

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA



**“EFECTO ANTIMICROBIANO *IN VITRO* DEL ACEITE ESENCIAL DE
MATRICARIA CHAMOMILLA Y *CURCUMA LONGA* COMBINADOS CON
CAOH₂ FRENTE AL *ENTEROCOCCUS FAECALIS* ATCC 29212”**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE CIRUJANO DENTISTA

AUTOR: Bach. León Gallardo, Milagros Isabel

ASESOR: Dr. González Cabeza, Guillermo José

COASESORA: Dra. Espinoza Salcedo, María

TRUJILLO – 2019

DEDICATORIA

A Dios, por haberme dado la vida, por guiarme y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A mi madre, por ser el pilar más importante en mi vida, por demostrarme día a día su infinito amor y por darme sus sabios consejos para seguir en pie en mis sueños y metas a lo largo del tiempo.

A mi padre, por ser mi modelo a seguir y por demostrarme siempre su amor y apoyo incondicional alentándome a seguir adelante en los momentos más difíciles.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la vida y por haberme bendecido con mi familia y las personas que siempre estuvieron en las buenas y malas, por último, por permitirnos vivir nuestro día a día con salud, unión y amor.

A mis padres Carlos y Elda, por su apoyo incondicional, consejos, comprensión, amor, sacrificios, ayuda y por siempre estar presentes en cada paso voy dando a lo largo de mi vida. Ustedes son mi principal motivación.

A mis asesores Dr. José González y la Dra. María Espinoza por el apoyo constante, su disposición de tiempo, la asesoría, la comprensión y sobre todo mucha paciencia que me brindaron a lo largo de la ejecución de este proyecto.

A Julyo, por su cariño y apoyo incondicional.

A Sarita, Christian, y Alex por su apoyo y sus consejos durante los ensayos realizados en el laboratorio.

Gracias a todos.

RESUMEN

Objetivo: Comparar el efecto antimicrobiano *in vitro* del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* y *Curcuma longa* embebidos con CaOH_2 frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Material y Método: El estudio fue longitudinal, comparativo y experimental; cada aceite esencial estuvo conformado por 3 repeticiones para el ensayo de espectrofotometría la muestra fue de 152 tubos y para el ensayo de difusión fue de 24 placas. Para determinar la eficacia antimicrobiana de cada aceite esencial se decidió usar 7 diferentes concentraciones : 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13% y 1,56% además del grupo control (Agua destilada + hidróxido de calcio). Para la comparación del efecto se aplicaron las pruebas estadísticas Anova y Duncan.

Resultado: El efecto antimicrobiano de las combinaciones de los aceites esenciales con CaOH_2 a través de los dos métodos se observó que por espectrofotometría las concentraciones más resaltantes fueron al 100 % (0.73 nm), 25%(0.95nm) y 3,13% (1.60 nm) del aceite de *Matricaria chamomilla*. Y por el método de difusión, según Duncan las concentraciones ubicadas en el primer grupo fueron: al 100% (1.43 mm) del aceite de *Curcuma longa*, al 100% (1,67 mm) del aceite de *Matricaria chamomilla* y el grupo control (CaOH_2 + agua destilada) (1.53 mm).

Conclusión: El aceite esencial de *Matricaria chamomilla* al combinado con hidróxido de calcio fue la más eficaz .

PALABRAS CLAVE: *Enterococcus faecalis*, *matricaria chamomilla*, *curcuma longa*.

ABSTRACT

Objective: To compare the in vitro antimicrobial effect of the essential oil of *Matricaria chamomilla* and *Curcuma longa* embedded with CaOH₂ against *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Material and Method: The study was longitudinal, comparative and experimental; each essential oil consisted of 3 repetitions for the spectrophotometry test the sample was 152 tubes and for the diffusion test was 24 plates. To determine the antimicrobial efficacy of each essential oil, it was decided to use 7 different concentrations: 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.13% and 1.56% in addition to the control group (Water distilled + calcium hydroxide). For the comparison of the effect, the Anova and Duncan statistical tests were applied.

Result: The antimicrobial effect of the combinations of essential oils with CaOH₂ through the two methods showed that by spectrophotometry the most outstanding concentrations were 100% (0.73 nm), 25% (0.95nm) and 3.13% (1.60 nm) of *Matricaria chamomilla* oil. And by the diffusion method, according to Duncan, the concentrations located in the first group were: 100% (1.43 mm) of the *Curcuma longa* oil, 100% (1.67 mm) of the *Matricaria chamomilla* oil and the control group (CaOH₂ + distilled water) (1.53 mm).

Conclusion: The essential oil of *Matricaria chamomilla* when combined with calcium hydroxide was the most effective

KEY WORDS: *Enterococcus faecalis*, *Matricaria chamomilla*, *Turmeric*.

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN	7
1.	FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	13
2.	HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN	13
3.	OBJETIVO DE INVESTIGACIÓN	13
3.1	Objetivo General	13
3.2	Objetivos Específicos	13
II.	DISEÑO METODOLÓGICO	15
1.	Material De Estudio	15
1.1	Tipo De Investigación	15
1.2	Área De Estudio	15
1.3	Definición De La Población Muestral	15
1.3.1	Características Generales	15
1.3.1.1	Criterios De Inclusión...	16
1.3.1.2	Criterios De Exclusión...	16
1.3.1.3	Criterios De Eliminación	16
1.3.2	Diseño Estadístico De Muestreo	17
1.3.2.2	Unidad De Análisis	17
1.3.2.3	Unidad De Muestreo...	17
1.3.2.4	Tamaño Muestral...	18
1.3.3	Métodos De Selección	18
2	Métodos, Técnica E Instrumento De Recolección De Datos	18
2.3	Método	18
2.4	Descripción Del Procedimiento	18
2.5	Instrumento De Recolección De Datos	22

2.6	Variables...	23
3	Análisis Estadístico De La Información	23
III.	RESULTADOS	24
IV.	DISCUSIÓN...	33
V.	CONCLUSIONES	37
VI.	RECOMENDACIONES	38
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
	ANEXOS	45

I. INTRODUCCIÓN

El fracaso o el éxito de la terapia endodóntica depende de muchos factores como: el mal manejo de la técnica por parte del profesional, el incumplimiento del protocolo de desinfección, la anatomía compleja, la resistencia de los microorganismos entre otros. Dentro de las infecciones endodónticas se puede clasificarlas como infecciones primarias, secundarias y persistentes. En las infecciones primarias se caracterizan por la presencia de bacterias anaerobias gram-negativas, en este grupo se encuentran las piezas que aún no son sometidas a tratamiento pulpar pero tienen como diagnóstico necrosis pulpar que puede o no presentar rarefacción periapical. Entre los generos más predominante se encuentran los *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Lactobacillus*.¹

En las infecciones secundarias se caracterizan porque los microorganismos presentes no son parte de la microbiota oral, entre ellos están *Pseudomonas Aeroginosa*, *Escheria Coli*, *Stapylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* que son los más comunes. Y por último las infecciones persistentes pueden ser causadas por los microorganismos mencionados en las infecciones primarias y secundarias con la diferencia que estos microorganismos han resistido a los procedimientos de desinfección de los conductos.¹

Diversos estudios han encontrado que el *Enterococcus faecalis* se encuentra presente hasta en un 90% en infecciones secundarias y persistentes como la periodontitis apical, esto se debe a las propiedades que posee, entre esas se destacan la capacidad de penetración en los túbulos dentinarios, su excelente capacidad de adaptación, su capacidad de crecimiento en forma de biofilme o de una colonia única.^{1,2,3}

El término *Enterococcus* fue nombrado por primera vez en el año 1899 por Thiercelin, para describir un nuevo diplococo gram positivo de origen intestinal, en el mismo año, Mac Callun y Hasting publicaron un caso de endocarditis producida por el *Enterococcus faecalis*. Los *enterococcus* se puede encontrar en casos aislados de la cavidad bucal en donde pueden actuar como microorganismos patógenos en infecciones del tracto urinario y en casos de endocarditis subaguda; además pueden originar infecciones intraabdominales, pélvicas y en neonatales.⁴

El *Enterococcus faecalis* es uno de los organismos más comunes que se pueden cultivar a partir de los canales fallidos de la raíz que experimentan el retratamiento. Este microorganismo tiene la capacidad de sobrevivir a la preparación biomecánica, la medicación intracanal que finalmente resulta en la reinfección del conducto radicular obturado y cumple un rol importante en la presencia de lesiones periapicales en un rango de 24-77% como se mencionó anteriormente. Debido a sus factores de virulencia como la sustancia de agregación, citolusina, enzimas líticas, puede alterar las respuestas del huésped y por lo tanto es capaz de esforzarse mejor que otros microorganismos producto que es la única cepa aislada después de un tratamiento endodóntico infructuoso.⁵⁻⁸

Los métodos más efectivos para eliminar *Enterococcus faecalis* del conducto radicular son mediante el uso del hipoclorito de sodio, y clorhexidina en forma de gel o líquido actuando como irrigación.⁹ Sin embargo ambos irrigantes poseen desventajas. El hipoclorito de sodio tiene un desagradable sabor, posee alta toxicidad, no remueve el barro dentinario por completo y también ocasiona

irritación en los tejidos bucales. Caso contrario ocurre con la Clorhexidina que presenta una baja citotoxicidad y falta de mal sabor.¹⁰

A pesar de que la preparación biomecánica y el uso de irrigantes disminuyen la cantidad de bacterias es necesario que se aplique una sustancia que actúe como medicamento en los conductos para tratar de lograr la desinfección completa de estos. Dentro de los medicamentos de conducto tenemos el Hidróxido de calcio; que es actualmente el más utilizado. No obstante varios estudios demostraron que el *Enterococcus faecalis* es resistente a este medicamento, es por eso que actualmente la búsqueda de medicamentos a base de plantas naturales es una tendencia global.

El hidróxido de calcio es un polvo blanco que es consecuencia de la calcinación del carbonocálcico siendo su fórmula: $\text{CO}_3\text{Ca} = \text{CaO} + \text{CO}_2$. Este hidróxido tiene un importante papel en la endodoncia ya que por sus propiedades puede ser usado como medicación temporaria en los conductos a través de varias sesiones. Logrando un efecto antimicrobiano, asimismo necesita de un vehículo, que puede ser acuoso, viscoso o aceite.⁴

El hidróxido de calcio representa una herramienta en la terapéutica endodóntica por su gran propiedad como antiséptico y de crear condiciones para un ambiente favorable para la reparación histiográfica. Este material es el medicamento para los conductos radiculares más utilizado, no obstante tiene otras indicaciones como el tratamiento y posterior control en las reabsorciones radiculares control, perforaciones, para el tratamiento de fracturas transversales, e apicogénesis. Por lo que; presenta un alto poder bactericida y su acción antiséptica se debe por su pH, que es 12.4, cuyo fin es inhibir el desarrollo bacteriano.⁴

Por otro lado, una de las plantas que se estudiarán en el ensayo es la *Matricaria chamomilla*, que es una planta medicinal muy empleada por sus potentes efectos. La extracción de su aceite esencial se realiza a través del método de destilación de sus flores secas cuyo resultado final será un aceite con aroma muy dulce. Esta planta ha sido utilizada durante siglos por sus grandes beneficios y actúa como un antiinflamatorio, además posee otras propiedades como antioxidantes, astringente, analgésico, antibacteriano entre otros.¹¹

Desde hace mucho tiempo; en los países más pobres han optado por plantas medicinales como una opción alternativa a la terapéutica farmacológica debido a un bajo costo, a su escasa toxicidad y también la simplicidad en su manejo y elaboración.^{12, 13}

La planta *cúrcuma longa*, pertenece a la familia Zingiberaceae conocida como el palillo para condimentar las comidas. La cúrcuma presenta un amplio espectro además de sus propiedades biológicas como antiinflamatorio, antioxidante, anticancerígeno, antidiabético, antibacterial y antifúngico. Praveenkumar and col. Encontraron en un estudio in vitro que la Curcuma era eficaz contra microorganismos como *Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus casei*, *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia* Y además encontró que la curcumina, cuyo componente de su composición, fotoactivada tenía la capacidad de eliminar el biofilm de *E. faecalis* dentro de las paredes del conducto radicular.¹⁴

La Curcumina (diferuloylmetano) es el principal componente bioactivo amarillo de la cúrcuma presenta un amplio espectro de acciones biológicas y esto proporciona una base para explorar futuras aplicaciones endodónticas y en el campo de la odontología debido a sus propiedades.¹⁵⁻¹⁷

Este componente fue aislado por primera vez en 1815 por Vogel y Pelletier. Y su estructura química fue determinada en 1910 por J. Milobedzka en una extensa investigación sobre ella demostró un amplio espectro de efectos terapéuticos. Además de la curcumina, también se puede hallar otros componentes en dicha planta como los curcuminoides que son polifenoles con una fuerte función antioxidante.^{8, 18-20}

Por ende, se han realizado innumerables estudios farmacotológicos de la *Curcuma longa*, reconociendo que esta planta contiene flavonoides, polifenoles, glucósidos, taninos, triterpenos y otros compuestos con acción antioxidante, antiinflamatorio.^{21,22}

Coy et al (2013) evaluaron sobre la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de romero (*rosmarinus officinalis*), tomillo (*thymus vulgaris*) y cúrcuma (*curcuma longa*) de Colombia frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. En donde se concluyó que el aceite esencial de Curcuma fue el más activo frente al *Enterococcus faecalis*.²³

Prabhakar et al (2013) evaluaron la comparación de la eficacia antibacteriana del Hidróxido de calcio, Clorhexidina en gel y *Cúrcuma longa* como medicamento intracanal frente al *Enterococcus faecalis*, el estudio se dividió por grupos: grupo I (Hidróxido de Calcio), grupo II (Clorhexidina en gel), grupo III (*Curcuma Longa*) y grupo IV (solución salina) en donde se obtuvo una inhibición completa del *Enterococcus faecalis* por parte de la Clorhexidina seguido de un 64% del Hidróxido de Calcio y un 54% por parte de la *Cúrcuma Longa*.²⁴

Anuradha et al (2015) evaluaron la actividad antimicrobiana de 4 grupos: grupo A: 2% Clorhexidina, grupo B: 5% extracto de ajo, grupo C: 5% *Curcuma longa* y el grupo D: Agua destilada en contra del *Enterococcus faecalis* y se obtuvo que la Clorhexidina (25.3%) y la *Curcuma longa* (19.2%) obtuvieron mayores efectos inhibitorios al *Enterococcus faecalis*.²⁵

Dakshita et al (2017) evaluaron la desinfección de los túbulos dentinarios usando Clorhexidina gel 2%, Miel, Gel de Alóe Vera, *Curcuma Longa* , Gel Propolis y Hidróxido de Calcio en contra del *Enterococcus faecalis* en un estudio *in vitro* con intervalos de 1, 3 y 5 días. Los resultados fueron que la Clorhexidina obtuvo mayor efecto seguido por la *Curcuma longa*.²⁶

Desde hace muchos años el *Enterococcus faecalis* ha sido uno de los microorganismos más persistentes en los conductos radiculares no logrando su erradicación total en el tratamiento endodóntico. Como medicamento intracanal se usó el hidróxido de calcio y actualmente es el medicamento de elección. Es por eso que en la actualidad las investigaciones para la erradicación total de ese microorganismo se inclinaron hacia la medicina natural como una nueva alternativa terapéutica. Como es el caso de la *Curcuma longa*; que si bien es un ingrediente para la comida presenta propiedades favorables como antimicrobiano, antiinflamatorio, antioxidante y actividad antitumoral pero su posible uso como medicamento intracanal tiene limitadas referencias investigativas, lo mismo ocurre con el aceite esencial de *Matricaria chamomilla*.

Por todo ello; el presente estudio permite comprobar si existe efecto antibacteriano de ambas sustancias sobre el *Enterococcus faecalis*.

1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuál será el efecto antimicrobiano *in vitro* del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* y *Curcuma longa* combinados con CaOH₂ frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212?

2. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

Existe diferencia en el efecto antimicrobiano *in vitro* del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* y *Cúrcuma longa* embebidos con CaOH₂ frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

3. OBJETIVO DE INVESTIGACIÓN

3.3 Objetivo General

- Comparar el efecto antimicrobiano *in vitro* del CaOH₂ más aceite esencial de *Matricaria chamomilla* y el CaOH₂ más aceite esencial de *Curcuma longa* frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

3.4 Objetivos Específicos

- Determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* del CaOH₂ más aceite esencial de *Matricaria chamomilla* frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, por el método de espectrofotometría.

- Determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* del CaOH₂ más aceite esencial de *Matricaria chamomilla* frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, por el método de difusión.
- Determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* del CaOH₂ más aceite esencial de *Curcuma Longa* frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, por el método de espectrofotometría.
- Determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* del CaOH₂ más aceite esencial de *Curcuma Longa* frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, por el método de difusión.

II. DISEÑO METODOLÓGICO

1. Material De Estudio

1.1 Tipo De Investigación

Según el período en que se capta la información	Según la evolución del fenómeno estudiado	Según la comparación de poblaciones	Según la interferencia del investigador en el estudio
Prospectivo	Longitudinal	Comparativo	Experimental

1.2 Área De Estudio

El estudio se realizó en el laboratorio de Microbiología y Biotecnología del Departamento de Ciencias de la Universidad Privada Antenor Orrego filial Trujillo.

1.3 Definición De La Población Muestral

1.3.1 Características Generales

Estuvo constituido por el total de aplicaciones en agar Nutritivo con la cepa bacteriana del *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 con CaOH₂ + Agua Destilada, CaOH₂ + aceite esencial de *Cúrcuma longa* y CaOH₂ + Aceite esencial de *Matricaria chamomilla*, que cumplieron con los criterios de inclusión.

1.3.1.1 Criterios De Inclusión

- Tubo de plástico de 500 µl conteniendo la microdilución en caldo Lb 2X del microorganismo *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 con el volumen correspondiente de la dilución de los aceites esencial *Curcuma longa* y *Matricaria chamomilla* combinados con CaOH₂.
- Placa Petri conteniendo agar Nutritivo con el microorganismo *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 con el volumen correspondiente de la dilución de los aceites esenciales de *Curcuma longa* y *Matricaria chamomilla* combinados con CaOH₂.

1.3.1.2 Criterios De Exclusión

- Aplicación con agar Nutritivo con las cepas *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 contaminados.
- Placa Petri que presentó algún tipo de daño o alguna rajadura en su estructura o deshidratada.
- Tubo de plástico de 500 µl que presentó algún tipo de daño / rajadura en su estructura.

1.3.1.3 Criterios de Eliminación

- Tubo de plástico de 500 µl conteniendo la microdilución que haya sufrido contaminación durante la conservación.
- Placa Petri que haya sufrido contaminación durante el período de incubación.

1.3.2 Diseño Estadístico De Muestreo

1.3.2.1 Unidad De Análisis

Cada tubo de plástico de 500 µl conteniendo la microdilución en caldo LB 2X y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 con el volumen correspondiente de la dilución de los aceites esenciales de *Curcuma longa* y *Matricaria chamomilla* combinados con CaOH₂ cumpliendo con los criterios de selección establecidos.

Cada placa Petri conteniendo agar Nutritivo y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 con el volumen correspondiente de la dilución de los aceites esenciales combinado con CaOH₂.

1.3.2.2 Unidad De Muestreo

Cada uno de los tubos de plástico de 500 µl contiendo la microdilución en caldo LB2X y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 con el volumen correspondiente de la dilución de los aceites esenciales de *Curcuma longa* y *Matricaria chamomilla* combinados con CaOH₂.

Cada una de las placas Petri conteniendo agar Nutritivo y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 con el volumen correspondiente de la dilución de los aceites esenciales de *Curcuma longa* y *Matricaria chamomilla* combinados con CaOH₂.

1.3.2.3 Tamaño Muestral

Por las condiciones propias a un trabajo de investigación experimental y en las condiciones del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología del Departamento de Ciencias de la Universidad Privada Antenor Orrego. Se creyó conveniente 3 repeticiones por cada aceite Esencial que originó una muestra de 152 tubos de plástico de 500 µl entre las 00:00 horas y 24 horas, y 24 placas Petri.

1.3.3 Métodos de selección

Muestreo no probabilístico, por conveniencia.

2. Métodos, técnica e instrumento de recolección de datos

2.1 Método

Se realizó la observación de los sistemas de ensayos con sus respectivos controles (positivo y negativo).

2.2 Descripción del procedimiento

A. De la aprobación del proyecto

El primer paso para la realización del presente estudio de investigación fue la obtención del permiso para su ejecución, tras la aprobación del proyecto por parte de la Comisión de Investigación de la Escuela de Estomatología de la Universidad Privada Antenor Orrego . Resolución N° 0079-2019-FMEHU-UPAO (Anexo 1)

B. De la autorización para la ejecución

Una vez aprobado el proyecto se procedió a solicitar el permiso al Jefe del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología del Departamento de Ciencias de la Universidad Privada Antenor Orrego filial Trujillo. (Anexo 2)

C. Análisis de la determinación taxonómica de la *Curcuma longa*

Se entregaron las plantas de *Curcuma Longa* al “Herbarium Truxillense” de la Facultad de Ciencias Biológicas para la constancia de la determinación taxonómica del espécimen vegetal. En donde se describió la clase, subclase, superorden, orden, familia, género y especie. (Anexo 3).

D. Extracción del aceite esencial de *curcuma longa*

Se utilizó como materia prima la cúrcuma (palillo), que fue traída de la ciudad de Pucallpa, y se realizó lo siguiente: primero se efectuó la limpieza de la materia, eliminando con cuidado las raíces que cubren el rizoma. Posteriormente se continuó con el lavado para eliminar los últimos vestigios de tierra a través del agua potable a temperatura ambiente y luego se dejó escurrir y se le dejó un oreado por seis (06) horas para eliminar el exceso de humedad. Esto se realizó en forma manual con ayuda de cuchillos de acero inoxidable luego se realizó el secado natural bajo el sol y secado en la estufa por 2 semanas en el laboratorio. El tiempo total de secado comprendió entre una a dos semanas. Por último se trituró en un molino de martillo de malla intermedia. Para obtener un mayor número

de partículas que harán más eficiente la extracción al aumentar la superficie de contacto.

E. Obtención del aceite esencial de *Matricaria chamomilla*

Se decidió adquirir el producto del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* ya preparado de la marca SWISSJUST, posteriormente se le hizo un control de calidad y de esterilización.

F. Obtención de la cepa

Se usó un cultivo de la cepa del *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, la cual fue proporcionada por el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología del Departamento de Ciencias de la Universidad Privada Antenor Orrego.

G. Reactivación de la cepa

El vial criogénico (-30°) se descongeló inicialmente a 4° C durante al menos 4 horas; posteriormente se incubó a 37° C durante 4 horas más. Para la reactivación de la cepa se colocó en un tubo de ensayo conteniendo caldo LB estéril durante toda la noche.

H. Siembra

Se sembró 02 placas Petri con agar Nutritivo, las cuales fueron las placas Master, la técnica usada fue por estrías.

I. Preparación de inóculo

A partir de las placas Master se efectuó el overnight(cultivo de noche) en tubos de ensayo con caldo LB a 37°C por 18 a 24 horas.

J. Método de Microdilución en caldo para los aceites esenciales

Para el método de macrodilución de los aceites esenciales se comenzó primero con la dilución con agua para los respectivos aceites esenciales. Se dispuso de 7 tubos por cada aceite esencial en donde el primer tubo (tubo N° 0) tenía 2 ml de agua destilada y 2 ml de cada aceite, este tubo se agitó hasta conseguir homogeneidad, este paso se repitió en cada tubo hasta llegar al tubo N°7, cada tubo contenía 2 ml de la mezcla a excepción del último tubo que tuvo 4 ml. Posteriormente se esterilizaron las diluciones para el ensayo. Este procedimiento se repitió por cada aceite para determinar su concentración en cada tubo.

Posteriormente se usó la técnica de microdilución para el ensayo en donde se usaron placas de poliestireno con micropocillos que reemplazaron a los tubos, en cada posillo tenía el caldo lb 2x (150 ul); la dilución de cada aceite (150 ul) la cepa (50 ul) y CaOH (0.15 µg), en donde la lectura fue dos veces: la primera fue a las 00:00 horas y la segunda post 24 horas de incubación a 37°C. Además se contó con 3 grupos controles: (se leyó primero DO), 1) Aceite + LB 2x ,2) la cepa + LB 2x y 3) la cepa + Aceite , Que también estos controles fueron leídos dos veces en el Espectrofotómetro.

K. Determinación de Densidad Óptica

Las concentraciones que se ensayaron fueron las siguientes: 100% ,50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.13%, 1.56% y para cada sistema se realizó los siguientes controles:

Control Negativo de esterilidad del caldo = (LB 2X + *Enterococcus faecalis*)

Control Positivo = (dilución + *Enterococcus faecalis*)

Control Negativo de Esterilidad de la Dilución= (LB 2X+ dilución)

Ensayos= (LB2X + dilución 1) + *Enterococcus faecalis*

...

Ensayos= (LB2X + dilución 7) + *Enterococcus Facalis*

Pasadas las 24-48 horas de incubación, se efectuó las lecturas por espectrofotometría a una D.O de 620 nm para cada lectura.

L. Determinación de los Halos de Inhibición

Se procedió a la siembra de la cepa en forma de extensión con hisopos previamente esterilizados por 10 minutos. Luego se colocaron 10 uL de la sustancia antimicrobiana sobre la superficie del agar. En cada placa se colocó diversas concentraciones diluidas de cada aceite combinado con el hidróxido de calcio, para determinar también en que concentración existe la efectividad. La lectura fue pasada a las 5 minutos del sembrado y 24 horas.

2.3 Instrumento de recolección de datos

Se utilizó una ficha elaborada específicamente para la investigación (Anexo 3).

2.4 Variables

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	SEGÚN SU NATURALEZA	SEGÚN SU FUNCIÓN	SEGÚN SU ESCALA DE MEDICIÓN
SUSTANCIA ANTIMICROBIANA	Sustancia química que impide el desarrollo o favorece la muerte de un microorganismo. ²⁷	-----	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Matricaria chamomilla + CaOH₂ ✓ Curcuma longa + CaOH₂ ✓ Control (Agua destilada + CaOH₂) 	CUALITATIVA	I	NOMINAL
EFFECTO ANTIMICROBIANO	Capacidad del medicamento a usar para producir el efecto deseado frente a un microorganismo. ²⁷	CMI	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Diámetro del halo (mm) ✓ Densidad Óptica (nm) 	CUANTITATIVA	D	RAZÓN

3. Análisis estadístico de la información

Se realizó la colocación de los datos obtenidos en una base de datos de Excel para su tabulación y gráficos. Los análisis estadísticos se realizaron empleando el software SPSS versión 18 para obtener las medidas estadísticas descriptivas: Media, y Desviación Estándar.

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA que fue complementada con la prueba de DUNCAN, para la determinación de la concentración Mínima Inhibitoria. La significación estadística considerada fue de 5% ($P < 0,05$).

III. RESULTADOS

El presente estudio de tipo experimental “*in vitro*”, se desarrolló en los ambientes del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología del Departamento de Ciencias de la Universidad Privada Antenor Orrego; tuvo como propósito determinar si existe efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de *Curcuma longa* y *Matricaria chamomilla* combinados con hidróxido de calcio, para lo cual emplearon 7 concentraciones y el grupo control, donde se obtuvo los siguientes resultados.

El efecto antimicrobiano a las 24 horas de exposición, por medio de la prueba de espectrofotometría quedó evidenciado a través del análisis estadístico de Anova, donde se muestra que existe diferencia significativa ($p < 0.001$) entre los promedios para las 7 concentraciones del aceite de Matricaria comparado con un grupo control (Agua destilada + hidróxido de calcio). Tabla 1

Posterior al análisis de ANNOVA se optó por utilizar la prueba de Duncan. Esta prueba determinó 3 grupos; en el primer grupo se ubicó la concentración al 100% (0.73 nm), en el segundo grupo: también incluyó la concentración al 100% (0.73 nm), al 25% (0.95 nm) y el último grupo: 3.13% (1.60 nm), 50%(1.65 nm), 12.5% (1.73 nm), 1.56% (1.77nm), el grupo control (1.81 nm) y al 6.25% (1.84 nm).Tabla 1a

Por otro lado se realizó el otro ensayo usando la técnica de difusión pasada las 24 horas del ensayo, conjuntamente con el ANOVA respectivo; donde evidenciamos aparentemente diferencias significativas entre los tratamientos.Tabla 2

Posteriormente fue analizada por Duncan y estableció 5 grupos, como se observa en la tabla, que dentro de estos grupos, se determinó que el primer grupo; en donde se encontró que el agua destilada (1.53 mm) y el aceite al 100% (1.67 mm) combinados con hidróxido de calcio fueron más eficaces que los demás grupos, a pesar que el grupo 5 fue aquel que obtuvo mayor diámetro en halos de inhibición: al 6.25% (1.93 mm) y al 50% (2.07 mm). Tabla 2a

Por otro lado, se realizaron los ensayos del segundo producto, el aceite esencial de *Curcuma longa*. los resultados obtenidos del ensayo a través de la densidad óptica de las combinaciones entre las distintas concentraciones del aceite esencial de *Curcuma longa* con CaOH_2 , en donde se observa que si muestra diferencia significativa (0.00025) entre los promedios de cada tratamiento pasadas las 24 horas del ensayo. Tabla 3

Asimismo a través de la prueba de DUNCAN se pudo determinar dos grupos y se observa que en el primero se agrupó a las concentraciones al 1,56% (1.56 nm), 50% (1.57 nm), 6,25% (1.65 nm), 25% (1.67 nm), el grupo control (1.81 nm), 100% (1.82 nm) y al 3,13% (1.88 nm) y el segundo grupo: incluyó las concentraciones del grupo control, al 100%, 3.13% y al 12.5% (2.11 nm) evaluados por el método de espectrofotometría. Tabla 3a

Por otro lado, se realizó el otro ensayo con la prueba de difusión. En donde se observan los resultados que fueron analizados a través de la prueba de ANOVA y que determinó que si hubo una diferencia pasada las 24 horas del ensayo entre las 7 concentraciones. Tabla 4

También se utilizó la prueba de DUNCAN para complementar los resultados obtenidos en la tabla 4. En consecuencia esta prueba determinó 3 grupos. En

donde encontramos a la concentración al 100% (1.43 mm) y el agua destilada (1.53 mm) combinados con hidróxido de calcio en el primer grupo. Tabla 4a

Los valores obtenidos en la comparación de ambos aceites esenciales combinados con CaOH_2 frente al *Enterococcus faecalis* se observa en esta tabla, en donde la combinación del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* al 100 % (0.73 nm) fue la más resaltante por el método de espectrofotometría y la concentración al 100% (1.43 mm) del aceite esencial de *Curcuma longa* por el método de difusión. Tabla 5

Tabla 1

Ensayo *in vitro* de la combinación del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* con Hidróxido de calcio frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 mediante espectrofotometría analizado por la prueba ANOVA.

Grupos de Investigación	DO nm -- 00:00 hrs		DO nm -- 24:00 hrs	
	X	S	X	S
Aceite al 100% + CaOH	1.37	0.54	0.73	0.11
Aceite al 50% + CaOH	1.46	0.40	1.65	0.71
Aceite al 25% + CaOH	1.79	0.21	0.95	0.38
Aceite al 12.5% + CaOH	1.40	0.43	1.73	0.33
Aceite al 6.25% + CaOH	1.79	0.13	1.84	0.28
Aceite al 3.13% + CaOH	1.24	0.67	1.60	0.52
Aceite al 1.56% + CaOH	1.30	0.76	1.77	0.01
AGUA DESTILADA + CAO	1.52	0.20	1.81	0.33
Fo =	3.962		7.495	
P =	0.007		0.000204	

Tabla 1a

Ensayo *in vitro* de la combinación del aceite *Matricaria chamomilla* combinado con Hidróxido de calcio frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 a través del método de espectrofotometría y analizados por la prueba de Duncan a las 24 horas.

Tratamientos	Ni	Grupos para alfa = 0.05		
		G1	G2	G3
Aceite al 100% + CaOH	3	0.73	0.73	
Aceite al 25% + CaOH	3		0.95	
Aceite al 3.13% + CaOH	3			1.60
Aceite al 50% + CaOH	3			1.65
Aceite al 12.5% + CaOH	3			1.73
Aceite al 1.56% + CaOH	3			1.77
AGUA DESTILADA + CAO H	3			1.81
Aceite al 6.25% + CaOH	3			1.84

Tabla 2

Ensayo *in vitro* del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* combinados con hidróxido de calcio frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 a través de la prueba de difusión a las 24 horas.

Grupos de Investigación	Diámetro de Halo (mm) --		Diámetro de Halo (mm) --	
	00:00 hrs		24:00 hrs	
	X	S	X	S
Aceite al 100% + CaOH	1.00	0.00	1.67	0.06
Aceite al 50% + CaOH	1.57	0.06	2.07	0.06
Aceite al 25% + CaOH	1.03	0.06	1.80	0.00
Aceite al 12.5% + CaOH	1.03	0.12	1.83	0.06
Aceite al 6.25% + CaOH	1.10	0.17	1.93	0.15
Aceite al 3.13% + CaOH	0.87	0.06	1.87	0.23
Aceite al 1.56% + CaOH	0.83	0.12	1.77	0.06
AGUA DESTILADA + CAOH	1.16	0.18	1.53	0.07
Fo =	9.88		10.672	
P =	0.000007		0.000004	

Tabla 2a

Ensayo *in vitro* de la combinación del aceite *Matricaria chamomilla* combinado con hidróxido de calcio frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 a través del método de difusión y analizados por la prueba de Duncan a las 24 horas.

Tratamientos	Ni	Grupos para alfa = 0.05				
		G1	G2	G3	G4	G5
AGUA DESTILADA + CAOH	8	1.53				
Aceite al 100% + CaOH	3	1.67	1.67			
Aceite al 1.56% + CaOH	3		1.77	1.77	1.77	
Aceite al 25% + CaOH	3		1.80	1.80	1.80	
Aceite al 12.5% + CaOH	3		1.83	1.83	1.83	
Aceite al 3.13% + CaOH	3			1.87	1.87	
Aceite al 6.25% + CaOH	3				1.93	1.93
Aceite al 50% + CaOH	3					2.07

Tabla 3

Ensayo *in vitro* de la combinación del aceite esencial de *Curcuma longa* con hidróxido de calcio frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 a través del método de espectrofotometría analizado por la prueba ANNOVA.

Grupos de Investigación	DO nm -- 00:00 hrs		DO nm -- 24:00 hrs	
	X	S	X	S
Aceite al 100% + CaOH	1.94	0.17	1.82	0.17
Aceite al 50% + CaOH	1.89	0.13	1.57	0.27
Aceite al 25% + CaOH	1.89	0.12	1.67	0.05
Aceite al 12.5% + CaOH	1.24	0.80	2.11	0.10
Aceite al 6.25% + CaOH	1.75	0.12	1.65	0.17
Aceite al 3.13% + CaOH	1.66	0.25	1.88	0.06
Aceite al 1.56% + CaOH	1.72	0.07	1.56	0.22
AGUA DESTILADA + CAO H	1.52	0.20	1.81	0.33
Fo =	11.44		25.751	
P =	0.000012		0.00025	

Tabla 3a

Ensayo *in vitro* de la combinación del aceite *Curcuma longa* combinado con hidróxido de calcio frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 a través del método de espectrofotometría y analizados por la prueba de Duncan a las 24 horas

Tratamientos	Ni	Grupos para alfa = 0.05	
		G1	G2
Aceite al 1.56% + CaOH	3	1.56	
Aceite al 50% + CaOH	3	1.57	
Aceite al 6.25% + CaOH	3	1.65	
Aceite al 25% + CaOH	3	1.67	
AGUA DESTILADA + CAO H	3	1.81	1.81
Aceite al 100% + CaOH	3	1.82	1.82
Aceite al 3.13% + CaOH	3	1.88	1.88
Aceite al 12.5% + CaOH	3		2.11

Tabla 4

Ensayo *in vitro* del aceite esencial de *Curcuma longa* combinados con hidróxido de calcio frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 a través de la prueba de difusión a las 24 horas.

Grupos de Investigación	Diámetro de Halo (mm) --		Diámetro de Halo (mm) --	
	00:00 hrs		24:00 hrs	
	X	S	X	S
Aceite al 100% + CaOH	0.93	0.06	1.43	0.06
Aceite al 50% + CaOH	1.27	0.06	1.77	0.06
Aceite al 25% + CaOH	1.03	0.06	1.87	0.06
Aceite al 12.5% + CaOH	1.03	0.06	1.77	0.15
Aceite al 6.25% + CaOH	1.33	0.06	1.73	0.06
Aceite al 3.13% + CaOH	1.07	0.06	1.97	0.21
Aceite al 1.56% + CaOH	0.97	0.06	1.90	0.10
AGUA DESTILADA + CAO H	1.16	0.18	1.53	0.07
Fo =	10.647		12.295	
P =	3.93E-06		1.13E-06	

Tabla 4a

Ensayo *in vitro* de la combinación del aceite de *Curcuma longa* combinado con hidróxido de calcio frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 a través del método de difusión y analizados por la prueba de Duncan a las 24 horas

Tratamientos	Ni	Grupos para alfa = 0.05		
		G1	G2	G3
Aceite al 100% + CaOH	3	1.43		
AGUA DESTILADA + CAO H	8	1.53		
Aceite al 6.25% +CaOH	3		1.73	
Aceite al 50% + CaOH	3		1.77	
Aceite al 12.5% + CaOH	3		1.77	
Aceite al 25% + CaOH	3		1.87	1.87
Aceite al 1.56% + CaOH	3		1.90	1.90
Aceite al 3.13% + CaOH	3			1.97

Tabla 5

Ensayos in vitro de los aceites esenciales de Matricaria chamomilla y Curcuma longa combinados con CaOH₂ frente al Enterococcus faecalis ATCC 29212 mediante ESPECTROFOTOMETRÍA

Grupos de Investigación	X	S
100% Matricaria	0.73	0.11
25% Matricaria	0.95	0.38
1,56% Curcuma	1.56	0.22
50% Curcuma	1.57	0.27
3.13% Matricaria	1.6	0.52
50% Matricaria	1.65	0.71
6.25% Curcuma	1.65	0.17
25% Curcuma	1.67	0.05
12.5% Matricaria	1.73	0.33

Tabla 5a

Ensayos in vitro de los aceites esenciales de Matricaria chamomilla y Curcuma longa combinados con CaOH₂ frente al Enterococcus faecalis ATCC 29212 mediante difusión

TRATAMIENTOS	X	S
100% Curcuma	1.43	0.06
GRUPO CONTROL	1.53	0.07
100% Matricaria	1.67	0.06
6.25% Curcuma	1.73	0.06
50% Curcuma	1.77	0.06
1.56% Matricaria	1.77	0.06
12.5% Curcuma	1.77	0.15
25% Matricaria	1.80	0
12.5% Matricaria	1.83	0.06
3.13% Matricaria	1.87	0.23
25% Curcuma	1.87	0.06
1.56% Curcuma	1.90	0.10
6.25% Matricaria	1.93	0.15
3.13% Curcuma	1.97	0.21
50% Matricaria	2.07	0.06

IV. DISCUSIÓN

El tratamiento de conductos radiculares depende de muchos factores para que llegue al éxito como la asepsia, antisepsia antes y durante el tratamiento, la destreza junto con los conocimientos del endodoncista, las técnicas aplicadas, la efectividad de los materiales, y la resistencia de los microorganismos a los antimicrobianos, resultando una complicación el poder erradicarlos de los conductos radiculares.

Cuando el tratamiento de conductos fracasa, es muy importante tratarlo raudamente, ya que puede generar complicaciones graves en un futuro al paciente. En estos conductos radiculares contaminados pueden estar implicados varios géneros de microorganismos, como los *Streptococcus* entre otros, pero cuando la infección persiste, se puede encontrar microorganismos que ya no forman parte de la microbiota oral como *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* etc.

Uno de los microorganismos más frecuentes es *Enterococcus faecalis* y se puede encontrar hasta en un 90% de las infecciones radicuales persistentes, además también en cuadros de periodontitis apical.

El Enterococcus faecalis ha desarrollado factores de virulencia tales como sustancias de agregación, producción de superóxido extracelular, polisacáridos extracelulares y determinantes de resistencia a los antibióticos. Por otro lado, este se caracteriza por la capacidad que tiene para colonizar y penetrar en los túbulos dentinarios, una buena capacidad de adaptación, la posible resistencia al pH del hidróxido de calcio, la capacidad de sintetizar proteínas cuando se

expone a condiciones ambientales adversas crecimiento en forma de colonia única.¹⁻³

Por todo lo mencionado anteriormente; el presente estudio se realizó bajo condiciones *"in vitro"* y determinó la existencia de un efecto antimicrobiano de dos aceites esenciales de dos plantas muy conocidas: Matricaria chamomilla y Curcuma longa, cuya elección se realizó debido a las diversas propiedades que presentan y que fueron mencionadas anteriormente.

Por otro lado; se conoce que uno de los materiales más usados dentro de los conductos radiculares, es el hidróxido de calcio, cuyo pH es 12,4 y presenta óptimas características cuando se encuentran en el interior de ellos.

En lo que respecta a los ensayos tanto por el método de espectrofotometría y de difusión se registró que la concentración al 100% del aceite de manzanilla fue el de mayor efecto entre los dos aceites esenciales. Esto puede deberse a que dentro de sus componentes del aceite esencial de la Matricaria se encuentran el azuleno, camazuelo, lactonas sesquiterpénicos entre otros. Entre las lactonas sesquiterpénicas se encuentran la matricina, matricarina, y desacetilmatricarina que son compuestos químicos encargados de la actividad antimicrobiana, citotóxica, antiinflamatoria, antibacteriana, antiviral de la planta, y el mecanismo de la planta es la ruptura de la membrana celular que puede ser por un desequilibrio de la estabilidad estructural, o por un aumento de la permeabilidad.²⁸

Por otro lado también se observó a través de la prueba de difusión las concentraciones con mayor efecto fueron las combinaciones del hidróxido de calcio con los dos tipos de aceites al 100% y el agua destilada. En donde

podemos sospechar que la combinación del agua con el aceite ha podido influir en las diferentes concentraciones de los aceites de *curcuma* y *matricaria*. Esto puede ser motivo para que en un futuro se realicen investigaciones que analicen esas características.

Los resultados obtenidos en el ensayo usando el aceite esencial de *Matricaria* discrepan con los resultados de Hidalgo⁴ debido a que concluyó que el efecto inhibitorio de la combinación del aceite de *Matricaria* con hidróxido de calcio es mínimo o nulo en comparación con el hidróxido de calcio mas paramonoclorofenol e hidróxido de calcio puro los cuales mostraron halos de inhibición más significativos, además en ese estudio solo se empleó la prueba de difusión de discos, caso contrario con el presente estudio que se usó dos métodos : obtener la densidad óptica por medio de la espectrofotometría y la prueba de difusión.

Por otro lado coincidimos con Linares²⁸ que el *aceite esencial de Matricaria chamomilla* presenta efecto antibacteriano in vitro sobre el crecimiento de *Enterococcus faecalis* y que esto puede deberse a los flavonoides y los sesquiterpenos en general, ambos son componentes de la composición química de la *Matricaria chamomilla*. Además concluyó que el aceite esencial de Manzanilla presenta efecto al 50% sobre el crecimiento del *Enterococcus faecalis* y recomendó realizar estudios que usen concentraciones mayores del 50%. En este ensayo el autor trabajó con la prueba de difusión en discos y contó con la participación del hidróxido de calcio para este ensayo.

Sin embargo; en los resultados del ensayo con aceite de *Curcuma longa*; si se obtuvo efecto sobre el *Enterococcus faecalis* pero solo superó al grupo control y a la vez fue superado por el aceite de Matricaria. Esto confirma lo mencionado por Prabhakar y cols²⁴, Anuradha Rani y cols²⁵ y también por Agrima y cols²⁶ que realizaron diversos estudios donde compararon el efecto antimicrobiano del aceite de curcuma, el hidróxido de calcio y otras sustancias donde concluyeron que la *Curcuma longa* presentaba una ligera ventaja sobre el hidróxido de calcio pero que ambos no superaban aún el efecto de la Clorhexidina, además el efecto antimicrobiano de la curcuma, puede deberse a su componente llamado “curcumina”. Este componente ha demostrado actividades antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobianas.

Además se debe tomar en cuenta que el tiempo que duró el ensayo fue el mínimo a comparación de esos estudios y por ende, los resultados de los posibles efectos son muy prematuros.

V. CONCLUSIONES

1. El efecto de la combinación del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* con CaOH_2 fue mayor que del aceite de *Curcuma longa*.
2. La concentración al 100% del aceite de *Matricaria chamomilla* combinado con CaOH_2 fue la más eficaz en el ensayo por espectrofotometría a las 24 horas.
3. Las concentraciones al 6.25% y 50% del aceite de *Matricaria chamomilla* combinado con CaOH_2 presentaron mayores halos de inhibición en el ensayo de difusión a las 24 horas.
4. la concentración al 1.56% del aceite de *Curcuma longa* combinado con CaOH_2 fue la más eficaz en el ensayo por espectrofotometría a las 24 horas.
5. Las concentraciones al 25%, 1.56% y 3.13% del aceite de *Curcuma longa* combinado con CaOH_2 presentaron mayores halos de inhibición en el ensayo de difusión a las 24 horas.

VI. RECOMENDACIONES

1. Ampliar en la investigación los tiempos de exposición, pasadas los 3, 5 y hasta 7 días para verificar si existe eficacia de los aceites de Manzanilla y Curcuma sobre la cepa del *Enterococcus Faecalis*.
2. Seguir buscando nuevas propuestas terapéuticas de origen natural para la mejoría del paciente.
3. Ampliar el número de repeticiones para generar mejor confiabilidad en los resultados.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Floriano M, Machado T, Barrocas D, Rodrigues J, Vidal F. infecção secundária e persistente e sua relação com o fracasso do tratamento endodôntico. Rev.bras.odontol. 2016; 73 (3): 212-217
2. Moreira M, Ferreira F. Enterococcus faecalis na endodontia: um desafio ao sucesso. Rev.bras.odontol. 2010;67(2): 209-14
3. França T, Dourado J, dos Santos E. Infecções endodônticas persistentes: causas. Diagnóstico e tratamento. Journal of Medical and Biological sciences. 2018; 17(1).
4. Hidalgo N. Efecto inhibidor del hidróxido de calcio puro con aceite esencial de manzanilla “Matricaria Chamomilla” al 100% en comparación con hidróxido de calcio más paramonoclorofenol alcanforado e hidróxido de calcio puro, sobre cepas de enterococcus faecalis. Estudio in vitro. [Tesis Bachiller].Quito: Universidad central del Ecuador; 2016.
5. Bathula V. Comparison of antibacterial efficacy of Turmeric extract ,Morinda Citrifolia and 3% sodium hypochlorite on Enterococcus Faecal-is: An in-vitro study. Journal of Clinical and Diagnostic research. 2016; 10(10): ZC55-ZC57.

6. Prabhakar A. Comparison of antibacterial efficacy of calcium hydroxide paste, 2% chlorhexidina gel and turmeric extract as an intracanal medicament and their effect on microhardness of root dentin: An in vitro study. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*. 2013;6(3):171-7.
7. Shruti S. Rashmi N. Hemant A. Comparative Evaluation of Propolis, Metronidazole with Clorhexidina, calcium hydroxide and Curcuma longa extract as intracanal medicament against E. Faecalis- An invitro study. *Journal of Clinical and Diagnostic research*. 2015
8. Lígia A. Coury C. Collantes I. Barradas M. Barbosa I. New trends in dentistry: plant extracts against Enterococcus faecalis. The efficacy compared to chlorhexidine. *Braz. Oral res*. 2013;27(2):1807-3107.
9. Alagl AS. Bedi S. Phytosolutions for Enterococcus Faecalis in endodontics : An update. *OHDM*. 2016; 15(5).
10. Dakshita J, Ashish A. Natural medicaments in dentistry. *Ayu*. 2014; 35(2):113-18.
11. Romero R. Llanos E. Efectos analgésicos, antiinflamatorios y desinfectantes del agua de manzanilla como vehículo del hidróxido de calcio en la medicación del conducto radicular. {Tesis Maestría}. Guayaquil: Universidad de Guayaquil; 2014.

12. Correa D. Evaluación de la capacidad antioxidante de extractos acuosos de cúrcuma (*Longa linn*), aplicados en la elaboración de salsa de tomate, Machala 2014. {Tesis Bachiller}. Machala: Universidad técnica de Machala; 2015.
13. Hemanshi K. An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of cúrcuma longa, tachysperm ammi, chlorhexidine gluconate, and calcium hydroxide on enterococcus faecalis. *Journal of conservative dentistry*. 2013; 16(2)144-7.
14. Praveenkumar S. Mandroli. Kishor B. An in-vitro evaluation of antibacterial activity of curcumin against common endodontic bacteria. *Journal of applied pharmaceutical science*. 2013; 3(10)106-8.
15. Araujo C. Leòn LL. Biological activities of cúrcuma longa. *Mem inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(5)723-8.
16. Hegde M. Shey S. Mahalaxmi Y. Amit B. An in vitro evaluation of antimicrobial activity of aqueous cúrcuma longa extract againsts endodontic pathogens. *Int. J. Res. Phytochem. Pharmacol*. 2012; 2(1):1-6.
17. Sinha DJ, Vasudeva A, Gowhar O, Garg P, Sinha A, Prakash P. Comparison of antimicrobial efficacy of Propolis, *Azadirachta indica* (Neem), *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil), *Curcuma longa* (Turmeric) and 5% So-

dium hypochlorite on *Candida albicans* biofilm formed on tooth sub-strate:
An In-vitro study. *J Pharm Biomed Sci* 2015; 05(06):469-474.

18. Rahman H. Chandra R. Singh S. Chandra A. A combination approach to fight against *E.faecalis* and *C.albicans*. *IJCD*. 2013; 4(2): 1-5.
19. Bornaz J. Bornaz V. Bornaz M. Efecto in vitro de la solución de Caesalpinia espinosa (TARA) al 60 %, e hidróxido de calcio y gluconato de clorhexidina al 2 % en el halo inhibitorio microbiano de *Enterococcus Faecalis*. *Cienc.desarro(Tacna)*.2014;Vol.17:13-16.
20. Vinothkumar T. Mohamed I. Balaji L. Kandaswamy. In vitro evaluation of five different herbal extracts as an antimicrobial endodontic irrigant using realtime quantitative polimerasa chain reaction. *Journal of conservative dentistry*. 2013; 16(2):167-70.
21. Reshma S. Sham S. Sundeep H. Antibacterial Activity of Turmeric against *Enterococcus Faecalis*- An in vitro study.*International Journal of Current Microbiology and Aplied Sciences*. 2014; 3(2):498-504.
22. Nagendrababu V. Anand S. Abarajithan M. Sheriff S. Pulikkotil S. Nath S. Natural Therapeutic Options in Endodontics- a review. *The open den-tistry journal*. 2016; 10.214-26.

23. Coy B, Acosta E. Actividad antibacteriana y determinación de la composición química de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*thymus vulgaris*) y cúrcuma (*cúrcuma longa* de Colombia. *Revista cubana de plantas medicinales*. 2013; 18(2):237-46.
24. Prabhakar AR, Swapnil T, Savita H, Sugandhan S. Comparison of antibacterial efficacy of calcium hydroxide paste, 2% Chlorhexidine Gel and Turmeric Extract as an Intracanal Medicament and their Effect on Microhardness of Root Dentine: An in vitro Study. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*. 2013; 6(3):171-177.
25. Rani A, Thakur S, Gupta S, Gauniyal P, Bhandari M, Gupta H. Comparative Evaluation of Antimicrobial Activity of Different Herbal Extract and 2% Chlorhexidine Gluconate Against *E. Faecalis* & *C. Albicans*: An in vitro Study. *Indian Journal of Dental Sciences*. 2015; 7(1).
26. Vasudeva A, Sinha D, Prabha S, Nath N, Garg P, Upadhyay. Disinfection of dentinal tubules with 2% Chlorhexidine gel, Calcium hydroxide and herbal intracanal medicaments against *Enterococcus Faecalis*: An in-vitro study. *Singapore Dental Journal*. 2017; 38:39-44.
27. Dorland N. *Diccionario Médico de Bolsillo*. 27a Ed. Madrid: Interamericana McGraw Hill; 2010.

28. Linares J. Efecto "in vitro" del aceite esencial de Manzanilla (Matricaria Chamomilla) sobre el crecimiento de *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212. Estudio in vitro. [Tesis Bachiller].Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2012.

ANEXOS

ANEXO 1



UPAO

Facultad de Medicina Humana
DECANATO

Trujillo, 21 de enero del 2019

RESOLUCION N° 0079-2019-FMEHU-UPAO

VISTO, el expediente organizado por Don (ña) **LEON GALLARDO MILAGROS ISABEL** alumno (a) de la Escuela Profesional de Estomatología, solicitando **INSCRIPCIÓN** de proyecto de tesis Titulado "**EFFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE MATRICARIA CHAMOMILLA Y CURCUMA LONGA COMBINADOS CON CaOH FRENTE AL ENTEROCOCCUS FAECALIS ATCC 29212**", para obtener el **Título Profesional de Cirujano Dentista**, y;

CONSIDERANDO:

Que, el (la) alumno (a) **LEON GALLARDO MILAGROS ISABEL**, ha culminado el total de asignaturas de los 10 ciclos académicos, y de conformidad con el referido proyecto revisado y evaluado por el Comité Técnico Permanente de Investigación y su posterior aprobación por el Director de la Escuela Profesional de Estomatología, de conformidad con el Oficio N° 0046-2019-ESTO-FMEHU-UPAO;

Que, de la Evaluación efectuada se desprende que el Proyecto referido reúne las condiciones y características técnicas de un trabajo de investigación de la especialidad;

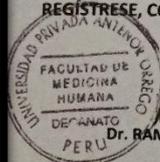
Que, habiéndose cumplido con los procedimientos académicos y administrativos reglamentariamente establecidos, por lo que el Proyecto debe ser inscrito para ingresar a la fase de desarrollo;

Estando a las consideraciones expuestas y en uso a las atribuciones conferidas a este despacho;

SE RESUELVE:

- Primero.- AUTORIZAR** la inscripción del Proyecto de Tesis intitulado "**EFFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE MATRICARIA CHAMOMILLA Y CURCUMA LONGA COMBINADOS CON CaOH FRENTE AL ENTEROCOCCUS FAECALIS ATCC 29212**", presentado por el (la) alumno (a) **LEON GALLARDO MILAGROS ISABEL**, en el registro de Proyectos con el N°636-ESTO por reunir las características y requisitos reglamentarios declarándolo expedito para la realización del trabajo correspondiente.
- Segundo.- REGISTRAR** el presente Proyecto de Tesis con fecha **18.01.19** manteniendo la vigencia de registro hasta el **18.01.21**.
- Tercero.- NOMBRAR** como Asesor de la Tesis al (la) profesor (a) **GONZALEZ CABEZA JOSE**.
- Cuarto.- DERIVAR** al Señor Director de la Escuela Profesional de Estomatología para que se sirva disponer lo que corresponda, de conformidad con la normas Institucionales establecidas, a fin que el alumno cumpla las acciones que le competen.
- Quinto.- PONER** en conocimiento de las unidades comprometidas en el cumplimiento de lo dispuesto en la presente resolución.

REGÍSTRESE, COMUNÍQUESE Y ARCHÍVESE.



[Firma]
Dr. RAMEL ULLOA DEZA
Decano



[Firma]
Dr. BIANA JACQUELINE SALINAS GAMBOA
Secretaria Académica

c.c.
ESCUELA DE ESTOMATOLOGIA
ASESOR
EXPEDIENTE
Archivo

ANEXO 2

SOLICITO PERMISO PARA EJECUCIÓN DE PROYECTO DE TESIS

Dr. JOSÉ GUILLERMO GONZÁLES CABEZA

JEFE DEL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN DE MICROBIOLOGÍA
MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE
CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO

S.D.

YO, **León Gallardo, Milagros Isabel**, estudiante egresada de la escuela
profesional de Estomatología de la prestigiosa universidad, identificado con el ID
N° 000121786

Ante Ud. Me presento y expongo:

Que, siendo requisito indispensable para poder realizar mi trabajo de
investigación, recorro a su despacho a fin que se me autorice realizar mi estudio
en el ambiente del Laboratorio de Investigación de Microbiología Molecular y
Biotecnología y poder ejecutar el proyecto de tesis titulado: **"EFECTO
ANTIMICROBIANO IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE MATRICARIA
CHAMOMILLA Y CURCUMA LONGA COMBINADOS CON CAOH₂ FRENTE AL
ENTEROCOCCUS FAECALIS ATCC 29212"**.

Por tanto

Ruego a usted acceder a mi petición por ser de justicia

Trujillo, 15 de mayo del 2018

León Gallardo, Milagros Isabel
ID:000121786

ANEXO 3

**Herbarium Truxillense (HUT)**
Universidad Nacional de Trujillo
Facultad de Ciencias Biológicas
Jr. San Martín 392, Trujillo - Perú



Constancia N° 017 – 2018- HUT

EL DIRECTOR DEL HERBARIUM TRUXILLENSE (HUT) DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO.

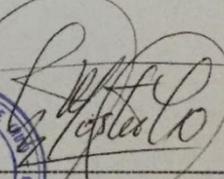
Da Constancia de la determinación taxonómica de un (01) espécimen vegetal:

- Clase: Equisetopsida
- Subclase: Magnoliidae.
- Superorden: Liliales
- Orden: Zingiberales
- Familia: Zingiberaceae
- Género: Curcuma
- Especie: *C. longa* L.

Muestra alcanzada a este despacho por MILAGROS ISABEL LEÓN GALLARDO, identificado con DNI N° 71738313, con domicilio legal en Av. España N°2726, Trujillo; estudiante de la Facultad de Estomatología, de la Universidad Privada Antenor Orrego, cuya determinación taxonómica servirá para la realización del Proyecto de Tesis: "Eficacia antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* "manzanilla" y *Curcuma Longa* "cúrcuma" combinados con hidróxido de Calcio frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 .

Se expide la presente Constancia a solicitud de la parte interesada para los fines que hubiera lugar.

Trujillo, 18 de abril del 2018



Dr. JOSE MOSTACERO LEON
Director del Herbario HUT

cc. Herbario HUT

ANEXO 4

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA LA COMBINACIÓN DEL CaOH₂ CON ACEITE DE MATRICARIA A TRAVÉS DEL MÉTODO DE ESPECTOFOTOMETRÍA

ACEITE DE MATRICARIA + CaOH ₂							
CONCENTRACIONES 300 ul de c/u		DO mm					
		Ensayo 1			Ensayo 2		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3
LB[2X] + DT 100% + 50 ul EF	T1						
LB[2X] + DT 50% + 50 ul EF	T2						
LB[2X] + DT 25% + 50 ul EF	T3						
LB[2X] + DT 12.5% + 50 ul EF	T4						
LB[2X] + DT 6.25% + 50 ul EF	T5						
LB[2X] + DT 3.13% + 50 ul EF	T6						
LB[2X] + DT 1.56% + 50 ul EF	T7						

ACEITE DE MATRICARIA + CaOH ₂							
CONTROLES		DO mm					
		Ensayo 1			Ensayo 2		
		Lb 2x + Dilución B	C-	Dilución + EF C+	Lb 2x + Dilución B	C-	Dilución + EF C+
DT 100%	T1						
DT 50%	T2						
DT 25%	T3						
DT 12.5%	T4						
DT 6.25%	T5						
DT 3.13%	T6						
DT 1.56%	T7						
LB[2X] + 100 ul EF	C-						

**FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA LA COMBINACIÓN DEL
CaOH₂ CON ACEITE DE MATRICARIA A TRAVES DEL MÉTODO DE
DIFUSIÓN**

ACEITE DE MATRICARIA + CAO ₂						
CONCENTRACIONES	OBSERVACIÓN EN PLACAS PETRI					
	0 HORAS			24 HORAS		
	A	B	C	A	B	C
Control -						
Control +						
Blanco						
100%						
50%						
25%						
12.50%						
6.25%						
3.13%						
1.56%						

**FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA LA COMBINACIÓN DEL
CaOH₂ CON ACEITE DE CURCUMA A TRAVÉS DEL MÉTODO DE
ESPECTOFOTOMETRÍA**

ACEITE DE CÚRCUMA + CAO _H ₂							
CONCENTRACIONES 300 ul de c/u		DO mm					
		Ensayo 1			Ensayo 2		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3
LB[2X] + DT 100% + 50 ul EF	T1						
LB[2X] + DT 50% + 50 ul EF	T2						
LB[2X] + DT 25% + 50 ul EF	T3						
LB[2X] + DT 12.5% + 50 ul EF	T4						
LB[2X] + DT 6.25% + 50 ul EF	T5						
LB[2X] + DT 3.13% + 50 ul EF	T6						
LB[2X] + DT 1.56% + 50 ul EF	T7						

ACEITE DE CÚRCUMA + CAO _H ₂							
CONTROLES		DO mm					
		Ensayo 1			Ensayo 2		
		Lb 2x + Dilución B	C-	Dilución + EF C+	Lb 2x + Dilución B	C-	Dilución + EF C+
DT 100%	T1						
DT 50%	T2						
DT 25%	T3						
DT 12.5%	T4						
DT 6.25%	T5						
DT 3.13%	T6						
DT 1.56%	T7						
LB[2X] + 100 ul EF	C-						

**FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA LA COMBINACIÓN DEL
CaOH₂ CON ACEITE DE CURCUMA A TRAVES DEL MÉTODO DE
DIFUSIÓN**

ACEITE DE CURCUMA + CAOH ₂						
CONCENTRACIONES	OBSERVACIÓN EN PLACAS PETRI					
	0 HORAS			24 HORAS		
	A	B	C	A	B	C
Control -						
Control +						
Blanco						
100%						
50%						
25%						
12.50%						
6.25%						
3.13%						
1.56%						

**FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA LA COMBINACIÓN DEL
CaOH₂ CON AGUA DESTILADA A TRAVÉS DEL MÉTODO DE
ESPECTOFOTOMETRÍA**

AGUA DESTILADA + CaOH ₂							
CONCENTRACIONES 300 ul de c/u		DO mm					
		Ensayo 1			Ensayo 2		
LB[2X] + DT 100% + 50 ul EF	T1						

AGUA DESTILADA + CaOH ₂							
CONTROLES		DO mm					
		Ensayo 1			Ensayo 2		
DT 100%	T1						
LB[2X] + 100 ul EF	C-						

**FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA LA COMBINACIÓN DEL
CaOH₂ CON AGUA DESTILADA A TRAVES DEL MÉTODO DE DIFUSIÓN**

AGUA DESTILADA + CaOH ₂			
CONCENTRACIONES		OBSERVACIÓN EN PLACA PETRI	
		00 HORAS	24 HORAS
		A	B
C-	Control -		
C +	Control +		
Blco	Blanco		
T1	R1		
T2	R2		
T3	R3		
T4	R4		
T5	R5		
T6	R6		
T7	R7		

ANEXO 5

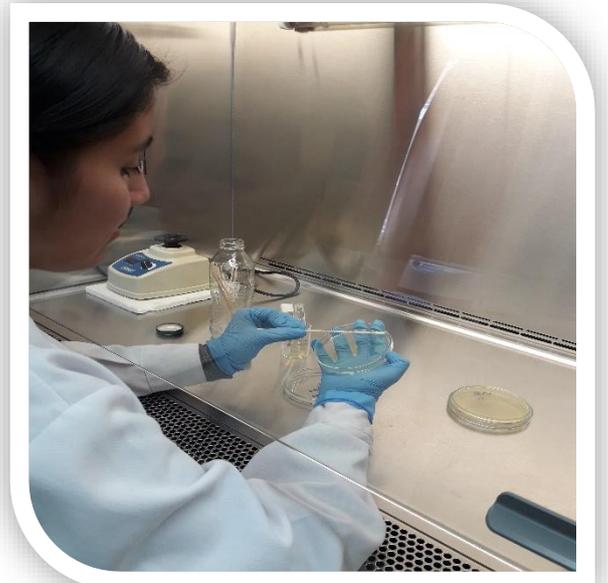
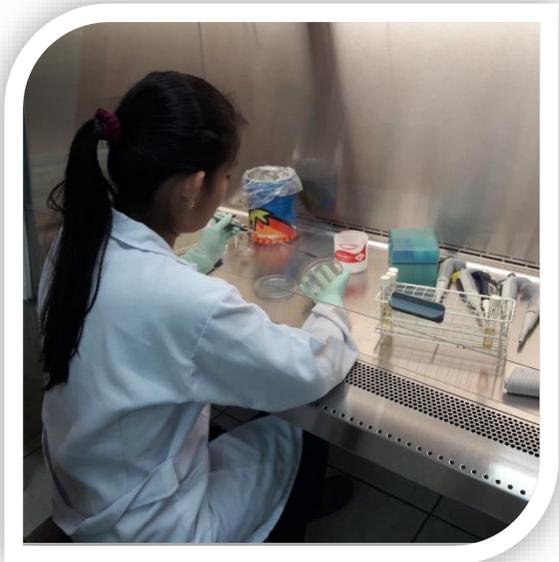
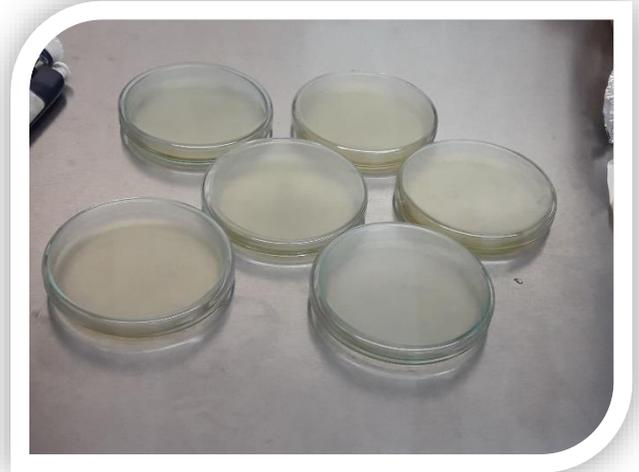
REGISTRO FOTOGRÁFICO

PREPARACIÓN DEL ACEITE DE CURCUMA





REACTIVACIÓN Y SEMBRADO



ACEITE DE MATRICARIA + CAOH₂

CONCENTRACIONES 300 ul de c/u		DO mm					
		Ensayo 1 00:00 hrs			Ensayo 2 24:00 hrs		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3
LB[2X] + DT 100% + 50 ul EF	T1	1.33	1.928	0.847	0.83	0.605	0.75
LB[2X] + DT 50% + 50 ul EF	T2	1.588	1.781	1.006	2.197	1.9	0.846
LB[2X] + DT 25% + 50 ul EF	T3	1.742	1.608	2.018	0.52	1.096	1.238
LB[2X] + DT 12.5% + 50 ul EF	T4	1.603	0.903	1.687	1.95	1.349	1.887
LB[2X] + DT 6.25% + 50 ul EF	T5	1.741	1.695	1.945	2.092	1.897	1.531
LB[2X] + DT 3.13% + 50 ul EF	T6	0.487	1.78	1.461	1.025	1.738	2.037
LB[2X] + DT 1.56% + 50 ul EF	T7	0.417	1.693	1.776	1.757	1.778	1.762

ACEITE DE MATRICARIA + CAO H						
CONCENTRACIONES		OBSERVACIÓN EN PLACA PETRI				
		00 HORAS			24 HORAS	
		A	B	C	A	B
C-	Control -	NO	NO	NO	NO	NO
C +	Control +	NO	NO	NO	NO	NO
Blco	Blanco	0.8	0.85	0.95	1.8	1.6
T1	100%	1	1	1	1.7	1.7
T2	50%	1.6	1.6	1.5	2.1	2
T3	25%	1.1	1	1	1.8	1.8
T4	12.50%	1.1	0.9	1.1	1.8	1.9
T5	6.25%	1.2	1.2	0.9	2.1	1.9
T6	3.13%	0.8	0.9	0.9	1.6	2
T7	1.56%	0.9	0.7	0.9	1.7	1.8

ACEITE DE MATRICARIA + CAO H							
CONTROLES		DO mm					
		Ensayo 1			Ensayo 2		
		Lb 2x + Dilución B	C-	Dilución + EF C+	Lb 2x + Dilución B	C-	Dilución + EF C+
DT 100%	T1	0.064		0.193	0.104		0.045
DT 50%	T2	0.107		0.121	0.082		0.21
DT 25%	T3	0.126		0.282	0.059		0.047
DT 12.5%	T4	0.096		0.245	0.23		0.328
DT 6.25%	T5	0.086		0.073	0.226		0.041
DT 3.13%	T6	0.097		0.074	0.22		0.073
DT 1.56%	T7	0.053		0.204	0.368		0.061
LB[2X] + 100 uI EF	C-		0.068			0.22	

ACEITE DE CÚRCUMA + CAOH ₂							
CONCENTRACIONES 300 ul de c/u		DO mm					
		Ensayo 1			Ensayo 2		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3
LB[2X] + DT 100% + 50 ul EF	T1	2.024	2.05	1.738	1.816	1.983	1.647
LB[2X] + DT 50% + 50 ul EF	T2	1.765	2.017	1.889	1.711	1.256	1.743
LB[2X] + DT 25% + 50 ul EF	T3	1.959	1.754	1.951	1.7	1.707	1.617
LB[2X] + DT 12.5% + 50 ul EF	T4	1.945	0.377	1.398	1.992	2.149	2.175
LB[2X] + DT 6.25% + 50 ul EF	T5	1.858	1.629	1.769	1.728	1.46	1.774
LB[2X] + DT 3.13% + 50 ul EF	T6	1.583	1.458	1.931	1.848	1.855	1.95
LB[2X] + DT 1.56% + 50 ul EF	T7	1.747	1.638	1.764	1.358	1.528	1.8

ACEITE DE CÚRCUMA + CAOH ₂							
CONTROLES		DO mm					
		Ensayo 1			Ensayo 2		
		Lb 2x + Dilución B	C-	Dilución + EF C+	Lb 2x + Dilución B	C-	Dilución + EF C+
DT 100%	T1	0.272		0.116	0.315		0.078
DT 50%	T2	0.076		0.139	0.308		0.081
DT 25%	T3	0.058		0.079	0.439		0.054
DT 12.5%	T4	0.065		0.096	0.308		0.523
DT 6.25%	T5	0.086		0.092	0.235		0.287
DT 3.13%	T6	0.085		0.111	0.345		0.09
DT 1.56%	T7	0.091		0.065	117		0.059

ACEITE DE CÚRCUMA + CAOH₂

CONCENTRACIONES		OBSERVACIÓN EN PLACA PETRI				
		00 HORAS			24 HORAS	
		A	B	C	A	B
C-	Control -	NO	NO	NO	NO	NO
C+	Control +	NO	NO	NO	NO	NO
Blco	Blanco	1.5	1.6	1.6	1.8	1.9
T1	100%	1	0.9	0.9	1.5	1.4
T2	50%	1.2	1.3	1.3	1.8	1.7
T3	25%	1	1	1.1	1.9	1.9
T4	12.50%	1.1	1	1	1.9	1.8
T5	6.25%	1.3	1.3	1.4	1.8	1.7
T6	3.13%	1.1	1	1.1	2.2	1.9
T7	1.56%	1	1	0.9	1.8	1.9

AGUA DESTILADA + CAOH₂

CONCENTRACIONES 300 ul de c/u		DO mm					
		Ensayo 1			Ensayo 2		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3
LB[2X] + DT 100% + 50 ul EF	T1	1.613	1.29	1.648	2.092	1.889	1.443

AGUA DESTILADA + CAOH							
CONTROLES		DO mm					
		Ensayo 1			Ensayo 2		
		Lb 2x + Dilución B	C-	Dilución + EF C+	Lb 2x + Dilución B	C-	Dilución + EF C+
DT 100%	T1	0.72		1.293	1.687		1.732
LB[2X] + 100 ul EF	C-		0.068			0.22	

AGUA DESTILADA + CAOH			
CONCENTRACIONES		OBSERVACIÓN EN PLACA PETRI	
		00 HORAS	24 HORAS
		A	B
C-	Control -	NO	NO
C+	Control +	NO	NO
Blco	Blanco	1	1.5
T1	R1	1	1.5
T2	R2	1	1.6
T3	R3	1.3	1.5
T4	R4	1	1.6
T5	R5	1.4	1.6
T6	R6	1.3	1.4
T7	R7	1.3	1.5