la biocompatibilidad, donde se pueden observar las diferencias estadísticamente significativas al comparar los grupos A, B, C, D y E respecto al control positivo (detergente para células). Estas diferencias significativas se reflejan en los valores de $P < 0.0001$ en todos los casos. Con un nivel de significancia del 0.05 %.

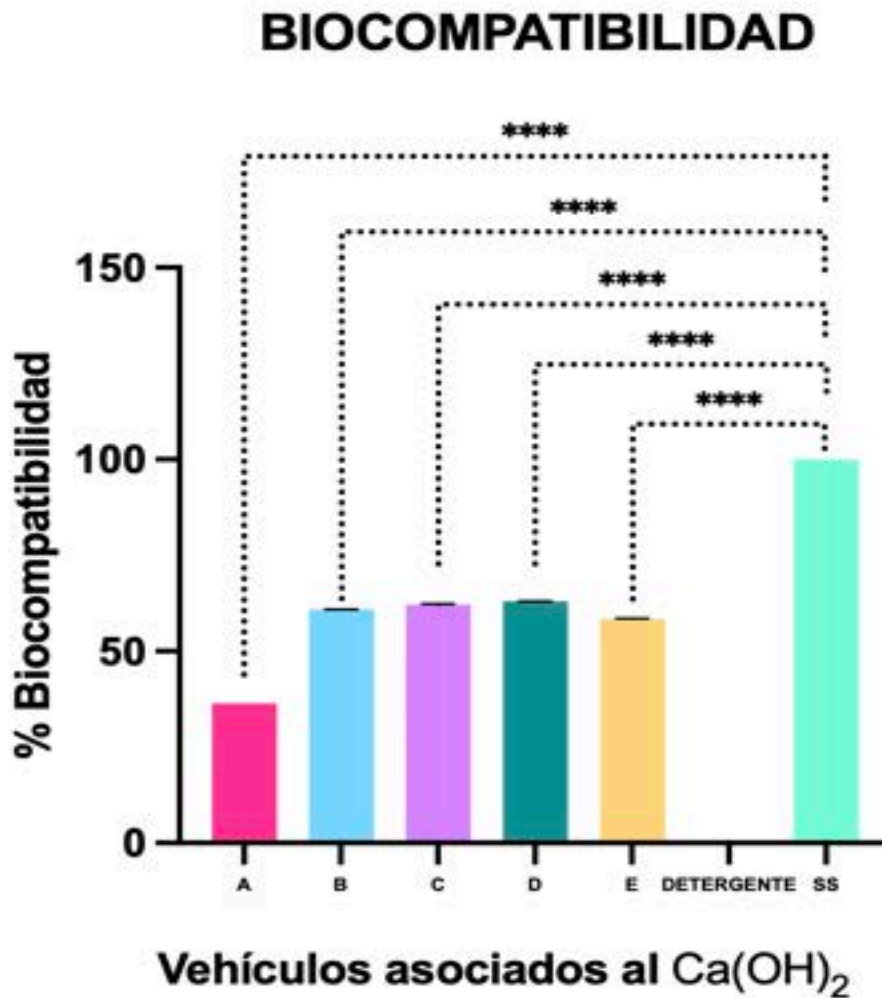
Tabla 14. Análisis de la biocompatibilidad de las mezclas de hidróxido de calcio en comparación con detergente para células

Grupos	Diferencia Estadísticamente significativa	Valor de P	Resumen
A vs. Detergente	Si	< 0.0001	****
B vs. Detergente	Si	< 0.0001	****
C vs. Detergente	Si	< 0.0001	****
D vs. Detergente	Si	< 0.0001	****
E vs. Detergente	Si	< 0.0001	****

En la Tabla 15 se presentan los resultados de las diferencias estadísticamente significativas de la *biocompatibilidad* entre todas las comparaciones de las mezclas de hidróxido de calcio y nuestro control negativo, en este caso SS. Estas diferencias estadísticamente significativas se reflejan en los valores de $P < 0.0001$ en todos los casos. Con un nivel de significancia del 0.05 %.

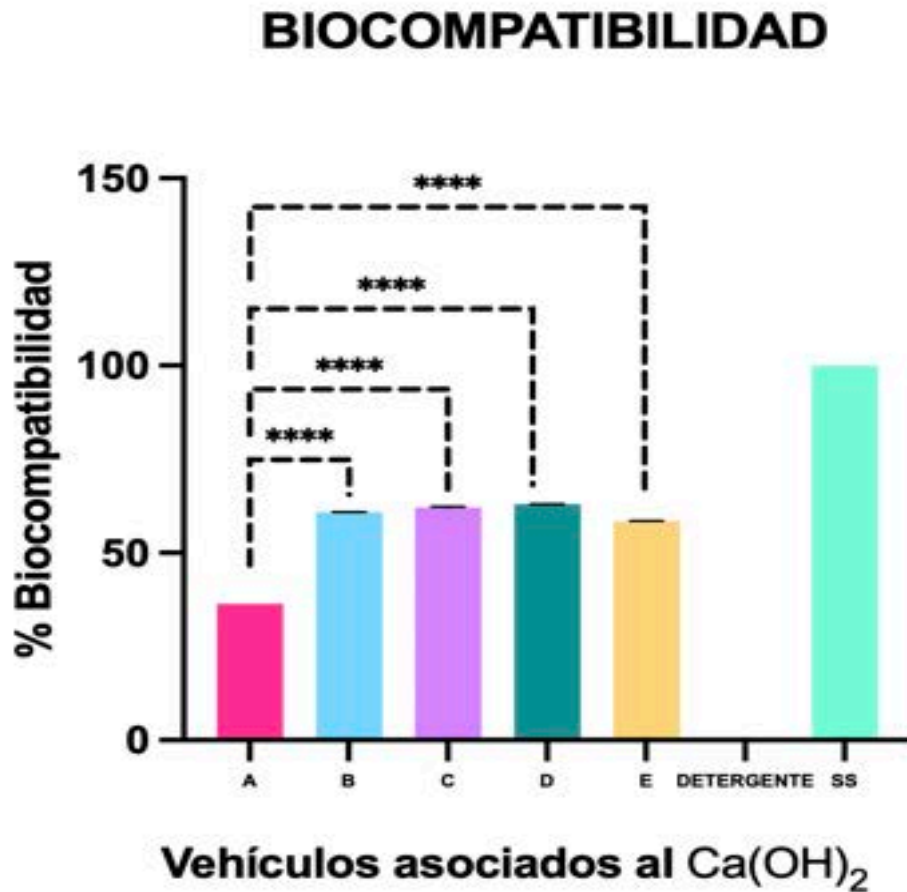
Tabla 15. Análisis de la biocompatibilidad de las mezclas de hidróxido de calcio en comparación con SS

Grupo	Diferencia Estadísticamente significativa	Valor de p	Resumen
A vs. SS	Si	< 0.0001	****
B vs. SS	Si	< 0.0001	****
C vs. SS	Si	< 0.0001	****
D vs. SS	Si	< 0.0001	****
E vs. SS	Si	< 0.0001	****



Gráfica 6. Porcentaje de biocompatibilidad de las mezclas de hidróxido de calcio en comparación con SS. En la gráfica 6 se aprecia el porcentaje de biocompatibilidad, se compararon los distintos grupos contra la SS en donde todos mostraron una diferencia estadísticamente significativa con un valor de $P < 0.0001$ (**).**

Al comparar los grupos B, C, D y E con el grupo A, que es la mezcla principal de hidróxido de calcio utilizada, todos mostraron una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la biocompatibilidad con un valor de $P < 0.0001$ (****) y un nivel de significancia del 0.05 %.



Gráfica 7. Comparación del porcentaje de biocompatibilidad entre el grupo A y los demás grupos. En la gráfica 7, se aprecia el porcentaje de biocompatibilidad de los grupos B, C, D y E en comparación con el grupo A, mostrando una diferencia estadísticamente significativa con un valor de $P < 0.0001$ y un nivel de significancia del 0.05 %.

X. DISCUSIÓN

Los medicamentos intraconductos se utilizan como complemento de una meticulosa limpieza y conformación del sistema de conductos radiculares. Su principal función será conservar la asepsia de éste entre las diferentes citas del tratamiento. Con el fin de facilitar la colocación del hidróxido de calcio en el interior del conducto radicular, éste es asociado un vehículo; el cual determinará la velocidad de la disociación iónica, la solubilidad y la difusibilidad, y aunque algunos vehículos proporcionan una disociación más rápida y, en consecuencia, una alcalinidad más rápida de la dentina y los tejidos apicales y periapicales, pueden hacer que la pasta sea más cáustica y agresiva (11,12,18). Por estas razones el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto antimicrobiano y citotóxico *in-vitro* del hidróxido de calcio combinado con vehículos como NaOCl 5.25 %, solución de superoxidación (microdacyn), mepivacaína (Scandonest 2 % Special), solución salina y extracto hidroetanólico de *Allium sativum* (ajo) contra la cepa clínica de *E. faecalis*.

Nuestros resultados mostraron que el hidróxido de calcio adicionado a distintos vehículos como NaOCl 5.25 %, solución de superoxidación (microdacyn), mepivacaína (Scandonest 2 % Special), solución salina y extracto hidroetanólico de *Allium sativum* (ajo), presenta variaciones significativas en su efecto antibacteriano y citotóxico. A las 24 horas, el estadístico nos arrojó los siguientes resultados: la mezcla de hidróxido de calcio con solución de superoxidación mostró la mayor actividad antimicrobiana con halos de inhibición superiores a sus contrapartes con una media de 19.67 mm, en la Tabla 2 podemos observar las medias de las distintas mezclas de hidróxido de calcio. Sin embargo a las 48 y 72 horas, no existió diferencia estadísticamente significativa entre el grupo A correspondiente a la mezcla de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + NaOCl al 5.25 % con respecto al grupo B correspondiente a la mezcla conformada por $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + Microdacyn y al grupo E correspondiente a la mezcla de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + extracto de ajo, mostrando halos de inhibición mayores y similares entre sí en comparación de los obtenidos con los demás vehículos y sus controles.

Adicional al análisis antimicrobiano se realizó una prueba de hemólisis para evaluar el potencial efecto citotóxico de cada uno de las mezclas y se obtuvo el porcentaje de cada uno de ellos, en donde el grupo A correspondiente a la mezcla de $(\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{NaOCl}$ al 5.25 %) presentó un porcentaje de hemólisis del 63.6 %, el grupo B correspondiente a la mezcla de $(\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{Microdacyn})$ un 39.1 %, el grupo C correspondiente a la mezcla de $(\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{Mepivacaína (Scandonest 2 \% Special)})$ 37.8 %, el grupo D correspondiente a la mezcla de $(\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{SS})$ 37 % y el grupo E correspondiente a la mezcla de $(\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{extracto de ajo})$ presentó un 41.5 % de hemólisis.

En este estudio se evaluó el efecto antibacteriano del hidróxido de calcio sin adicionarlo a un vehículo, obteniéndose halos de inhibición con una media de 11.6 mm, lo que confirma su efecto antibacteriano. Esto se atribuye a los iones hidroxilo, como se ha reportado en la literatura, ya que los iones calcio e hidroxilo se difunden a través de la membrana bacteriana, alterando su integridad (10,23). Por otro lado en las pruebas de toxicidad presento una hemólisis del 37 % si bien representa un grado de citotoxicidad no se acerca al alto grado que representa el detergente para células con un 100 %, es decir, no presenta el mismo grado de hemólisis, sin embargo no fue tan inocuo a la SS ya que para ambos mostró diferencias estadísticamente significativas. Debido a estos resultados, la elección del vehículo para adicionarse al hidróxido de calcio será recomendable aquel que no aumente el porcentaje de citotoxicidad.

La mezcla de hidróxido de calcio con NaOCl al 5.25 % es una de las más utilizadas para medicaciones intraconducto en endodoncia debido a su efecto antibacteriano, por lo tanto fue utilizada como referencia de actividad máxima. En este estudio, se evaluó y se confirmó su capacidad antibacteriana, al mostrar halos de inhibición de gran tamaño presentando una media de 18.27 mm a las 24 h, 20.63 mm a las 48h y 20.86 mm a las 72h. Por otro lado en las pruebas de toxicidad se obtuvo porcentaje de hemólisis del 63.6 %.

Sabemos que tanto el hipoclorito de sodio como el hidróxido de calcio presentan una notable actividad antimicrobiana, cada uno generando halos de inhibición significativos. Al realizar la mezcla de ambas sustancias, observamos un aumento en el tamaño de estos halos de inhibición. Sin embargo, este aumento no fue tan significativo como esperábamos, ya que no se incrementó 2 o 3 veces su tamaño, como podría esperarse de una combinación de agentes con actividad antimicrobiana. Aunque no observamos un efecto sinérgico claro, tampoco hubo indicios de un antagonismo entre ambas sustancias. Es importante destacar que la mezcla no parece interferir con la actividad antimicrobiana individual de cada componente.

Por otra parte, en un trabajo previo realizado en la especialidad de endodoncia en la clínica odontológica de la UABC en 2018, se trató a órganos dentarios extraídos que fueron infectados previamente con *E. faecalis*. Seis de estos dientes fueron irrigados con solución de Microdacyn, mientras que otros seis fueron irrigados con hipoclorito de sodio al 2.5 %. Los resultados mostraron que no había una diferencia estadísticamente significativa entre Microdacyn y el hipoclorito de sodio al 2.5 %, sugiriendo que Microdacyn es una opción viable para el tratamiento de conductos radiculares (39). En otro estudio con un enfoque diferente, Jiménez *et al.*, en 2021, utilizaron la técnica de difusión en agar para medir los halos de inhibición bacteriana, utilizando la solución OxOral® (solución de superoxidación) en combinación con hidróxido de calcio. Ellos obtuvieron un efecto microbicida contra *E. faecalis* (26). Basándonos en estos antecedentes, evaluamos la mezcla de Ca(OH)_2 + Microdacyn.

Nuestros hallazgos fueron consistentes con los estudios citados anteriormente, mostrando una diferencia estadísticamente significativa con un valor de $P = 0.0102$ con halos de inhibición superiores a sus contrapartes a las 24 horas frente a una cepa clínica de *E. faecalis*. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas a las 48 y 72 al compararlos con la mezcla del grupo A (Ca(OH)_2 + NaOCl al 5.25 %) lo que sugiere que ambas mezclas presentan una eficacia microbicida similar en estos tiempos.

Como se mencionó, en este estudio se obtuvieron resultados similares a estudios anteriores, aunque se emplearon metodologías distintas: uno se realizó en órganos dentarios extraídos y otro mediante difusión en agar, pero con una solución de superoxidación diferente. Esto confirma que la mezcla de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + Microdacyn es efectiva contra la bacteria *E. faecalis*.

El alto efecto antimicrobiano de la mezcla con Microdacyn puede atribuirse a un sinergismo entre ambas sustancias. Como se ha reportado en la literatura la solución de Microdacyn, al ser una sustancia con oxígeno activo, desnaturalizan proteínas de la pared bacteriana y de las cápsidas virales, mientras que el hidróxido de calcio tiene un pH alcalino que compromete las defensas bacterianas. Esta combinación crea un entorno hostil para las bacterias (40).

Por otro lado en las pruebas de toxicidad, se observó que la mezcla del grupo B compuesta por $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + Microdacyn presentó un porcentaje de hemólisis del 39.1 % lo cual es inferior al presentado por la mezcla del grupo A conformada por $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + NaOCl al 5.25 % con un 63.6 %, existiendo una diferencia estadísticamente significativa con un valor de $p < 0.0001$. Esto es relevante, ya que una menor hemólisis está asociada con una menor citotoxicidad.

Por otra parte en un estudio previo realizado por la especialidad en endodoncia en la UABC campus tijuana en el año 2023 se evaluó la actividad antimicrobiana del extracto de ajo al 100% a través de difusión en agar inoculado con una cepa de *E. faecalis*, mostrando resultados activos contra la bacteria en donde, no se encontró diferencia estadísticamente significativa al compararlo con el hipoclorito de sodio al 5.25 %. Ellos destacaron el extracto de ajo como una opción prometedora como irrigante de conductos radiculares debido a su efectividad antimicrobiana (41). Por otro lado Calisaya S. *et al.* en el 2023, realizaron un estudio que tenía como objetivo determinar la efectividad inhibitoria a través de difusión en agar del extracto de Ajo (*Allium Sativum*) y Té verde (*Camelia Sinensis*) sobre *Streptococcus Mutans* a las 24 y 48 horas, ellos encontraron que el mejor efecto inhibitorio lo registra el extracto de Ajo (*Allium Sativum*) al 100% a las 24 horas con un promedio de 15.67 mm (30).

Con estos antecedentes, se decidió utilizar el extracto de ajo como vehículo para el hidróxido de calcio durante la medicación entre sesiones.

Nuestros hallazgos fueron consistentes con los estudios anteriores. En donde al comparar los resultados de la actividad antimicrobiana de la mezcla de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + NaOCl al 5.25 % (grupo A) con la mezcla de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + extracto hidroetanólico de *Allium sativum* (grupo E), no se presentaron diferencias estadísticamente significativas en su actividad antimicrobiana, dado que ambas exhibieron halos de inhibición de tamaño comparable, con una media de 20.86 mm y 20.56 mm, respectivamente. En lo que respecta a la hemólisis, el extracto de ajo presentó un porcentaje del 41.5 %, en comparación con el 63.6 % de hemólisis de la mezcla con hipoclorito de sodio. El análisis estadístico arrojó que existen diferencias estadísticamente significativas con un valor de $P < 0.0001$ en cuanto a la hemólisis del grupo A con respecto al grupo E. Esto sugiere que, aunque ambas mezclas tienen una actividad antimicrobiana comparable, la mezcla con hipoclorito de sodio puede ser más citotóxica debido a su mayor porcentaje de hemólisis.

Adicionalmente, el análisis estadístico reveló que no había diferencias estadísticamente significativas en la actividad antimicrobiana entre la mezcla de hidróxido de calcio con extracto de ajo (grupo B) y la mezcla con Microdacyn (grupo B). Sin embargo, se observó una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la hemólisis, con un valor de $P < 0.0001$. Esto indica que la mezcla con solución de superoxidación tiene una menor citotoxicidad.

Se puede destacar que ambos estudios citados previamente realizaron una difusión de agar, aunque uno de ellos utilizó una cepa bacteriana diferente, *Streptococcus Mutans*, en ambos casos, obtuvieron halos de inhibición bacteriana para el extracto de ajo. Similarmente, en este estudio se confirma la actividad antimicrobiana de la mezcla de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + extracto hidroetanólico de *Allium sativum*.

Se sugiere que existe un sinergismo en la mezcla de hidróxido de calcio con extracto de ajo, en donde la combinación de la acción antimicrobiana asociada a la alicina tiene la capacidad de desorganizar la estructura de la membrana celular bacteriana,

permitiendo una mejor penetración del hidróxido de calcio en las estructuras bacterianas y los biofilms (28,29,31). También se sugiere que la mezcla de hidróxido de calcio con extracto de ajo puede reducir la inflamación apical debido a las propiedades antiinflamatorias del ajo.

Adicionalmente, se evaluó la mezcla del grupo D compuesta por Ca(OH)_2 + SS, si bien, presentó halos de inhibición menores que otros grupos, con una media de 19.26 mm a las 72 horas, logró detener la viabilidad de la cepa clínica de *E. faecalis*, confirmando su efectividad como una opción viable para el tratamiento. Estos resultados fueron similares a los reportados por Jiménez *et al.*, en 2021, donde, mediante la técnica de difusión en agar, también obtuvieron halos de inhibición bacteriana al mezclar hidróxido de calcio con solución salina, aunque de menor tamaño (26). En relación a la hemólisis, la mezcla del grupo D (Ca(OH)_2 + SS) mostró el menor porcentaje con respecto a todas las mezclas estudiadas, con solo un 37% de hemólisis. Este porcentaje refleja el efecto citotóxico del polvo de hidróxido de calcio, mientras que la solución salina mantiene un 0% de citotoxicidad.

Es destacable que, similar al estudio citado anteriormente, esta mezcla, a pesar de presentar halos de menor tamaño, logró el objetivo antimicrobiano contra la cepa de *E. faecalis*, resaltando que esta mezcla tiene el menor porcentaje de citotoxicidad, lo cual la hace viable y recomendable para su uso como medicación intraconducto. El efecto antibacteriano de esta mezcla se debe a que la solución salina no afecta el pH del hidróxido de calcio, permitiendo su actividad microbicida. Los halos de inhibición de menor dimensión se explican por la falta de actividad antimicrobiana de la solución salina, que no presenta propiedades antibacterianas que puedan complementar la acción del hidróxido de calcio (24).

Por último se realizó la comparación entre la mezcla de Ca(OH)_2 + NaOCl al 5.25 % (grupo A) con respecto a la mezcla conformada por Ca(OH)_2 + Mepivacaína (Scandonest 2 % Special) (grupo C). Se decidió utilizar este anestésico local debido a que logra un efecto anestésico rápido y eficaz, que nos asegura la posibilidad de realizar el tratamiento de endodoncia sin algún problema, es bien tolerada por la

mayoría de los pacientes, tenemos fácil acceso a ella tanto en la clínicas escolares como en la práctica privada, además de tener un costo accesible. Similar a los resultados de la mezcla del grupo D, se logro detener viabilidad de la bacteria *E. faecalis* con halos de inhibición con una media de 18.73 mm a las 72 horas. Esta cifra es ligeramente inferior a la media obtenida por la mezcla con SS, con 19.26 mm Sin embargo el análisis estadístico arrojo que existe una diferencia estadísticamente significativa al compararla con la mezcla del grupo A (Ca(OH)_2 + NaOCl al 5.25 %) con un valor de $P < 0.0001$. Estos resultados indican que, aunque la mezcla no obtuvo los halos inhibición bacteriana con mayor dimensión, sigue siendo efectivas y podrían considerarse en el tratamiento de conductos radiculares. En cuanto a su porcentaje de hemólisis estas mezclas presentaron valores inferiores a las demás con un porcentaje del 37.8 % . Zolak *et al.* en el año 2003 evaluaron una combinación similar con un enfoque distinto, centrado en la alteración del pH al asociar el hidróxido de calcio con anestésicos locales como el clorhidrato de prilocaína (60 mg) y el clorhidrato de articaína (40 mg). Recomendaron esta mezcla ya que, el pH se mantiene en niveles alcalinos durante al menos 7 días. Este pH elevado es crucial para el efecto antimicrobiano, ya que destruye la membrana celular de las bacterias debido a su naturaleza alcalina (22).

En nuestro estudio, aunque utilizamos un anestésico local diferente, todos los anestésicos evaluados comparten un grupo amida en su estructura. A pesar de que los anestésicos presentan un pH ácido, este parece no alterar el pH alcalino del hidróxido de calcio, lo que favorece su efecto destructivo en las membranas celulares bacterianas y las estructuras proteicas. Por lo tanto, la acción microbicida del hidróxido de calcio se mantiene efectiva. Los halos de inhibición de menor dimensión a los demás evaluados, se explican por la falta de actividad antimicrobiana de la solución anestésica al igual que la solución salina, estas soluciones no presentan propiedades antibacterianas que puedan complementar la acción del hidróxido de calcio (22,24).

En resumen, estos resultados sugieren que todas las mezclas estudiadas presentan actividad antimicrobiana contra la bacteria *E. faecalis*. No obstante, las mezclas del grupo A compuesto por Ca(OH)_2 + NaOCl al 5.25 %, el grupo B (Ca(OH)_2 + solución de superoxidación) y por último el grupo E (Ca(OH)_2 + extracto hidroetanólico de *Allium sativum*) mostraron una mayor actividad antimicrobiana, con halos de inhibición más grandes y similares entre sí, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellas. Esto es importante ya que, al evaluar el efecto citotóxico, sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas en comparación con sus controles y entre los propios grupos. En este caso, la mezcla del grupo B compuesta por Ca(OH)_2 + solución de superoxidación (Microdacyn) presentó el menor porcentaje de hemólisis entre las tres, con un 39.1 % de hemólisis.

Sin embargo, las mezclas del grupo D compuesta por Ca(OH)_2 + SS y el grupo C (Ca(OH)_2 + mepivacaína (Scandonest 2 % Special) presentaron un porcentaje de hemólisis menor, lo que indica un menor efecto citotóxico. Estas mezclas también mostraron un efecto antibacteriano con halos de inhibición superiores que los del grupo control positivo y negativo, pero inferiores a las demás mezclas evaluadas en este estudio.

Para estudios futuros, se recomienda investigar cada vehículo por separado, así como el hidróxido de calcio puro. Esto permitirá determinar si existe un sinergismo, antagonismo, o si son las moléculas individuales las que mantienen la actividad antimicrobiana.

Esta investigación proporciona una comparación detallada entre diferentes vehículos y su efecto antibacteriano y citotóxico, ofreciendo datos relevantes que pueden orientar la práctica clínica. Se han explorado combinaciones poco estudiadas, como la mezcla de hidróxido de calcio con Microdacyn, y nuevas combinaciones, como la mezcla con extracto hidroetanólico de *Allium sativum* (ajo). Estas mezclas presentan una actividad antimicrobiana comparable a la del hipoclorito de sodio, pero con una menor citotoxicidad, lo que favorece la seguridad y eficacia del tratamiento. Así, se determinan como alternativas terapéuticas viables

para el tratamiento de infecciones endodónticas, proporcionando una base para futuras investigaciones.

XI. CONCLUSIONES

1. Se logró evaluar el efecto microbicida de las distintas mezclas de hidróxido de calcio asociado a diversos vehículos (NaOCl al 5.25 %, solución de superoxidación (microdacyn), mepivacaína (Scandonest 2 % Special), solución salina y extracto hidroetanólico de *Allium sativum* (ajo) mediante la técnica de inhibición de halos en agar gelosa-sangre 5 % inoculado con una cepa clínica de *E. faecalis*. Se calcularon las medias de los halos de inhibición bacteriana obtenidos para cada mezcla:

24h Grupo A: 18.27 mm, Grupo B: 19.67 mm, Grupo C: 14.53 mm, Grupo D: 14.6 mm, Grupo E: 19.3 mm, control (+) : 16.2 mm, Control (-): 0 mm

48 h Grupo A: 20.63 mm, Grupo B: 21 mm, Grupo C: 18.4 mm, Grupo D: 18.97 mm Grupo E: 19.83 mm, control (+) : 16.2 mm, Control (-): 0 mm

72h Grupo A: 20.86 mm, Grupo B: 21.4 mm, Grupo C: 18.73 mm, Grupo D: 19.26 mm Grupo E: 20.56 mm, control (+) : 16.2 mm, Control (-): 0 mm

2. El grupo A correspondiente a la mezcla $\text{Ca(OH)}_2 + \text{NaOCl}$ al 5.25 % fue utilizada como referencia de actividad máxima, se logró comparar con la actividad microbicida de cada una de las mezclas estudiadas y se obtuvo que, para para la comparación de la actividad microbicida del grupo A ($\text{Ca(OH)}_2 + \text{NaOCl}$ al 5.25 %) respecto al grupo E ($\text{Ca(OH)}_2 + \text{Extracto de ajo}$) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, lo que sugiere que ambas mezclas son efectivas contra la viabilidad de la cepa clínica de *E. faecalis*. Por otra parte a las 48 y 72 h no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar la mezcla A conformada por ($\text{Ca(OH)}_2 + \text{NaOCl}$ al 5.25 %) con respecto a la mezcla B conformada por ($\text{Ca(OH)}_2 + \text{Microdacyn}$), en cuanto a su efecto antimicrobiano sobre la cepa clínica de *E. faecalis*. Esto nos indica que ambas mezclas son efectivas al ser utilizada como medicación intraconducto.

3. Mediante la técnica de hemólisis, se determinó la citotoxicidad de las combinaciones de hidróxido de calcio con diferentes vehículos, obteniendo los siguientes los porcentajes:

Grupo A correspondiente a la mezcla de $(\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{NaOCl}$ al 5.25 %): 63.6 %, grupo B correspondiente a la mezcla de $(\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{Microdacyn})$: 39.1 %, grupo C correspondiente a la mezcla de $(\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{Mepivacaína (Scandonest 2 \% Special)})$: 37.8 %, grupo D correspondiente a la mezcla de $(\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{SS})$: 37 %, grupo E: correspondiente a la mezcla de $(\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{extracto de ajo})$: 41.5 % de hemólisis.

El control positivo (detergente para células) se tomó como referencia del 100 % de hemólisis , mientras que el control negativo (SS) se utilizó como referencia con el 0 % de hemólisis.

4. Al comparar la mezcla del grupo A, que contenía $(\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{NaOCl}$ al 5.25%), con la del grupo B, que contenía $(\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{Microdacyn})$, se obtuvo una actividad microbicida similar, resaltando que la mezcla B mostró un menor grado de citotoxicidad. Esto es prometedor, ya que produce un efecto comparable al de la mezcla del grupo A pero con menor citotoxicidad, lo que la hace adecuada como medicación intraconducto. Asimismo, al comparar la mezcla del grupo A compuesta por $(\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{NaOCl}$ al 5.25 %) con la mezcla del grupo E compuesta por $(\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{extracto de ajo})$, se obtuvo una actividad antimicrobiana equivalente. Sin embargo, cabe señalar que la mezcla del grupo E presentó una menor citotoxicidad, lo cual es beneficioso para el tratamiento endodóntico.
5. La mezcla del grupo C, que contenía $(\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{Mepivacaína (Scandonest 2 \% Special)})$, y la mezcla del grupo D, formada por $(\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{SS})$, mostraron una actividad microbicida similar, aunque inferior a las otras mezclas evaluadas en este estudio. Sin embargo, es importante destacar que estas dos mezclas presentaron el menor efecto citotóxico, lo cual las hace aconsejables para su uso como medicación entre sesiones.

6. Contar con datos precisos permite tomar decisiones más informadas respecto al tratamiento del paciente. Los resultados de esta investigación proporcionan una base sólida para elegir las mezclas más adecuadas durante la medicación intraconducto, demostrando que no se antagonizan y mantienen su actividad microbicida, lo que favorece el éxito del tratamiento endodóntico. Además, se identificaron las mezclas menos citotóxicas para las células humanas, lo que es crucial para la seguridad del paciente. No obstante, se recomiendan estudios futuros para profundizar en estos hallazgos y explorar detalladamente los efectos de estas combinaciones.

7. Con base a lo anterior se descarta la hipótesis de trabajo y se acepta la hipótesis nula “Al menos una de las combinaciones del hidróxido de calcio con diferentes vehículos, como solución de superoxidación (Microdacyn), mepivacaína (Scandonest 2 % Special), solución salina y extracto hidroetanólico de *Allium sativum* (ajo), mostrará diferencias estadísticamente significativas en comparación con la mezcla de hidróxido de calcio e hipoclorito de sodio al 5.25 %, con un nivel de significancia de al menos ($P < 0.05$), ya sea en relación a la actividad antimicrobiana o en su efecto citotóxica frente a una cepa clínica de *E. faecalis*.”.

XII. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios *in-vitro* con distintas cepas bacterianas; en donde se simulen las condiciones del conducto radicular.
- Investigar cada vehículo por separado, así como el hidróxido de calcio puro. Esto permitirá determinar si existe un sinergismo, antagonismo, o si son las moléculas individuales las que mantienen la actividad antimicrobiana.
- Realizar estudios *in vivo*: para evaluar la eficacia de las mezclas evaluadas en condiciones clínicas.
- Realizar más estudios sobre la mezcla de hidróxido de calcio con extracto acuoso de ajo para evaluar sus beneficios antiinflamatorios para tratar la periodontitis apical.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Soares I, Goldberg F. Endodoncia: técnicas y fundamentos. Buenos Aires, Argentina: Medica Panamericana; 2012.
2. Cohen S, Hargreaves K. Vías de la pulpa. Elsevier Science; 2011.
3. Canalda C, Brau A. Endodoncia: técnicas clínicas y bases científicas. Barcelona, España: Elsevier; 2014.
4. Goldman M, White R, Moser C, Tenca J. A Comparison of Three Methods of Cleaning and Shaping the Root Canal In Vitro. Vol. 14. 1988.
5. Pérez E, Burguera E, Carvallo M. Tríada para la limpieza y conformación del sistema de conductos radiculares. Acta Odontol Venez. 2003;
6. Svensater G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. Endod Topics. 2004 Nov;9(1):27–36.
7. Zambrano S, Salcedo D, Petkova M, Ventocilla M. Biofilm en endodoncia: una revisión. Odontología Sanmarquina. 2017 Jan 29;19(2):45.
8. Calderón B, Reyes H, García J, Rodríguez J. Análisis de las características morfofuncionales y estructurales del biofilm presente en conductos radiculares. Revisión de la literatura. Endodoncia actual. 2019;
9. Alghamdi F, Shakir M. The influence of Enterococcus faecalis as a dental root canal pathogen on endodontic treatment: A systematic review. Cureus. 2020 Mar 13;
10. Siqueira J, Guimarães T, Rôças I. Effects of chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite and intracanal medication with calcium

- hydroxide on cultivable bacteria in infected root canals. *J Endod.* 2007 Jul;33(7):800–5.
11. Evans M, Craig J, Khemaleelakul S, Xia T. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. 2003.
 12. Zancan R, Vivan R, Milanda M, Weckwerth P, De Andrade F, Ponce J, et al. Antimicrobial activity and physicochemical properties of calcium hydroxide pastes used as intracanal medication. *J Endod.* 2016 Dec 1;42(12):1822–8.
 13. Jiménez L, Juárez M, Ferreira F. Capacidad de penetración y difusión de la medicación, intraconducto en túbulos dentinales, conductos laterales e istmos. Una revisión sistemática. *Int j odontostomatol.* 2021;
 14. Muñoz P, Arteaga S, Alvarado A. Observaciones acerca del uso del hidróxido de calcio en la endodoncia. 2018;4:352–61.
 15. Rodríguez S. Importancia del hidróxido de calcio como medicamento intraconducto en endodoncia. A propósito de un caso clínico. *Gaceta Dental.* 2009;
 16. Mohammadi Z, Shalavi S, Yazdizadeh M. Antimicrobial activity of calcium hydroxide in endodontics: A review. *Chonnam Med J.* 2012;48(3):133.
 17. Fava L, Saunders W. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. 1999.
 18. Figdor D. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. Vol. 24, *International Endodontic Journal* {199}. 1991.
 19. Silva F, Andrade L, Lainfiesta J. Comparación del hidróxido de calcio como medicamento intraconducto, utilizando vehículos viscosos y acuosos. Estudio in vitro. 2003.

20. Becerra L, Becerra P, Moreno G. Capacidad de difusión del ión calcio a través de la dentina radicular utilizando cuatro tipos de vehículos: anestesia, hidróxido de calcio Calcifar®, glicerina y polietilenglicol. *UstaSalud*. 2018 Mar 14;3(2):77.
21. Özcelik B, Tasman F, Ogan C. A comparison of the surface tension of calcium hydroxide mixed with different vehicles. *J Endod*. 2000;
22. Zolak H, Öztan M. The pH changes of four different calcium hydroxide mixtures used for intracanal medication. *J Oral Rehabil*. 2003;30:436–9.
23. Estrela C, Pesce H. Chemical analysis of the liberation of calcium and hydroxyl ions from calcium hydroxide pastes in connective tissue in the dog--Part I. *Braz Dent J*. 1996;7(1):41–6.
24. Safavi K, Nakayama T. Influence of mixing vehicle on dissociation of calcium hydroxide in solution. *J Endod*. 2000;26(11).
25. Cárdenas Á, Sánchez S, Tinajero C, González V, Baires L. Hipoclorito de sodio en irrigación de conductos radiculares: Sondeo de opinión y concentración en productos comerciales [Internet]. Vol. 16. 2012. Available from:
www.medigraphic.org.mxhttp://www.medigraphic.com/facultadodontologiaunam
26. Jimenez H, Nakagoshi M, Nakagoshi S, Urrutia V, De La Garza M, Solis J, et al. Antimicrobial effect of calcium hydroxide combined with electrolyzed superoxidized solution at neutral pH on *Enterococcus faecalis* growth. *Biomed Res Int*. 2021;2021.
27. Durán H. Soluciones de superoxidación y su evolución tecnológica. *Foro Nacional de Investigación y Clínica Médica*. 2010;
28. Mehta N, Gupta A, Mahesh S, Abraham D, Singh A, Jala S, et al. Comparative evaluation of antibacterial efficacy of *Allium sativum* extract, aqueous ozone,

- diode laser, and 3% sodium hypochlorite in root canal disinfection: An in vivo study. *Journal of Conservative Dentistry*. 2020;23(6):577.
29. Ramírez H, Castro L, Martínez E. Artículos de revisión: Efectos terapéuticos del ajo (*Allium Sativum*). 2016.
 30. Calisaya S, Coaquira N, Padilla T, Maque S. Efecto antibacteriano del extracto de ajo (*Allium Sativum*) y té verde (*Camelia Sinensis*) sobre *Streptococcus mutans* a las 24 y 48 horas en placa bacteriana bucal. *Revista Científica Especialidades Odontológicas UG*. 2023 Jan 4;
 31. Ojeda M, Beltrán R. Efecto antimicrobiano in vitro de los extractos de *Allium sativum* y *Zingiber officinale* frente a *Staphylococcus aureus*. *UCV-SCIENTIA*. 2019 Jan 10;10(2).
 32. Munayco E, Moromi H. Efecto antimicrobiano del extracto hidroalcohólico de *allium sativum* sobre cepas estándares de la cavidad bucal. *Odontología Sanmarquina*. 2014 May 14;16(2):21.
 33. Blanscet M, Tordik P, Goodell G. An agar diffusion comparison of the antimicrobial effect of calcium hydroxide at five different concentrations with three different vehicles. *J Endod*. 2008 Oct;34(10):1246–8.
 34. Schwalbe R, Steele L, Goodwin A. Antimicrobial susceptibility testing protocols. 2007.
 35. Freifelder D. Técnicas de bioquímica y biología molecular. Editorial Reverté. 1991. 650 p.
 36. Baraba A, Želježić D, Kopjar N, Mladinić M, Anić I, Miletić I. Evaluation of cytotoxic and genotoxic effects of two resin-based root-canal sealers and their components on human leucocytes in vitro. *Int Endod J*. 2011 Jul;44(7):652–61.

37. García-Huertas P, Pabón A, Arias C, Blair S. Evaluación del efecto citotóxico y del daño genético de extractos estandarizados de *Solanum nudum* con actividad anti-*Plasmodium*. *Biomedica*. 2013;33(1):78–87.
38. Velmurugan N, Sandhya R. Root canal morphology of mandibular first premolars in an Indian population: a laboratory study. *Int Endod J*. 2009 Jan 16;42(1):54–8.
39. Caldera M. Eficacia antimicrobiana del hipoclorito de sodio y el agua superoxidada en tratamiento de conductos en presencia de enterococos *faecalis*. Estudio in vitro. 2018.
40. Mena E. Efecto antimicrobiano de microdacyn 60®, oxoral® e hipoclorito de sodio al 5.25% en bacterias anaerobias. 2012.
41. Camacho KV. Efecto antimicrobiano y citotoxicidad de extractos acuosos de *hibiscus sabdariffa* (flor de jamaica) y *allium sativum* (ajo) para su utilización como irrigante en endodoncia. 2023.

ANEXOS

72 h	Diferencia Estadísticamente significativa	Resumen	Valor de P
NaOCl 5 % vs. SS	si	****	< 0.0001
A vs. NaOCl 5 %	si	****	< 0.0001
B vs. NaOCl 5 %	si	****	< 0.0001
C vs. NaOCl 5 %	si	****	< 0.0001
D vs. NaOCl 5 %	si	****	< 0.0001
E vs. NaOCl 5 %	si	****	< 0.0001
Ca(OH) ₂ vs. NaOCl 5 %	si	****	< 0.0001
A vs. SS	si	****	< 0.0001
B vs. SS	si	****	< 0.0001
C vs. SS	si	****	< 0.0001
D vs. SS	si	****	< 0.0001
E vs. SS	si	****	< 0.0001
Ca(OH) ₂ vs. SS	si	****	< 0.0001
A vs. B	no	ns	0.8385
A vs. C	si	****	< 0.0001
A vs. D	si	**	0.0020
A vs. E	no	ns	0.9921

Mezclas hidróxido + vehículo	1er toma (abs)	2da toma (abs)	MEDIA
A (mezcla con hipoclorito)	2.367	2.365	2.366
B (mezcla con microdacyn)	1.471	1.47	1.47
C (mezcla con anestésico)	1.426	1.418	1.422
D (mezcla con SS.) BASE	1.393	1.391	1.392
E (mezcla con ajo)	1.558	1.557	1.557
Control + (detergente)	0.035	0.036	0.0355
Control - (solución)	0.037	0.036	0.0365

ss		CaOH		ss		CaOH	
%hemolisis	%hemolisis	%hemolisis	%hemolisis	% bio	% bio	% bio	% bio
63.6016 371	63.5470 668	26.6030 014	26.5484 311	36.3983 629	36.4529 332	73.3969 986	73.4515 689
39.1541 61	39.1268 759	2.15552 524	2.12824 011	60.8458 39	60.8731 241	97.8444 748	97.8717 599
37.9263 302	37.7080 491	0.92769 441	0.70941 337	62.0736 698	62.2919 509	99.0723 056	99.2905 866
37.0259 209	36.9713 506	0	- 0.02728 51	62.9740 791	63.0286 494	100	100.027 285
41.5279 673	41.5006 821	4.50204 638	4.50204 638	58.4720 327	58.4993 179	95.4979 536	95.4979 536

Agente	Toxicidad (hemolisis)		Biocompatibilidad	
	SS	Basa caOH	SS	Basa caOH
Detergente	100%	100	100	0
SS	0%	10000%	100%	0
A (hipoclorito)	63.6	26.6	36.4	73.4
B (microdacyn)	39.1	2.1	60.9	97.9
C (anestésico)	37.8	0.8	62.2	99.2
D (solución salina)	37.0	0.0	63.0	100.0
E (ajo)	41.5	4.5	58.5	95.5

toxicidad
del
Hidroxido
37%

$$\% \text{ Hemolisis} = \frac{\text{Muestra} - \text{Solución Isotónica (Hemolisis Basal)}}{\text{Tween (Maxima Hemolisis) Hipotónico} - \text{Sol. Isotónica}} \times 100$$