



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN  
Y ESTUDIOS AVANZADOS EN ODONTOLOGÍA**

**“DR. KEISABURO MIYATA”**

**“Efecto Antimicrobiano de Tres Tipos de Algas Marinas contra el *E. faecalis*.”**

**PROYECTO TERMINAL**

**PARA OBTENER EL DIPLOMA DE:**

**ESPECIALISTA EN ENDODONCIA**

**PRESENTA:**

**C.D. OSCAR MANUEL CALDERON RICOY**

**DIRECTOR:**

**DR. EN C.S.P. ÁNGEL VISOSO SALGADO**

**ASESORES:**

**E.E BRISSA ITZEL JIMENEZ VALDES**

**D. EN I. ISAÍAS DE LA ROSA-GÓMEZ**



**TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, AGOSTO DE 2014**

## **Dedicatoria**

A mi padre y madre que apostaron por mí todo su esfuerzo, dedicación y sacrificio para el logro de este objetivo....gracias por enseñarme a nunca renunciar a pesar de las adversidades de la vida.

A mis tíos: Médico Anestesiólogo Paulino Calderón Medina, quien siempre fue un ejemplo profesionalmente a seguir. Bernardo Calderón Medina, siempre te llevaré en mi recuerdo. Q.P.D.

## **Agradecimientos**

A DIOS por darme la oportunidad, el espíritu y fortaleza de poder concluir mis estudios, por darme una familia hermosa y por permitirme escalar un peldaño más en la vida.

Al programa de becas CONACYT por el apoyo durante todo el periodo del posgrado. ¡Gracias!.

Agradezco enormemente a la Universidad Autónoma del Estado de México por brindarme la posibilidad de formarme como especialista en Endodoncia, así como también a todos mis catedráticos y personas alrededor, por brindarnos su tiempo y dedicación. ¡Gracias!

Gracias al Dr. Isaías De la Rosa por brindarme su tiempo y todas las facilidades para poder realizar mi trabajo de investigación, así mismo al Tecnológico de Toluca por facilitarme sus instalaciones.

Sin lugar a dudas, a mi familia que siempre me ha apoyado en las buenas y en las malas, que han sido mis verdaderos cómplices y pilares inquebrantables en alcanzar este sueño, hoy hecho realidad.

Mamá: Gracias por tu apoyo incondicional, por darme amor, felicidad y sobre todo la vida, porque sin tu apoyo nada de esto sería posible. Te amo mamá.

Papá: Siempre al pendiente de mí... nunca has dejado de luchar para el bien mío y de toda tu familia, Porque como dices "Me doblo pero no me quiebro" jamás olvidaré esas palabras que han sido de mucha inspiración para nunca ante la adversidad dejar de luchar por mis objetivos... ¡Gracias!

A mis hermanos: Itzé, Otilio y Zoyla, por siempre estar al pendiente de mí, y porque de cada uno de ustedes he aprendido lo bueno de la vida.

A mis pequeños: Cris, Sofí, Fri, Xime y Pao que son una fuente de alegría en mi vida y motivo de inspiración.

Especial agradecimiento a mis tías Lucia Calderón Medina y María Cruz Calderón Medina por todo su apoyo incondicional para con mi padres para poder lograr este objetivo. ¡Nunca lo olvidaré! “muchas gracias”

Por supuesto a mi hermano del alma Julio Adolfo Acosta Calderón por su apoyo en la obtención de las algas marinas, ya que sin tu apoyo tampoco nada de esto sería posible. ¡Gracias Seaweed!

Gracias a Dios y a la vida por hacerme inmensamente feliz.

## INDICE

I. RESUMEN .....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	2
III. ANTECEDENTES.....	4
C A P I T U L O 1 ENTEROCOCCUS FAECALIS.....	4
1.1 Generalidades.....	4
1.2 Cepas y Grupos .....	5
C A P I T U L O 2.- PREVALENCIA SECUNDARIA EN INFECCIONES DEL CONDUCTO RADICULAR y SU IMPORTANCIA EN ENDODONCIA.....	7
2.1 Supervivencia y Factores de Virulencia.....	9
C A P I T U L O 3.- PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN .....	11
3.1 Métodos de Erradicación.....	12
C A P I T U L O 4.- MACROALGAS MARINAS .....	15
4.1 Uso de las Algas Marinas.....	15
4.2 Algas Marinas en la Medicina.....	16
4.3 Actividad Bioactiva de las Algas Marinas.....	16
III.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	18
IV.- JUSTIFICACIÓN .....	20
V.- OBJETIVOS.....	21
Objetivo General.....	21
Objetivos Específicos.....	21
VI.- HIPÓTESIS.....	23
VII.- MÉTODOS Y MATERIALES.....	24
1. Obtención de las Muestras .....	24
2. Recolección y Procesamiento del Material Biológico.....	24

3. Ceba Bacteriana .....	24
4. Extracción Etanólica de Sustancias Bioactivas de Macroalgas Marinas.....	25
5. Preparación del Medio de Cultivo y Determinación de la Actividad Antimicrobiana de los Extractos Algales. ....	27
VIII.- RESULTADOS .....	29
IX.- TABLAS Y FIGURAS.....	32
TABLA 1.- Descriptiva de las variables de estudio .....	32
Tabla 2.- Diferencias de medias (Prueba t) entre los grupos: a) Sensidiscos, b)pocillos .....	33
X.- DISCUSIÓN .....	34
XI.- CONCLUSIONES .....	36
XII.- SUGERENCIAS .....	37
XIII.- BIBLIOGRAFÍA .....	38
XIV.- ANEXOS.....	43

## I. RESUMEN

La finalidad del presente estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de tres especies de macroalgas marinas, obtenidos de acuerdo al protocolo modificado de Vlachos et al. (1996). Para llevar a cabo la evaluación, las algas fueron molidas hasta obtener un grano fino en un mortero, continuando con la extracción etanólica por medio de un sistema de reflujo. Y para su medición, se utilizaron dos métodos el primero de halos, el segundo método de pocillos y el método de sensi-discos. Cada extracto se enfrentó contra la cepa microbiana de origen clínico *Enterococcus faecalis* ATCC: 7080. Ya que el *Enterococcus faecalis* es uno de los principales microorganismos principalmente asociado al fracaso del tratamiento endodóntico. Se estudiaron tres tipos de algas dando como resultado que la especie del alga *Heterocontophyta* mostró mayor actividad antimicrobiana en comparación con las otras dos especies estudiadas (*Clorophyta*, *Rodophyta*)

Los resultados del presente trabajo permiten afirmar que la especie *Rodophyta* y *Heterocontophyta* inhiben el crecimiento del *Enterococcus faecalis* ATCC: 7080 con halos inhibitorios de  $46.56\text{mm}^2$  y  $66.47\text{mm}^2$  respectivamente, en la prueba de pocillos. Tales resultados fueron significativamente proporcionales a la cantidad de extracto de alga obtenida, lo cual indica que a mayor concentración de polvo de alga mayor será el efecto de las mismas.

## II. INTRODUCCIÓN

Con el 72% de la tierra cubierta por los océanos, no es sorprendente que las plantas marinas desempeñen una importante función en las cadenas alimenticias del mundo. La humanidad ha empezado a considerar recientemente a los océanos como una posible fuente de energía y materia orgánica. Las plantas marinas son básicas para realizar estudios de este tipo. Aun así, el conocimiento que se tiene de las plantas marinas, tanto de formas macroscópicas como microscópicas es limitado. Solo hasta hace poco se han comenzado a utilizar los vastos recursos presentes en las comunidades marinas. Durante mucho tiempo los ambientes marinos han sido considerados como de importancia secundaria y se han utilizado como lugares de descarga para los desechos terrestres. <sup>(42)</sup>

El medio ambiente marino es un excepcional reservorio de compuestos naturales bioactivos, el cual demuestra características estructurales y químicas que no se encuentran en los productos naturales terrestres. <sup>(43)</sup>

Los organismos marinos son considerados una importante fuente de sustancias con potencial bioactivo. En este sentido, numerosas revisiones señalan a las algas como una fuente de principales productores de estos compuestos.

Los principales compuestos bioactivos producidos por las algas están formados por una amplia gama de metabolitos secundarios, cada una con una función específica dentro de su medio, atribuyéndole entre otras, la defensa química contra herbívoros marinos. <sup>(44)</sup>. Ellos desarrollan una estrategia química de defensa para asegurarse de supervivencia y para sintetizar moléculas activas. <sup>(41)</sup>

El potencial antibacteriano de las algas se debe a su capacidad de sintetizar, entre otros, a los diterpenos en las algas verdes, terpenos halogenados en las algas rojas y metabolitos mixtos de origen terpeno-aromático en las algas pardas. <sup>(43)</sup>



Muchas sustancias marinas han sido obtenidas de las algas marinas para su uso en área de la salud, ficocoloides, alginato, carragenean, agar estos usados por décadas en la medicina y farmacéutica.<sup>(44)</sup>

El hombre utiliza las algas marinas macroscópicas (multicelulares) en diferentes formas. Estas plantas son fuentes directas de alimento, medicamentos, forraje y fertilizantes y se usan como fuentes de sales y ficocoloides así como también para la producción de papel.

Los chinos y japoneses han utilizado a las algas marinas para tratar la gota y otros problemas glandulares desde el año 300 a. C. Los romanos usaron las algas marinas para curar heridas, quemaduras y salpullido, mientras que los ingleses utilizaron Phorphyra para prevenir el escorbuto. <sup>(42)</sup>.

El *Enterococcus faecalis* es una bacteria que constituye tan solo un pequeño porcentaje de la microflora inicial dentro de los conductos radiculares necróticos; sin embargo, una vez establecido intraradicularmente, el microorganismo es capaz de sobrevivir y demostrar resistencia hacia los efectos antibacterianos del hidróxido de calcio <sup>(3)</sup> por lo anterior nace la inquietud de conocer el efecto de las macroalgas marinas como fuente de medicación natural antibacteriana contra el *Enterococcus faecalis* y poder ser utilizado como una alternativa a la medicación intraconducto.

### III. ANTECEDENTES

#### CAPITULO 1 ENTEROCOCCUS FAECALIS

##### 1.1 Generalidades

Es una bacteria en forma de coco dispuesta en cadenas o pares, grampositiva anaerobia facultativa, inmóvil no esporulada, que ha atraído la atención de diversos investigadores porque ha sido identificada como una causa de fuente de infección frecuente del sistema de conducto radiculares. <sup>(1)</sup>

Aunque múltiples factores contribuyen a los fracasos endodónticos, la literatura sugiere que su persistencia dentro del conducto radicular o en infecciones secundarias son causas de mayor fracaso en el tratamiento de conductos radiculares. Es considerado uno de los microorganismos más comunes en sobreponerse a la obturación del sistema de conductos con lesiones periapicales persistentes. <sup>(2)</sup>

El *Enterococcus faecalis* constituye solo un pequeño porcentaje de la microflora inicial dentro de los conductos radiculares necróticos; sin embargo, una vez establecido intraradicularmente, el microorganismo es capaz de sobrevivir y demostrar resistencia hacia los efectos antibacterianos del hidróxido de calcio. <sup>(3)</sup>

Los reportes indican que su prevalencia en conductos radiculares infectados sin tratar es relativamente baja. <sup>(1-3)</sup> Independientemente de su localización radiográfica. <sup>(4)</sup> En contraste, de acuerdo con reportes de estudios de cultivo, es considerada la especie que mayormente abunda en dientes con fracaso endodóntico, <sup>(5-6)</sup> además de suprimir la acción de los linfocitos. Aunado a esto, es posible que forme el biofilm aumentando su resistencia para no ser destruido, llegando a ser la bacteria mil veces más resistente a la fagocitosis, anticuerpos y antimicrobianos. <sup>(4)</sup>

Con respecto a la preparación biomecánica, la instrumentación e irrigación con 5.25% de hipoclorito de sodio puede reducir las concentraciones bacterianas, pero no eliminar al *Enterococcus faecalis* del sistema de conductos radiculares. <sup>(7)</sup>

Por lo anterior, En el presente proyecto se pretende conocer el efecto de las macroalgas marinas como fuente de medicación natural antibacteriana contra el *Enterococcus faecalis* y poder ser utilizado como una alternativa a la medicación intraconducto.

## 1.2 Cepas y Grupos

Los *Enterococcus* son cocos gram positivos que pueden aparecer únicos, en pares o cadenas cortas, son anaerobios facultativos y poseen la capacidad de crecer en presencia o ausencia de oxígeno. <sup>(7-8)</sup> Las especies de *Enterococcus* viven en grandes cantidades [ $10^5$  -  $10^8$ ] en el lumen del intestino humano y bajo la mayoría de las circunstancias no causan ningún daño al hospedador, también se presenta en el tracto genital femenino y en menor cantidad en la cavidad oral. <sup>(9)</sup> Catabolizan una cantidad variada de fuentes de energía incluyendo carbohidratos, glicerol, malatos, citratos, arginina, agmatina y una gran cantidad de ácidos Alfa-quetooácidos. <sup>(6)</sup> El *Enterococcus* sobrevive a medios ambientes extremos alcalinos de pH (9.6) y a concentraciones salinas. <sup>(7,10)</sup> Ellos pueden resistir a sales biliares, detergentes, metales pesados, etanol, azide y desecación. <sup>(6)</sup> Ellos pueden crecer en un rango de 10 a 45°C y sobrevivir a temperaturas de 60°C por 30 minutos. Existen actualmente 23 especies de *Enterococcus* y estos son divididos en 5 grupos basados en la interacción con el manitol, sorbosa y arginina. El *E. faecalis* pertenece al mismo grupo que el *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. mundtii* y *E. gallinarum*. Estas 5 especies forman ácidos en caldo de manitol e hidrolizan arginina; sin embargo, fracasan en la formación de ácidos en caldo de sorbosa. <sup>(7,11)</sup> A continuación se muestra una tabla con la caracterización de las especies de *Enterococcus* en base a sus características fenotípicas

**TABLA I Caracterización de Especies de Enterococcus**

<b>GRUPO</b>	<b>ESPECIE</b>
<b>Grupo I</b> (+)Formacion acida en cando de manitol (+)Formación de acido de sorbosa (-) Hidrólisis de arginina	E.avium E.gilvus E.malodoratus E.pallents E.pseudoavum E.raffinosis E. saccharolyticus
<b>Grupo II</b> (+)Formacion acida en cando de manitol (-)Formación de acido de sorbosa (+)Hidrólisis de arginina	<b>E.faecalis</b> E.faecium E.casseliflavus E.gallinarum E.mundtii Lactococcus sp.
<b>Grupo III</b> (-)Formación acida en cando de manitol (-)Formación de acido de sorbosa (+) Hidrólisis de arginina	E.dispar E.durans E.hirae E.porcinus E. ratti
<b>Grupo IV</b> (-)Formación acida en cando de manitol (-)Formación de acido de sorbosa (-) Hidrólisis de arginina	E.asini E.cecorum E. sulfurous
<b>Grupo V</b> (+)Formación acida en cando de manitol (-)Formación de acido de sorbosa (-) Hidrólisis de arginina	E.columbae vagococcus sp.

\*Adaptación de Teixeira y Facklam <sup>(10)</sup>

## **C A P I T U L O 2.- PREVALENCIA SECUNDARIA EN INFECCIONES DEL CONDUCTO RADICULAR y SU IMPORTANCIA EN ENDODONCIA**

El *E. faecalis* es un habitante normal de la cavidad bucal, está asociado con diferentes formas de enfermedades peri radiculares incluyendo infecciones endodónticas primarias e infecciones persistentes.<sup>(12)</sup> En la categoría de enfermedades endodónticas primarias, el *E. faecalis* está asociado con lesiones peri radiculares asintomáticas crónicas significativamente más frecuente que con periodontitis peri radicular aguda o abscesos apicales agudos, se encuentra en 4 del 40% de infecciones endodónticas primarias.<sup>(13)</sup> Sin embargo, su frecuencia en las lesiones peri radiculares persistentes ha demostrado ser mucho más alta. De hecho, en casos de fracaso de tratamiento endodóntico es 9 veces más probable de contener *E. faecalis*, que en casos de infecciones primarias.<sup>(7)</sup>

Estudios han demostrado que la prevalencia de su presencia en conductos obturados con lesiones peri radiculares esta ponderada en un rango de 24 al 77%.<sup>(3-5, 7, 14-15)</sup> Este amplio rango de prevalencia podría estar relacionado con las diferentes técnicas de identificación, diferencias geográficas o tamaño de las muestras.

**TABLA II Prevalencia del E. faecalis en raíces de conductos radiculares obturados con periodontitis apical. (Rocas et. al) <sup>(7)</sup>**

<b>Autor / Año</b>	<b>Número de conductos dentales obturados en estudio</b>	<b>Número de raíces dentales obturadas con crecimiento bacteriano</b>	<b>Prevalencia de E. faecalis</b>	<b>Método de detección</b>
Engström 1964 (24)	54	21	5/21=24%	Cultivo
Möller 1996 (25)	264	120	34/120=28%	Cultivo
Molander et al. 1998 (3)	100	68	32/68=47%	Cultivo
Sundqvist et al. 1998 (4)	54	24	9/24 = 38%	Cultivo
Peciuliene et al. 2000 (26)	25	20	14/20 = 70%	Cultivo
Peciuliene et al. 2001 (27)	40	33	21/33= 64%	Cultivo
Hancock et al. 2001 (5)	54	33	10/33 =33%	Cultivo
Pinheiro et al. 2001(28)	60	51	27/51 =53%	Cultivo
Pinheiro et al. 2003(29)	30	24	11/24 = 46%	Cultivo
Siqueira y Rocas 2004 (30)	22	22	17/22 =77%	PCR

Gomes et al. 2004 (31)	19	19	6/19 =32%	Cultivo
Rocas et al. 2004 (7)	30	30	20/30 = 67%	PCR

## 2.1 Supervivencia y Factores de Virulencia

*E. faecalis* posee ciertos factores de virulencia incluyendo enzimas líticas, citolizinas, sustancias de agregación, phorphiromonas y ac. Lipoteicoico <sup>(7)</sup>. Se ha demostrado que la adherencia de células hospedadoras, expresan proteínas que permiten competir con otras células bacterianas, y alterar la respuesta del hospedador <sup>(7,16)</sup>. *E. faecalis* puede suprimir la acción de linfocitos y potencializar la contribución del fracaso endodóntico <sup>(17)</sup> *E. faecalis* no está limitado a la posesión de varios factores de virulencia y es posible que se compartan rasgos de esta entre las especies, además contribuyen a la supervivencia y capacidad de causar enfermedad <sup>(18)</sup>. Este factor podría o no contribuir a las características innatas del *E. faecalis* de causar enfermedad, porque es menos dependiente de los factores de virulencia, esto se basa más en la capacidad para sobrevivir y persistir como unos patógenos en los conductos radiculares de los dientes <sup>(7)</sup>.

El *E. faecalis* supera los retos de supervivencia dentro del sistema de conductos radiculares de diferentes maneras, por ejemplo, a través de la exposición generalizada de Phorphiromonas genéticas. <sup>(19)</sup> Estas poseen proteasa sérica, gelatinasa y proteína de unión de colágeno (ACE), el cual ayuda a enlazarse a la dentina. <sup>(20)</sup> Una pequeña cantidad invade y vive dentro de los túbulos dentinarios. Tiene la capacidad de soportar periodos prolongados de inanición hasta que se disponga de un adecuado suplemento nutricional. <sup>(21)</sup> El suero, el cual se origina del hueso alveolar y del ligamento periodontal también ayuda al *E. faecalis* a unirse al colágeno tipo 1. <sup>(13)</sup> En los túbulos dentinarios se ha demostrado que resiste a la medicación intraconducto de hidróxido de calcio por más de 10 días.

(21,22) También contribuye a la formación de biopelícula ayudando a resistir la destrucción por las bacterias para convertirse mil veces más resistentes a la fagocitosis, anticuerpos y antimicrobianos.



### C A P I T U L O 3.- PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN

*E. faecalis* puede ser identificado además por la prueba de arabinosa, telurita y piruvato. El *E. faecalis* es arabinosa negativo excepto por algunas variantes atípicas, es el único miembro del grupo para utilizar piruvato y para tolerar telurita. <sup>(23)</sup> Resientes técnicas moleculares se han desarrollado para una identificación exacta y rápida de las especies de *Enterococcus*.

La mayoría de estos métodos son basados en el Acido Nucleico involucrando el análisis de PCR que es seguido por un análisis electroforético de productos de PCR, probando, secuenciando o ambos. <sup>(24)</sup> Análisis aplicados aleatoriamente de DNA polimórficos (RAPD) y electroforesis de campo pulsado en gel (PFGE) son técnicas que han sido utilizadas para identificar las variaciones en la secuencias del DNA y han sido empleadas en la determinación de varios subtipos de *E. faecalis*. <sup>(25,26)</sup>

La reacción en cadena de polimerasa (PCR) es actualmente el método más predecible para la detección de *E. faecalis*. <sup>(27,28)</sup> Este método demuestra ser más rápido, más sensible, y más exacto que el método de cultivo. Estas técnicas microbiológicas moleculares mejoran la sensibilidad de detección microbiana en comparación con el cultivo, y por tanto, permiten la identificación de *Enterococcus* con mayor precisión. Los cebadores de PCR amplifican una secuencia de ADN 112 pb del genero de *Enterococcus* spp.11 Los genes codifica el factor de elongación Tu, que es un constituyente esencial del genoma bacteriano. En estudios previos realizados, estos cebadores identificaron correctamente 159 *Enterococcus* clínicamente aislados. <sup>(25)</sup> Ha sido posible para los investigadores detectar las bacterias que son difíciles y en algunos casos imposibles de ser detectadas. Cuando se comparo la detección del *E. faecalis* por cultivo (24-70%), *E. Faecalis* se encontró en porcentajes más altos y consistentes (67-77%) cuando el método de PCR fue usado. <sup>(7)</sup> El método basado en espectroscopia óptica ha sido también estudiado como forma de detectar la actividad del *E. faecalis*. <sup>(29)</sup> Y

es posible que este sistema de detección puede ser usado para un monitoreo rápido de presencia o ausencia de *E. faecalis* en el conducto radicular. <sup>(26)</sup>

### 3.1 Métodos de Erradicación

Muchos estudios han sido dirigidos hacia los hallazgos y las maneras efectivas de erradicar y prevenir el *E. faecalis*, desde la entrada del acceso hasta el espacio del conducto radicular. El *E. faecalis* puede llegar a entrar dentro del sistema de conductos radiculares durante el tratamiento, entre diferentes citas o aun después de que el tratamiento ha sido completado.<sup>(7)</sup> Es por ello que resulta importante considerar los regímenes para eliminar o prevenir infección del *E. faecalis* durante cada fase del tratamiento. La preparación biomecánica de la porción apical, ayudara a la eliminación de microorganismos en los conductos y en el sistema de conductos, al alcanzar áreas que no son normalmente accesibles por limas apicales pequeñas. <sup>(30)</sup> Esto proporciona un potencial para remover bacterias en los espacios intratubulares y abrir los túbulos dentinarios para permitir la entrada del agente antimicrobiano para penetrar con mayor efectividad.

La preparación biomecánica utilizando hipoclorito de sodio al 5.25% puede reducir las concentraciones bacterianas, pero no puede eliminar el *E. faecalis* del sistema de conductos radiculares. <sup>(31)</sup>

El hipoclorito de sodio es una base ( $\text{pH} > 11$ ). La efectividad antimicrobiana basado en su alto pH (acción del ión hidroxilo) muy similar al mecanismo de acción del hidróxido de calcio. Algunos estudios *in vitro* han demostrado que el hipoclorito en altas concentraciones es más efectivo contra *E. faecalis* y *Candida albicans*. El hipoclorito de sodio en altas concentraciones a pesar de ser más toxico, se recomienda debido a las anatomías confinadas de los sistemas de conductos brindando una mayor tasa de éxito. <sup>(31)(28)</sup>

El empleo del EDTA tiene una pequeña actividad antimicrobiana pero es importante su capacidad para remover la porción inorgánica del lodo dentinario

con la finalidad de permitir a otros irrigantes poder aumentar su grado de penetración hacia los túbulos dentinarios. <sup>(32,33)</sup> También la solución de ácido cítrico AL 10% remueve el lodo dentinario teniendo un pequeño efecto contra el *E. faecalis*. Sin embargo, un 0.1% de solución de Benzoato sódico añadido a 10% de Ac. Cítrico incrementara la capacidad de eliminar al *E. faecalis*. <sup>(34,35)</sup> MTAD, es una mezcla de isómero de tetraciclina, un ácido y un detergente que ha demostrado su capacidad en destruir el *E. Faecalis* en estudios pre eliminatorios al ser utilizado como irrigante intraconducto. <sup>(36,37)</sup> Esta eficacia esta atribuida a su actividad anticlagenasa, bajo pH y su capacidad de ser liberada gradualmente. El efecto del MTAD es mejorado cuando alternativamente es empleado hipoclorito de sodio al 1.3% como irrigante durante la instrumentación. <sup>(38)</sup>

El empleo de la Clorhexidina, es un agente antimicrobiano de amplio espectro, activo contra bacterias, debido a su naturaleza catiónica, la clorhexidina dependiendo de su concentración puede actuar como bacteriostático o como bactericida, a altas concentraciones actúa como detergente dañando la membrana celular, esto causando precipitación del citoplasma y por lo tanto un efecto bactericida. La clorhexidina tiene la capacidad de adherirse a las proteínas como al albumina, la acción reversible de la clorhexidina y la liberación de esta permite el efecto de sustentabilidad la cual esta depende de la concentración de la clorhexidina previniendo la colonización de bacterias.

En una concentración al 2% en gel o líquida, es eficaz en la reducción o la completa eliminación del *E. faecalis* del espacio de conducto radicular y sistema de conductos. <sup>(40-41)</sup> Un enjuague de 2 minutos a una concentración al 2% se puede usar para remover el *E. faecalis* de la capa superficial de los túbulos dentinarios. Mientras que la empleada en gel a la misma concentración es efectiva en la eliminación completa del *E. faecalis* de los túbulos dentinarios por más de dos semanas. <sup>(39)</sup> Cuando la clorhexidina y el hidróxido de calcio son llevados a una temperatura de 46°C su efecto antimicrobiano aumenta más que a temperatura ambiente. Sin embargo, se ha demostrado que la clorhexidina no es

efectiva en la eliminación *Enterococcus faecalis* viables cuando esta se agrupa en biofilm y en los túbulos dentinarios del sistema de conductos radiculares. <sup>(40)</sup>

El empleo del hidróxido de calcio como medicación intraconducto es ineficaz en contra del *E. faecalis*. Reportes mencionan que el yoduro potásico podría ser más eficaz como agente intraconducto que el hidróxido de calcio. <sup>(39)</sup>

## **C A P I T U L O 4.- MACROALGAS MARINAS**

Las algas marinas son plantas fotosintéticas no vasculares que contienen clorofila a y poseen estructuras reproductoras simples.

Con el 72% de la tierra cubierta por los océanos, no es sorprendente que las plantas marinas desempeñen una importante función en las cadenas alimenticias del mundo.

El conocimiento que se tiene de las plantas marinas, tanto de formas macroscópicas como microscópicas es limitado, y solo hasta hace poco se han comenzado a utilizar los vastos recursos presentes en la comunidades marinas. Durante mucho tiempo los ambientes marinos han sido han sido considerados como de importancia secundaria y se han utilizado como lugares de descarga para los desechos terrestres.

### **4.1 Uso de las Algas Marinas**

El hombre utiliza las algas macroscópicas (multicelulares) en diferentes formas, estas plantas son fuente directa de alimentos, medicamentos, forraje y fertilizantes y también como fuentes de sales y ficocoloides (Bonotto, 1976) y para la producción de papel. Con la actual crisis energética, las algas se empiezan a considerar como fuentes de metano combustible. Las mas empleadas por el ser humano son las algas pardas y rojas, ya que son las más abundantes y debido a sus estudios previos que han demostrado tener propiedades tanto antimicrobianas como de uso industrial.<sup>42)</sup>

## 4.2 Algas Marinas en la Medicina

Los chinos y los japoneses han utilizado las algas marinas para tratar la gota y otros problemas graduales desde el año 300 a. C. Los romanos usaron algas marinas para curar heridas, quemaduras y salpullido. Los ingleses utilizaron *Phorphyta* para prevenir el escorbuto en los viajes largos, y *Chondrus* para tratar varios malestares internos.

En la actualidad pocas algas marinas se usan en la medicina, aunque algunas formas de ficocoloides se utilizan para tratar úlceras (agar, carragenina). Los ficocoloides también se usan para cubrir las píldoras y para producir cápsulas de liberación retardada. El agar es de gran importancia para el cultivo de las bacterias, como lo descubrió Robert Koch en 1881. <sup>(42)</sup>

## 4.3 Actividad Bioactiva de las Algas Marinas.

Los organismos marinos son considerados como una importante fuente de sustancias con potencial bioactivo. En este sentido numerosas revisiones señalan a las algas como uno de los principales productores de estos compuestos (Bhakuni y Silva, 1974; Faulkner, 1989, Stein y Borden, 1984; Glombitzia y Koch, 1989; Hay, 1996; González y Silva, 2001). <sup>(43-44)</sup>

Los principales componentes bioactivos producidos por las algas marinas están formados por una amplia gama de metabolitos secundarios cada una con una función específica dentro de su medio, atribuyéndosele entre otras la defensa química contra herbívoros marinos (Hay et al., 1987a; 1987b; Paul et al 1987; Pereira et al, 1994). Estos metabolitos también están asociados a la disminución de epifitos, inhibiendo a los organismos competidores y patógenos microbianos (Hay, 1996; Vlachos et al 1997). <sup>(45,46)</sup>

El potencial antibacteriano de las algas se debe a su capacidad para sintetizar, entre otros, a los dieterpernos en las algas verdes, terpenos halogenados en las algas rojas y metabolitos mixtos de origen terpeno-aromático en las algas pardas

(Bhakuni y Silva, 1974; Fenical, 1975; Vlachos et al, 1997; Carvalho y Roque, 2000).<sup>(47,48)</sup>

Estudios realizados en diferentes partes del mundo confirman que los exudados de algunas especies de Chlorophyta, Phaeophyta y Rhodophyta presentan actividad antimicrobiana (Caccamese et al., 1980; Rao y Parekh, 1981; Vlachos et al 1996;1997) [Claudio Magallanes, César Cordova y Rita Orozco].<sup>(43)</sup>

Los metabolitos secundarios o primarios de esos organismos podrían estar compuestos de interés para la industria farmacológica. Su atención especial ha sido reportada por su actividad antiviral, anti-bacterial y actividad anti-fúngica relacionado con las algas marinas en contra de varios patógenos.<sup>(41,49,50)</sup>

### III.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La pulpa dental, que tiene por función primordial la formación de dentina, mantiene una íntima relación histopatológica y fisiopatológica en las enfermedades pulpares como periradiculares:

Dichas enfermedades implican un alto riesgo que puede llegar a la pérdida del órgano dentario. En estas podemos observar una serie de variables y, de esta forma, el tratamiento indicado puede representar desde una propuesta de tratamiento conservador (el inflamación reversible) hasta el tratamiento radical como la extracción dental.

Dentro de estas enfermedades, la pulpitis reversible causa una respuesta dolorosa momentánea a los cambios térmicos, que cesa tan pronto como el estímulo (generalmente el frío) cesa. Sin embargo, la pulpitis irreversible causa una respuesta dolorosa que tarda en recuperarse después que el estímulo haya cesado (generalmente frío). En niños, se presenta la pulpitis hiperplásica, que es el crecimiento del tejido pulpar, de color rojizo y en forma de coliflor, alrededor de una exposición cariosa. De las enfermedades referidas, se puede llegar a la necrosis pulpar, que resulta de la ausencia del aporte sanguíneo a la pulpa.

Dentro de las patologías periapicales, la Periodontitis Apical es un trastorno inflamatorio de etiología microbiana, causada principalmente por la infección de los conductos radiculares en diferentes dimensiones, los agentes etiológicos físicos, químicos y bacterianos pueden determinar la formación de un absceso dento alveolar agudo o crónico, donde son determinantes los factores de etiología microbiana. Tal enfermedad tiene repercusiones como: dolor a la masticación, percusión y palpación periapical, exudado purulento alrededor del ápex, y hasta un granuloma, el cual es una transformación progresiva del tejido periapical y del hueso alveolar en tejido de granulación con el fin de promover una zona de contención biológica y reparar las estructuras lesionadas <sup>(.48, 49)</sup>



Para dar respuesta a tales problemas de enfermedad, el procedimiento de elección es la Endodoncia, la cual involucra el tratamiento vital y necrótico de la pulpa dental para mantener el órgano dentario.

Dentro del tratamiento endodóntico, la irrigación y medicación intraconducto juegan un papel fundamental, encaminado a eliminar los remanentes de bacterias después de la instrumentación biomecánica de los conductos radiculares. La irrigación de los conductos radiculares, nos permite mantener el conducto radicular aséptico de microorganismos, y la instrumentación e irrigación con 5.25% de hipoclorito de sodio y la medicación intraconducto con hidróxido de calcio pueden reducir las concentraciones bacterianas, pero no eliminar al *Enterococcus faecalis* del sistema de conductos radiculares. <sup>(50,51)</sup>

El *Enterococcus faecalis*, ha sido asociado de diferentes maneras en las enfermedades radiculares: en el 40% de las infecciones endodónticas primarias el *Enterococcus faecalis* es uno de los microorganismo más frecuentes <sup>(32)</sup>. Además de ser capaz de suprimir la acción de los linfocitos, contribuye en cierta forma al fracaso del tratamiento endodóntico, sumado a la posibilidad de formar el biofilm que ayuda a aumentar la resistencia para no ser destruido, llegando a ser la bacteria 1000 veces más resistente a la fagocitosis, anticuerpos y antimicrobianos. <sup>(51)</sup>

Ante la problemática que este microorganismo representa en el tratamiento endodóntico, se hace necesario la búsqueda de alternativas para su favorecer su eliminación, motivo por el cual el presente estudio, pretende responder la siguiente pregunta de investigación: ¿Los extractos de las macroalgas *Clorophyta*, *Rhodophyta*, *Heterokontophyta* tienen algún efecto antimicrobiano sobre el *Enterococcus faecalis* in vitro?

#### IV.- JUSTIFICACIÓN

Es necesario realizar estudios que nos permitan la búsqueda de nuevos compuestos de interés biomédico, a partir de fuentes naturales como son las macroalgas, a las que se les ha descrito actividades biológicas importantes como la antimicrobiana, y que pueden representar una alternativa terapéutica específica contra ciertos tipos de microorganismos y de menor costo.

De esta manera, con el presente estudio se pretende conocer esa nueva alternativa, específicamente con los extractos de dichas macroalgas marinas, para que puedan ser utilizadas ya sea como medicación intraconducto o durante la irrigación.

Lo anterior, tendrá como objetivo proponer una alternativa para erradicar microorganismos, con especial atención al *Enterococcus faecalis* reportado en la literatura como uno de los microorganismos de mayor presencia en lesiones persistentes que conducen al fracaso endodóntico.

Además, esta línea de investigación se genera porque no existen reportes en la literatura sobre su uso como antimicrobianos en la práctica en el área de endodoncia, ni como alternativa en la terapia endodóntica en lo que respecta a su uso como medicación intraconducto y/o irrigante endodóntico.

## V.- OBJETIVOS

### **Objetivo General**

Conocer si los extractos de las macroalgas Clorophyta, Rhodophyta, Heterokontophyta tienen algún efecto antimicrobiano ante el *Enterococcus faecalis* in vitro

### **Objetivos Específicos**

#### **Obtención del Extracto de las Algas**

- Recolección de las algas a estudiar
- Limpiar y secar las algas en estudio
- Moler y almacenar las algas (ya molidas y secas)
- Mezclar el polvo de las algas con etanol al 80%, y calentar la mezcla
- Filtrar la mezcla previamente calentada
- Agregar 5 ml de etanol al 80% a la mezcla filtrada

#### **b) Conocer el Efecto Antimicrobiano del Extracto de las Algas**

- Adicionar 10 ml de TSA en una caja Petri hasta que solidifique
- Adicionar 5 ml de TSA inoculado con 0.1 ml de TSB con *Enterococcus faecalis*
- Hacer pocillos de 6 mm en el agar utilizando un sacabocado
- Adicionar 50 µl del extracto de las algas en los pocillos inoculados
- Poner un pocillo testigo con etanol al 80%
- Dejar reposar 30 minutos para su difusión
- Incubar a 37°C por 24 horas

- Hacer las pruebas por cuatriplicado
- Medir los halos para conocer el efecto antimicrobiano con un vernier

## VI.- HIPÓTESIS

**Hi:** Los extractos de las macroalgas Clorophyta, Rhodophyta, Heterokontophyta *sí* tienen algún efecto antimicrobiano ante el *Enterococcus faecalis* in vitro

**Ho:** Los extractos de las macroalgas Clorophyta, Rhodophyta, Heterokontophyta *no* tienen algún efecto antimicrobiano ante el *Enterococcus faecalis* in vitro

## VII.- MÉTODOS Y MATERIALES

### 1. Obtención de las Muestras

Para la elaboración del presente estudio, se recolectaron 3 tipos de macro algas marinas del golfo y pacífico de México entre el periodo de enero agosto del 2013. La colecta de estas algas fue realizada con el apoyo del estudiante de maestría en ecología del politécnico Julio Adolfo Acosta Calderón de la reserva de la biosfera en Sian Ka'an, quien me proporcionó las muestras para su estudio.

### 2. Recolección y Procesamiento del Material Biológico

Se recolectaron las plantas completas manualmente, las macroalgas marinas representativas de la *Rodhophyta*, *Heterocontophyta*, *Clorophyta*.

El material algal recién extraído se transporto fresco al laboratorio, donde cada muestra se sometió a una limpieza manual para eliminar arena, epifitos y fauna acompañante; se lavó con agua corriente y enjuagó con agua destilada. Luego las algas se secaron durante 24 horas bajo luz artificial a 24 horas a temperatura ambiente hasta que las algas estuvieran completamente secas.

### 3. Cepa Bacteriana

En el presente estudio se trabajó con 1 cepa bacteriana de interés clínico en endodoncia *Enterococcus faecalis* ATCC: 7080 comercializado por: DIBICO S.A. de C.V.

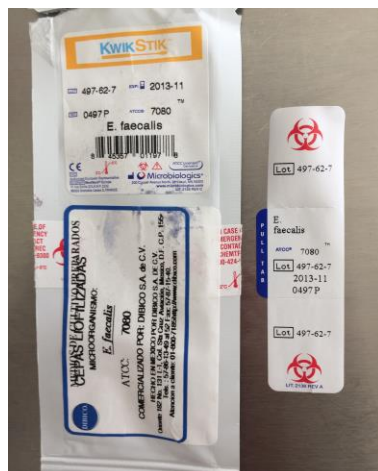


Ilustración 1 Fig. 1Cepa bacteriana *Enterococcus faecalis*.

#### 4. Extracción Etanólica de Sustancias Bioactivas de Macroalgas Marinas

Las algas secas fueron pre molidas manualmente. Posteriormente se molieron en un mortero hasta obtener un polvo fino. Cada muestra se almaceno a  $-25^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su empleo.

El proceso inicial de la extracción se realizó siguiendo el proceso de Vlachos et al. (1996). Se mezclaron 10.9gr y 20ml de etanol al 80%, luego se calentó a  $80^{\circ}\text{C}$  en una manta eléctrica durante 4 horas, se filtro en papel Whatman #1 y el volumen del extracto recuperado se enrasó a 5ml adicionando etanol al 80%.

Para evaluar la efectividad de los protocolos se realizó un ensayo experimental a fin de estandarizar las medidas y el método de extracción etanólica de las algas. Finalmente los sensidiscos fueron sumergidos dentro del extracto algal obtenido para la impregnación de la sustancia activa del alga por 24hrs. Posteriormente fueron retirados y secados a temperatura ambiente por otras 24 hrs.



Ilustración 2 Fig.2 Polvo del alga (pesaje)



Ilustración Fig3. Equipo de Reflujo

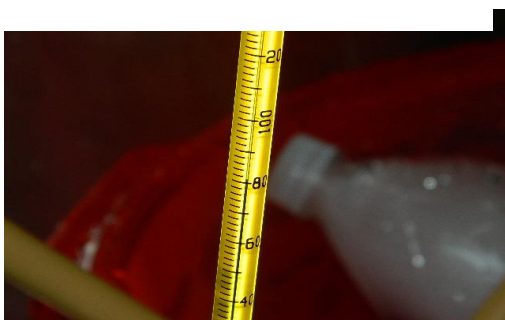


Ilustración Fig.3 Temperatura  $80^{\circ}\text{C}$



Ilustración Fig.4 Etanol al 80% con alga



**Ilustración 3 Fig.5 Filtración del extracto obtenido, con papel Whatman # 3**



**Ilustración Fig.6 Extracto algales y controles (alcohol al 86% ) sensidiscos embebidos por 24hrs.**



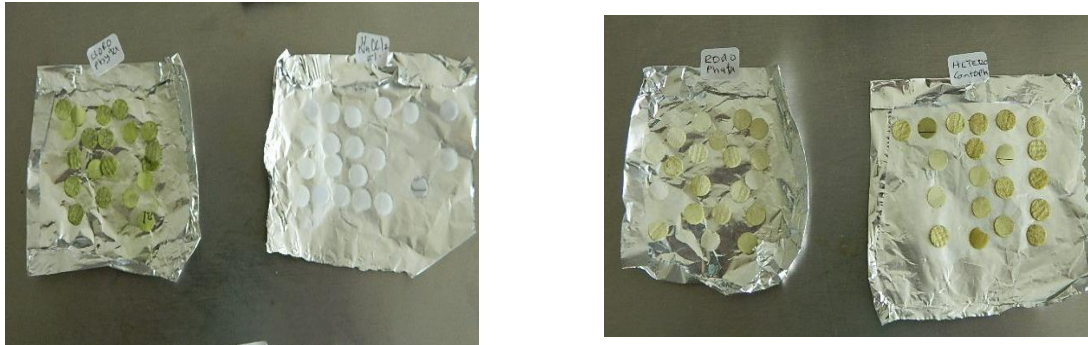


Ilustración Fig8. Sensidiscos con extracto de alga, listo para su uso.

## 5. Preparación del Medio de Cultivo y Determinación de la Actividad Antimicrobiana de los Extractos Algales.

La actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos se evaluó empleando la técnica de difusión de agar. La siembra de las cepas se realizó mediante el método de doble capa. Se adicionó 10ml de TSA (agar tripticasa de soya) en cajas petri, luego de solidificado el medio se agregó una segunda capa de agar que consistía de 5ml de agar TSA licuado (5ml), previamente inoculado con la cepa patrón (0.1ml de caldo de TSB de 24hrs) encubado en una estufa a temperatura 37°C. Posteriormente con un sacabocado estéril se hicieron 4 pocillos de 6mm de diámetro aproximadamente sobre el agar. En cada pocillo se adicionaron 50µl del extracto algal. Además, se utilizó un pocillo con etanol al 80% como control en cada ensayo. Las placas se dejaron por 30min a temperatura ambiente para permitir la difusión del extracto. Finalmente, las cajas Petri se incubaron a 37°C por 24horas.

Las pruebas se realizaron por cuatriplicado para cada especie de alga. Además también se realizó con el hipoclorito de sodio al 2.5% y con Clorehexidina al 2% al igual con un pocillo control de etanol al 80%.

La presencia de un halo de inhibición fue definida alrededor del pocillo con extracto lo cual indicó actividad antibacteriana positiva.

La lectura de las placas se realizó después de las 24hrs. Se midieron 4 halos de cada diámetro empleando un vernier. Los valores obtenidos se promediaron hallándose el diámetro promedio que fue utilizado como índice de actividad antibacteriana, utilizando la siguiente formula,  $A=\pi D^2/4$  para obtener el área total.



Ilustración Fig.9 Estufa de siembra *E. Faecalis*.



Ilustración Fig 10. Temperatura estufa 37°C



Ilustración Fig. 11 *E. faecalis* reproducidos

## VIII.- RESULTADOS



Ilustración Fig. 12. Halos de inhibición pocillos

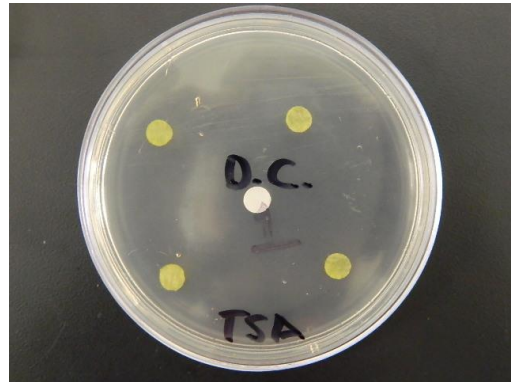


Ilustración Fig. 13 Halos de inhibición sensidiscos

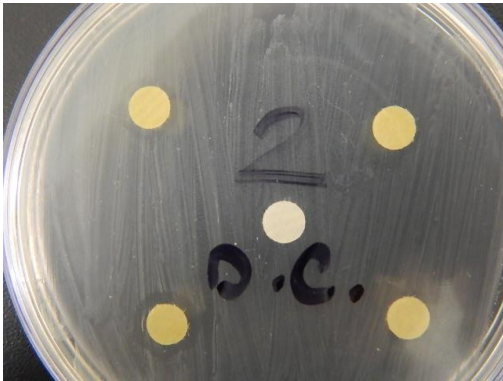


Ilustración Fig. 14 *Heterokontophyta*



Ilustración Fig. 15. Halos de inhibición



Ilustración Fig. 16 sensidiscos *Heterocontophyta*

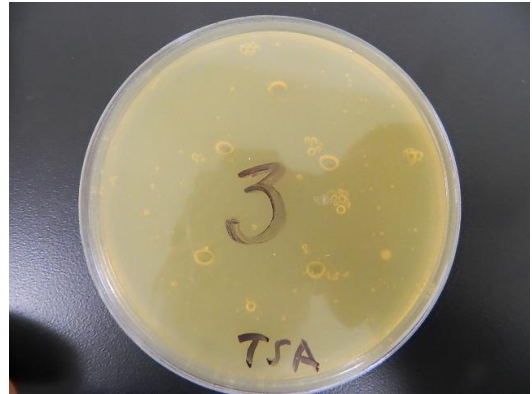


Ilustración Fig. 17 Pocillos *Heterocontophyta*



Ilustración Fig. 18 Halo sensidiscos Hipoclorito

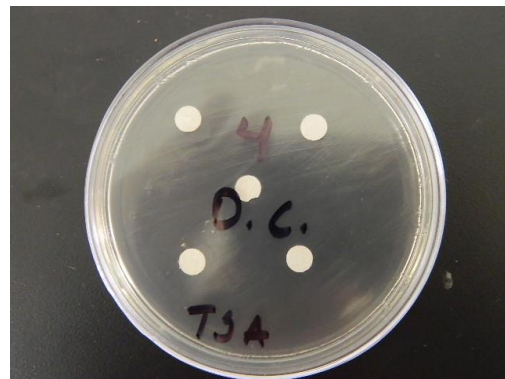
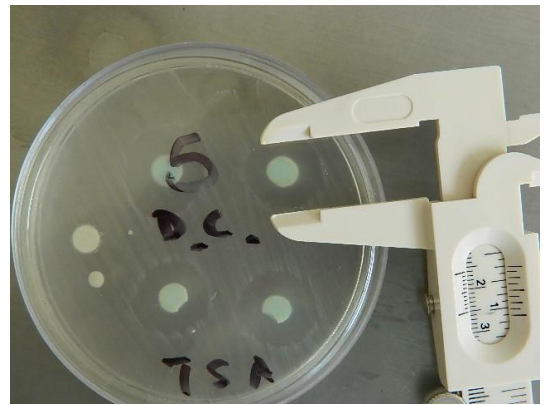


Ilustración 4Fig. 19 Halo pocillos hipoclorito



**Ilustración Fig. 20. Halos de Inhibición  
Clorhexidina Pocillos**



**Ilustración Fig. 21. Halos Clorhexidina  
Sensidiscos**

## IX.- TABLAS Y FIGURAS

**TABLA 1.- Descriptiva de las variables de estudio**

<b>VARIABLES</b>	<b>VALOR MÍNIMO</b>	<b>VALOR MÁXIMO</b>	<b>MEDIA</b>	<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR</b>
Clorophita pocillo	45.56	47.56	46.56	1
Heterocontophita pocillo	22.16	67.47	44.3131	21.45918
Hipoclorito pocillo	26.18	79.54	52.36	25.35361
Clorhexidina pocillo	75.66	227.98	151.32	73.25919
Clorophita discos	0	0	0	0
Heterocontophita discos	21.2	64.62	42.4111	20.54193
Hipoclorito discos	94.5	284.52	188.9667	91.53549
Clorhexidina discos	84.82	255.46	169.64	82.12813

**Tabla 2.- Diferencias de medias (Prueba t) entre los grupos: a) Sensidiscos, b) pocillos**

VARIABLES	MEDIAS	DIFERENCIAS DE MEDIAS	VALOR DE P (SIGNIFICANCIA)
Clorophyta pocillos Clorophyta discos	46.56 0	46.56	.000***
Heterokontophyta pocillos Heterokontophyta discos	44.3131 42.4111	1.902	0.33
Hipoclorito pocillos Hipoclorito discos	52.36 188.9667	-136.60667	.000***
Clorhexidina pocillos Clorhexidina discos	151.32 169.64	-18.32	.000***

$P \leq 0.000$ \*\*\*

Al comparar el efecto del extracto del alga marina *Clorophyta* contra el *E. faecalis* en pocillos Vs Sensidiscos se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.000$ ) entre ambas pruebas.

Al comparar el efecto del extracto del alga marina *Heterocontophyta* contra el *E. faecalis* en pocillos Vs Sensidiscos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Al comparar el efecto del hipoclorito contra el *E. faecalis* en pocillos Vs Sensidiscos se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.000$ ) entre ambas pruebas. Al comparar el efecto de la clorhexidina contra el *E. faecalis* en pocillos Vs sensidiscos se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.000$ ) entre ambas pruebas.

## X.- DISCUSIÓN

La actividad antimicrobiana de las algas puede ser influenciada por algunos factores como son el hábitad y la temporada de la colecta del alga, los diferentes estadios de desarrollo de la planta, los métodos experimentales etc.

Los trabajos dirigidos para evaluar el potencial antibacteriano de extractos algales, mencionan que el proceso de extracción en caliente con etanol ofrece mayores ventajas en la obtención de sustancias bioactivas (Rao y Parekh 1981, González et al.2001). Así también, la adición del extracto en pocillos realizados en el agar es un método, que a diferencia del uso de discos de papel, concentra una mayor cantidad de extracto, facilitando la evaluación de su potencial antibacteriano (Vlachos et al.,1997).<sup>(43)</sup>

Trabajos anteriores han demostrado que el efecto antimicrobiano de las algas ha sido positivo como las *G. doryphora*, *A. durvillaei*, *P. decipiens*, *Phaeophyta* y *B.plumosa*, son productoras de sustancias bioactivas con efecto antibacteriano <sup>(40)</sup>.

La mayoría de las investigaciones realizadas con extractos crudos de algas marinas mencionan una gran actividad contra bacterias gram positivas, entre las cuales se menciona *S. aureus* que es considerada como una de las especies más susceptibles a los exudados y extractos algales <sup>(41)</sup>. Al momento de la realización del estudio, no se encontraron reportes en la literatura para contrastarlos con la información obtenida en el presente estudio.

Anteriormente (Magallanes et al., 2003) evaluó la actividad antibacteriana de extractos etanólicos de 12 especies de macroalgas marinas contra 12 cepas bacterianas entre las que se destacó el *E. faecalis* con interés clínico y endodóntico en nuestro caso, presentando efecto antibacteriano. En el presente trabajo se realizó la obtención de las sustancias bioactivas de las macroalgas marinas con un medio solvente como fue el etanol al 80%, y se utilizó la cepa bacteriana *E. faecalis* ATCC 7080 esta última con interés clínico principalmente en



el área endodoncia, para evaluar específicamente a esta bacteria obteniendo resultados favorables en su erradicación.

## XI.- CONCLUSIONES

El extracto de las algas *Heterokontophyta*, *Clorophyta* y *Rodofhyta*, fueron evaluados y estudiadas su efecto antimicrobiano contra el *E. faecalis*. El Extracto etanólica mostró una buena actividad antibacteriana contra la especie bacteriana estudiada. El crecimiento del *E. faecalis* fue inhibida principalmente por la alga de especie *Heterokontophyta*, en ambas pruebas tanto en la prueba de pocillos y sensidiscos, mientras que las otras dos especies de algas marinas mostraron menor efecto en ambas pruebas respectivamente. La prueba de pocillos mostró mayor efecto que la de sensidiscos. Aún con los resultados encontrados, el efecto de la Clorhexidina e hipoclorito aun pareció ser mayor, ya que el efecto del alga es proporcional a la concentración de polvo de alga disuelta con el solvente; es decir; a mayor porcentaje de polvo de alga mayor efecto antimicrobiano.

## **XII.- SUGERENCIAS**

Se recomienda realizar más estudios al respecto con las algas estudiadas así como con otras cepas, analizar sus diferentes tipos de concentraciones y además realizar el mismo estudio pero en biofilm y enfocar su estudio en el área odontológica, especialmente el área de la endodoncia para determinar cuáles serían sus principales usos y probables campos de acción.

Continuar con esta línea de investigación hasta poder lograr llevarla a prueba clínicamente en el ámbito endodóntico ya sea como medicación intraconducto o como medio de irrigación del sistema de conductos radiculares.

### XIII.- BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Pardi G, Guilarte G, Cardozo E, Briceño E. Detección de *Enterococcus faecalis* en dientes con fracaso en el Tratamiento Endodóntico. *Acta Odontologica*. 2009, 47: 1- 11
- 2.- Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 2002;35:221-8.
- 3.- Hoelscher A, Babcall J, Maki J. In vitro Evaluation of the antimicrobial effects of a root canal sealer- Antibiotic combination Against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics*. 2006, 32:2; 145-50.
- 4.- Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling in the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1997; 30:297-306.
- 5.- Siqueira JF Jr, Rôcas IN, Rm de Uzeda M, Colombo AP. Actinomyces species streptococci, and *E. faecalis* in primary root canal infections. *J Endod* 2002;28:168-72.
- 6.- Stuart C, Schwartz S, Beeson T, Owatz C. *Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts In Reatreatment. *Journal Of Endodontics*. 2006, 32:2; 93-97
- 7.- Russel S, Joyce P. A, Steven R, B. Buxton T, Liewehr. An in Vitro evaluation of the antibacterial efficacy of chlorhexidine on *E. faecalis* in bovine incisors. *JOE* 2005;31(9):672-674
- 8.- Gilmore Ms. The Enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. Washington: ASM Press, 2002.
- 9.- Rôcas IN, Siqueira JF, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004;30:315-20.
- 10.- Koch S, Hufnagel M, Theilacker C, Huebner J. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine* 2004;22:822-30.
- 11.- Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Pathogenic Enterococci: new development in the 21 st century. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:2622-36.
- 13.- Teixeira LM, Facklam RR. Enterococcus. In: Murray PR, ed. *Manual of clinical*

microbiology, 8th ed. Washington: ASM Press, 2003:422–33.

14.- Engström B. The significance of Enterococci in root canal treatment. *Odontol Revy* 1964;15:87–106.

15.- Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:71– 6.

16. Love RM. *Enterococcus faecalis*: a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001;34:399 – 405

17.- Lee W, Lim S, Son H, Bae K. Sonicated extract of *Enterococcus faecalis* induces irreversible cell cycle arrest in phytohemagglutinin-activated human lymphocytes. *J Endod* 2004;30:209 –12.

18. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of Enterococci. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:462–78.

19.- - Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB. Prevalence, phenotype, and genotype of oral Enterococci. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:95–101.

20. Hubble TS, Hatton JF, Nallapareddy SR, Murray BE, Gillespie MJ Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:121– 6.

21. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G, Starvation survival, , growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:234 –9.

22. Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 1990;6:142–9.

23. Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987;66:1375–9.

24. Facklam RR, Carvalho MGS, Teixeira LM. History, taxonomy biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of Enterococci. In Gilmore MS, ed. *The Enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. Washington: ASM Press, 2002:1–54.

25. Dautle MP, Ulrich RL, Hughes TA. Typing and subtyping of 83 clinical isolates purified from surgically implanted silicone feeding tubes by random amplified polymorphic DNA amplification. *J Clin Microbiol* 2002;40:414 –21.

26. Mato R, de Lencastre H, Roberts RB, Tomasz A. Multiplicity of genetic backgrounds among vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates recovered from an out break in a New York City Hospital. *Microb Drug Resist* 1996;2:309–17.
27. Molander A, Lundquist P, Papapanou PN, Dahlen G, Reit C. A protocol for polymerase chain reaction detection of *Enterococcus faecium* from the root canal. *Int Endod J* 2002;35:1–6.
28. Siqueira JF, Rocas IN PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontics pathogens. *J Dent* 2003;31:333–9.
29. Kishen A, Chen NN, Tan L, Asundi A. Chairside sensor for rapid monitoring of *Enterococcus faecalis* activity. *J Endod* 2004;30:872–5.
30. Card SJ, Sigurdsson A, Orstavik D, Trope M. The effectiveness of increased apical enlargement in reducing intracanal bacteria. *J Endod* 2002;28:779–83.
31. Baumgartner JC, Siqueira JF Jr, Xia T, Rôças IN. Geographical differences in bacteria detected in endodontic infections using polymerase chain reaction. *J Endod* 2004;30:141–4.
32. Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, Moles DR, Spratt DA. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *J Endod* 2005;31:30–6.
33. Torabinejad M, Shabahang S, Aparecio RM, Kettering JD. The antimicrobial effect of MTAD: an in vitro investigation. *J Endod* 2003;29:400–3.
34. Bystrom A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J* 1985;18:35–40.
35. Barroso Ldos S, Habitante SM, Jorge AO, Faria Ida S. Microorganisms growth in endodontic citric-acid solutions with and without microbiological stabilizer. *J Endod* 2004;30:42–4.
36. Shabahang S, Torabinejad M. Effect of MTAD on *Enterococcus faecalis* – contaminated root canals of extracted human teeth. *J Endod* 2003;29:576–9.
- 37.- Torabinejad M, Cho Y, Khademi AA, Bakland LK, Shabahang S. The effect of various concentrations of sodium hypochlorite on the ability of MTAD to remove the smear layer. *J Endod* 2003;29:233–9.

- 38.- Safavi K, Spangberg L, Langeland K. Root canal dentinal tubule disinfection. J Endod 1990;16:207–10.
39. Vahdaty A, Pitt Ford TR, Wilson RF. Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules in vitro. Endod Dent Traumatol 1993;9:243– 8.
40. Basrani B, Santos J, Tjaderhane L, et al. Substantive antimicrobial activity in cloherexidine - treated human root dentin. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod 2002;94:240 –5.
41. Gomes B, Souza S, Ferraz C, et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. Int Endod J 2003;36:267–75.
42. Clinton J. Dawes “Botanica Marina” edit. Limusa S.A. de C.V. 1986. Primera Edición. México D.F. p.p 1-608
- 43.- Magallanes C. Cordova C. Orozco R. Actividad antimicrobiana de extractos etánolicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú. Rev. Perú. Biología. 2003, 10(2): 125-132
- 44- Ríos N, Medina G. Jimenez J, Yanez C, Bernardo M, Gualther M. Actividad antibacteriana y antifungica de extractos de algas marinas y Venezolanas. Rev. Perú. Biol. 2009
- 45- Johnsi G, Lipton A, Aishwarya, Sarika, Udayukumar A. Antibacterial activity of aqueous extract from selected macroalgae of southwest coast of india. Seaweed Res.Utiln.2011,33(1y2):67-75
- 46.- Vijayabaskar P. Shiyamala V. Antibacterial activities of brown marine algae(*surgassum wightii* and *Turbinaria ornate*) from the gulf of mannar biosphere reserve. Adv. In Biological research. 2011, 5(2):99-102.
- 47.- Zbakh H, Chiheb H, Bouziane H, Motilva V, Riadi H. Antibacterial Activity of bentic marine algae extracts from the Mediterranean coast of Morolco. J of Microbiology and Science. 2012, 2(1):219-228
- 48.- Manilal, Sujith S, Selvin J, Shakir C, Seghal G. Antibacterial activity of *Falkenbergia hillebrandii* (born) from the Indian coast against human pathogens. Int. JOEB, 2009, 78: 161-166.
- 49.- Akgul R. Bican T. Akgul F. Antimicrobial Activities of some marine algae and some Cyanobacteria from cankkale (Turkey). JABU.2013, 4(3):35-40.

50.- Liao w. Lin J, Shieh Y, Jen L, Huang R. Antibiotic Activity of lectins from marine algae against marine vibrios. J. Ind Microbiol Biotechnol.2003, 30:433-439.

51. Vera J, Martinez R. Medicación intraconducto. Revisión bibliográfica Endodoncia. 2009, 17;3:10-15.

52.- Stephen Cohen, Richard C. Burns. Vías de la pulpa. 7a Edición. Editorial Mosby,199. Madrid España. P.p. 35-80



## **XIV.- ANEXOS**

**“Efecto antimicrobiano de tres tipos de algas marinas contra el *E. faecalis*.”**

C.D. Calderón-Ricoy Oscar Manuel\*, D.C.S.P. Visoso-Salgado Angel\*<sup>∞</sup>, D. en I.  
De la Rosa-Gómez Isaías\*, M. en C. Acosta-Calderón Julio Adolfo\*, E. en E.  
Jiménez-Valdés Brissa Itzel\*

\*Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología

<sup>∞</sup>Autor de correspondencia: Facultad de Odontología; Paseo Tolloca Esq. Jesús  
Carranza, Col. Universidad, Toluca Estado de México, C.P. 50130.  
[avisosos@uaemex.mx](mailto:avisosos@uaemex.mx), (722) 3228612.

## RESUMEN

**Introducción:** El *Enterococcus faecalis* constituye parte de la microflora inicial dentro de los conductos radiculares con fracaso endodóntico,<sup>(1)</sup> Sin embargo, no existen reportes de combatir dicho microorganismo con extracto de algas.

**Objetivo:** Conocer si los extractos de las macroalgas Clorophyta, Rhodophyta, Heterokontophyta tienen algún efecto antimicrobiano ante el *Enterococcus faecalis* in vitro.

**Materiales y métodos:** En el presente estudio experimental se elaboraron los extractos etanólicos de 3 algas: Clorophyta, Rodophyta y Heterocontophyta, para conocer su efecto contra el *Enterococcus faecalis* ATCC: 7080 con el método de Vlachos,<sup>(2)</sup> con dos protocolos de estudio 1) pocillos, y 2) sensidiscos).

**Resultados:** Sólo dos de las tres algas estudiadas tuvieron efecto antibacteriano: *Clorophyta* y *Heterocontophyta*, y el protocolo de estudio donde se obtuvo el mejor efecto antimicrobiano fue el de pocillos.

**Conclusiones:** El mayor efecto se obtuvo con la Clorophyta, y con el protocolo de pocillos.

**Palabras clave:** *E. faecalis*, *Clorophyta*, *Heterocontophyta*, Antimicrobiano

## ABSTRACT

**Introduction:** The *Enterococcus faecalis* is part of the initial microflora within the root canal with endodontic failure,<sup>(1)</sup> However, However, there are no reports to control this microorganism with seaweed extract.

**Objective:** To determine if the extracts of Clorophyta, Rhodophyta and heterokonts macroalgae, have some antimicrobial effect in vitro against *Enterococcus faecalis*.

**Materials and methods:** In this experimental study, were prepared 3 ethanol algae extracts: Clorophyta, Rodophyta and Heterocontophyta, in order to know their effect against *Enterococcus faecalis* ATCC 7080 by the method of Vlachos,<sup>(2)</sup> with two protocols: 1 ) wells, and 2) sensidiscs).

**Results:** Only two of the three algae studied had antibacterial effect: Clorophyta and Heterocontophyta, and the best study protocol was obtained from wells.

**Conclusions:** The greatest effect was obtained with the Clorophyta, and the best protocol was from wells.

**Keywords:** *E. faecalis*, Clorophyta, Heterocontophyta, Antimicrobial

Toluca, Estado de México, a 27 de marzo de 2014.

**LIC. JUAN MANUEL ROBLES**

**BLVD. ADOLFO LÓPEZ MATEOS No. 1384**

**COL. STA. MA. NONOALCO, C.P. 03700**

**MÉXICO, D.F.**

**robles@odontologíaactual.com**

Yo, C.D. Oscar Manuel Calderón Ricoy primer autor, confiero por medio de este documento la autorización a la Editorial Ripano para publicar o difundir a través de los medios físicos o electrónicos (conocidos y por conocer), el artículo titulado "Efecto antimicrobiano de tres tipos de algas contra el *Enterococcus faecalis*," producto de nuestra actividad académica e investigativa en la Universidad Autónoma del Estado de México.

Los autores aceptan que esta autorización se hace a título gratuito y que por lo tanto, se excluye de cualquier posibilidad de retribución económica, en especie o cualquier índole por la publicación, distribución o cualquier otro uso que se haga en los términos de la presente autorización.

En constancia se firma la presente autorización el día 27 de agosto de 2014, en la Ciudad de Toluca, Estado de México.

**ATENTAMENTE**

Autor 1

NOMBRE: C.D. Oscar Manuel Calderón Ricoy

NACIONALIDAD: Mexicana

Autor de correspondencia

D.C.S.P. Angel Visoso Salgado.

[avisosos@uaemex.mx](mailto:avisosos@uaemex.mx)

## INTRODUCCIÓN

Con el 72% de la tierra cubierta por los océanos, no es sorprendente que las plantas marinas desempeñen una importante función en las cadenas alimenticias del mundo. La humanidad ha empezado a considerar recientemente a los océanos como una posible fuente de energía y materia orgánica. <sup>(3-4)</sup> Por lo que afortunadamente el campo es amplio para la realización de estudios de investigación como el presente, cuyo *propósito* es el conocer si los extractos de las macroalgas Chlorophyta, Rhodophyta, y Heterokontophyta tienen algún efecto antimicrobiano ante el *Enterococcus faecalis* in vitro.

Considerando que el *Enterococcus faecalis* constituye parte de la micro flora inicial dentro de los conductos radiculares con fracaso endodóntico, una vez establecido intraradicularmente, el microorganismo es capaz de sobrevivir y demostrar resistencia hacia los efectos antibacterianos del hidróxido de calcio.<sup>(1)</sup> Por lo que se ha reportado en estudios que esta especie, es considerada la que mayormente está presente en dientes con fracaso endodóntico, <sup>(5-6)</sup> además de suprimir la acción de los linfocitos.

Lo anterior adquiere relevancia ante el escaso conocimiento que se tiene de las plantas marinas en el área de la odontología y en particular en el área de Endodoncia. Ya que sólo hasta tiempos recientes se han comenzado a utilizar los vastos recursos presentes en las comunidades marinas. <sup>(7)</sup>

Los principales compuestos bioactivos producidos por las algas están formados por una amplia gama de metabolitos secundarios, cada una con una función específica dentro de su medio, atribuyéndole entre otras funciones, la defensa química contra herbívoros marinos. <sup>(8)</sup> Sin embargo, no se ha reportado el efecto que estos compuestos bioactivos de las algas tienen sobre el *Enterococcus faecalis*, lo cual es el motivo del presente trabajo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de las algas estudiadas (Clorophyta, Rhodophyta, Heterokontophyta) fueron proporcionadas por el laboratorio de ficología del Instituto Politécnico Nacional, y obtenidas de la reserva de la biosfera de Sian´an ka Quintana Roo entre el periodo de enero – agosto del 2013.

Las algas fueron recolectadas de forma manual, y posteriormente transportadas frescas al laboratorio del Instituto Politécnico Nacional donde fueron lavadas con agua corriente y despojadas de arena, epifitos y restos de fauna acompañante, se lavaron con agua corriente y se enjuagaron con agua destilada. Posteriormente las algas fueron secadas a temperatura ambiente durante 24 horas.

Las algas una vez secas fueron premolidas manualmente. Posteriormente fueron molidas hasta obtener un polvo fino con un mortero, y cada muestra fue almacenada a una temperatura de  $-25^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización.

El proceso inicial de la extracción etanólica se realizó utilizando el proceso de Vlachos et al. Se pesaron en balanza granataria 10.9 gr. de polvo de cada tipo de alga, cada una de las muestras por separado fueron mezcladas con 20 ml de etanol al 80%, el cual fue calentado a una temperatura de  $80^{\circ}\text{C}$  en una manta eléctrica durante 4 horas mediante el proceso del sistema de reflujo.(Fig. 1) Posteriormente, el contenido se filtró en papel Whatman del # 1 y el extracto recuperado fue almacenado en tubos de ensaye hasta el momento de su uso.(Fig. 2)



Fig. 1. Sistema de reflujo: manta eléctrica a temperatura de  $80^{\circ}\text{C}$  para la obtención del extracto de las algas en estudio.



Fig. 2. De izquierda a derecha se observa: a) Extracto de alga Rodophyta, b) Heterocontophyta, c) Clorophyta, d) alcohol al 80%.

Para evaluar la efectividad de los protocolos de extracción etanólica, esta se realizó de dos formas: 1) una de doble capa con pocillos y 2) De una sola capa con sensidiscos.

Con el fin de estandarizar las medidas se realizó un ensayo para el método de extracción etanólica de las algas. Posteriormente los sensidiscos fueron sumergidos dentro del extracto algal obtenido en cada uno de las muestras para la impregnación de la sustancia activa del alga por 24 horas. Estos fueron retirados y secados a temperatura ambiente por 24 horas.

La preparación del medio de cultivo para la cepa bacteriana se realizó mediante el método de doble capa, el cual consistió en adicionar 10ml de TSA (agar tripticasa de soya) en Cajas Petri, después de gelificado el medio se agregó una segunda capa de agar que consistía en 5ml de agar TSA licuado con (5ml) previamente inoculado con la cepa patrón *Enterococcus faecalis* ATCC: 7080 comercializado por: DIBICO S.A de C.V. (0.1ml de caldo de TSB de 24 horas), incubado en una estufa eléctrica a 37°C por 24 horas(Figura 3) para la reproducción de la bacteria.(Fig. 4)



Fig 3. Estufa eléctrica: inoculación de caldo de TSB inoculado con la bacteria *E. faecalis* a 37°C.

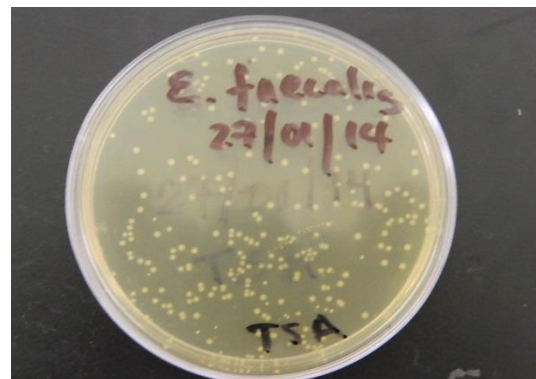


Fig. 4. *Enterococcus faecalis* en medio de crecimiento TSA.

Una vez agregado y gelificado el medio con un sacabocados estéril, se hicieron 5 pocillos de 6mm de diámetro aproximadamente sobre el agar, de los 5 pocillos 4 fueron inoculados con el extracto algal con una pipeta (50µl en cada pocillo y un pocillo control el cual fue inoculado con etanol al 80%). Las cajas Petri se dejaron por 30 minutos a temperatura ambiente para permitir la difusión del extracto y posteriormente se incubaron a 37°C por 24 horas. Cada prueba fue realizada por cuatuplicado por cada extracto de alga.(Fig. 5)

También fue evaluada la actividad antimicrobiana del extracto del alga con el método de sensidiscos, (Fig 6.) el cual consistió en preparar el medio de cultivo con 10ml de (TSA) del mismo modo antes mencionado. Una vez gelificado, se procedió a la siembra de la cepa de interés mediante la técnica de estrías con un

hisopo. La cual una vez sembrada, se colocaron los sensidiscos de cada extracto de alga y uno de etanol al 80% como control en cada caja Petri previamente embebidos por 24 horas del extracto del alga e incubado en una estufa eléctrica a 37°C por 24 horas. Cada uno de los extractos se realizó por cautriplificado.

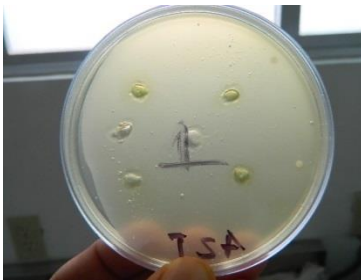


Fig 5. Pocillos con extracto de alga, el control con etanol al 80% al centro en método de doble capa.

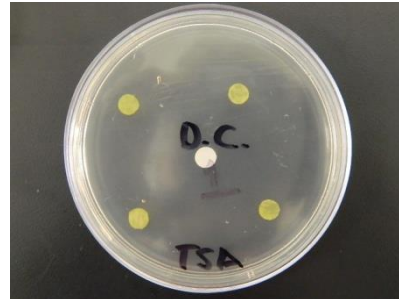


Fig 6. Método de sensidisco en una siembra de TSA con un control de etanol al 80% al centro.

La presencia de un halo de inhibición fue definida alrededor del pocillo o del sensidisco, lo cual indicó actividad antimicrobiana positiva.

La lectura de las placas se realizó después de las 24 horas. Se midieron halos de diferentes diámetros empelando un Vernier. (Figs. 7 y 8) La medida de los halos obtenidos se promedió utilizando la siguiente fórmula:  $A = \pi D^2 / 4$  para obtener el promedio total del halo.

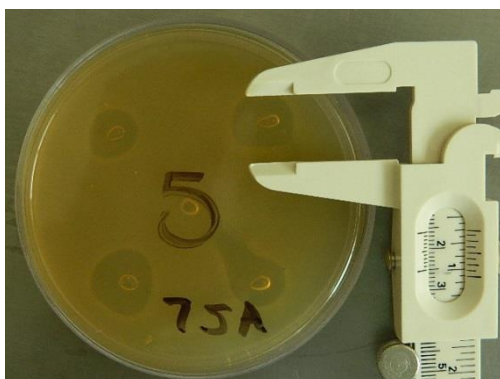


Fig. 7. Medición de los halos de inhibición con vernier, en el método de doble capa.

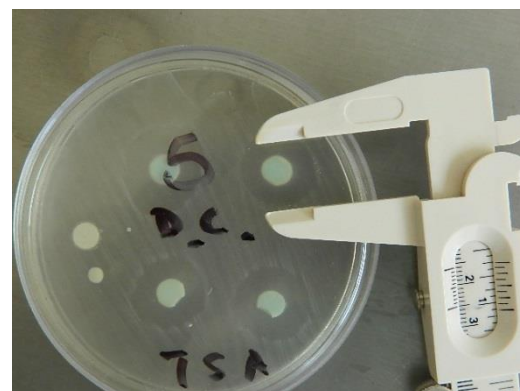


Fig. 8. Medición de halo de inhibición con vernier en el método de sensidisco.

Los datos del presente estudio fueron analizados realizando la estadística descriptiva correspondiente; así como se aplicó una t de Student (diferencia de medias). Lo anterior con apoyo del software SPSS en su Versión No. 20.



## RESULTADOS

**TABLA 1.- Descriptivas de los promedios de los halos de inhibición de las algas en estudio, tanto para protocolo de pocillos como para el protocolo de sensidiscos**

VARIABLES	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
Clorophita pocillo	45.56	47.56	46.56	1
Heterocontophita pocillo	22.16	67.47	44.3131	21.45918
Clorophita sensidiscos	0	0	0	0
Heterocontophita sensidiscos	21.2	64.62	42.4111	20.54193

**Tabla 2.- Diferencia de medias entre los grupos (Prueba t): a) protocolo de pocillos, b) protocolo de sensidiscos**

VARIABLES	MEDIAS	DIFERENCIAS DE MEDIAS	VALOR DE P (SIGNIFICANCIA)
Clorophyta pocillos Clorophyta discos	46.56 0	46.56	.000***
Heterokontophyta pocillos Heterokontophyta discos	44.3131 42.4111	1.902	0.33

$P \leq 0.000^{***}$

El halo de efecto de las algas contra en *Enterococcus faecalis* de mayor promedio se obtuvo con el alga *Clorophyta* con el método de pocillos.(Tabla 1)

Al comparar el efecto del extracto del alga marina *Clorophyta* contra el *E. faecalis*, en pocillos Vs Sensidiscos se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.000$ ) entre ambos métodos, teniendo mejores resultados del efecto del alga con el método de pocillos. (Tabla 2)

Al comparar el efecto del extracto del alga marina *Heterocontophyta* contra el *E. faecalis*, en pocillos Vs Sensidiscos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.(Tabla 2)

## DISCUSIÓN

Para evaluar el potencial antibacteriano de extractos algales, se refiere que el proceso de extracción en caliente con etanol ofrece mayores ventajas en la obtención de sustancias bioactivas (Rao y Parekh 1981, González et al.2001). Motivo por el cual se aplicó la misma técnica.<sup>(9)</sup>

Los resultados obtenidos respecto al protocolo de difusión del extracto en pocillos realizados en el agar es un método, que a diferencia del uso de discos de papel, concentra una mayor cantidad de extracto, facilitando la evaluación de su potencial antibacteriano (Vlachos et al.,1997).<sup>(2)</sup> Información que coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio.

Trabajos anteriores han demostrado que el efecto antimicrobiano de las algas ha sido positivo como las *G. doryphora*, *A. durvillaei*, *P. decipiens*, *Phaeophyta* y *B.plumosa*, son productoras de sustancias bioactivas con efecto antibacteriano <sup>(10)</sup>.Lo cual se comprobó en el presente estudio para otro tipo de algas como la *Clorophyta*, y *Heterokontophyta*, no siendo así para el caso de la *Rhodophyta*.

Anteriormente (Magallanes et al., 2003) evaluó la actividad antibacteriana de extractos etanólicos de 12 especies de macroalgas marinas contra 12 cepas bacterianas entre las que se destacó el *E. faecalis*, presentando efecto antibacteriano. Efecto que coincide con los resultados del presente estudio, sólo que para dos diferentes tipos de algas: Clorophyta, y Heterokontophyta. <sup>(2)</sup>

No existen al momento otros reportes acerca del efecto antimicrobiano de las algas Clorophyta, y Heterokontophyta para compararlos con los resultados obtenidos en el presente estudio.

## CONCLUSIONES

El efecto antimicrobiano del extracto de las algas *Heterokontophyta*, *Clorophyta* y *Rhodophyta*, fue evaluado y estudiado contra el *E. faecalis*. Mostrándose un efecto sólo en el caso de las dos primeras algas: *Heterokontophyta*, y *Clorophyta*, y siendo este efecto mayor para el caso de la *Clorophyta*.

Utilizando el protocolo de pocillos se mostró mayor efecto que con el protocolo de sensidiscos.

Además, no podemos dejar de considerar que la actividad antimicrobiana de las algas puede ser influenciada por algunos factores como son: el hábitat y la temporada de la colecta del alga, los diferentes estadios de desarrollo de la planta, los métodos experimentales la cepa estudiada, etc. <sup>(11)</sup>

## REFERENCIAS

- (1).- Hoelscher A. Babcall J. Maki J. Invitro Evaluation of the antimicrobial effects of a root canal sealer- Antibiotic combination Against *Enterococcus faecalis*. Journal of Endodontic.2006, 32:2; 145-50.
- (2) - Ríos N, Medina G. Jimenez J, Yanez C, Bernardo M, Gualther M. Actividad antibacteriana y antifungica de extractos de algas marinas y Venezolanas. Rev. Perú. Biol. 2009
- (3). Clinton JD. Botánica Marina. México, D.F. Limusa,1986; Vol.1: 1-608
- (4) Zbakh H, Chiheb H, Bouziane H, Motilva V, Riadi H. Antibacterial Activity of bentic marine algae extracts from the Mediterranean coast of Morolco. J of Microbiology and Science. 2012, 2(1):219-228
- (5) Siqueira JF Jr, Rôcas IN, Rm de Uzeda M, Colombo AP. Actinomyces species streptococci, and *E. faecalis* in primary root canal infections. J Endod 2002;28:168-72.
- (6)- Stuart C. Schwartz S. Beeson T. Owatz C. *Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts In Reatreatment. Journal Of Endodontic.2006, 32:2; 93-97
- (7) Vijayabaskar P. Shiyamala V. Antibacterial activities of brown marine algae(*surgassum wightii* and *Turbinaria ornate*) from the gulf of mannar biosphere reserve. Adv. In Biological research. 2011, 5(2):99-102.
- (8).- Magallanes C. Cordova C. Orozco R. Actividad antimicrobiana de extractos etánolicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú. Rev. Perú. Biología. 2003, 10(2): 125-132
- (9) Johnsi G, Lipton A, Aishwarya, Sarika, Udayukumar A. Antibacterial activity of aqueous extract from selected macroalgae of southwest coast of india. Seaweed Res.Utiln.2011,33(1y2):67-75
- (10). Basrani B, Santos J, Tjaderhane L, et al. Substantive antimicrobial activity in cloherexidine - treated human root dentin. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod 2002;94:240 –5.
- (11) Saleh S. Ilah A; Hend A, Wazanani I. Antibacterial substance from marine algae isolated from Jeddah coast od Red sea, Saudi Arabia.Journal of Biological Sciences. 2014,21: 57-64.

Toluca, Estado de México, a 26 de agosto de 2014.

A QUIEN CORRESPONDA:

P R E S E N T E.

Por este medio nos permitimos informar a quien corresponda que no existe conflicto de interés alguno en el presente artículo.

Sin otro particular por el momento, nos despedimos de Ud. Enviándole un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E:

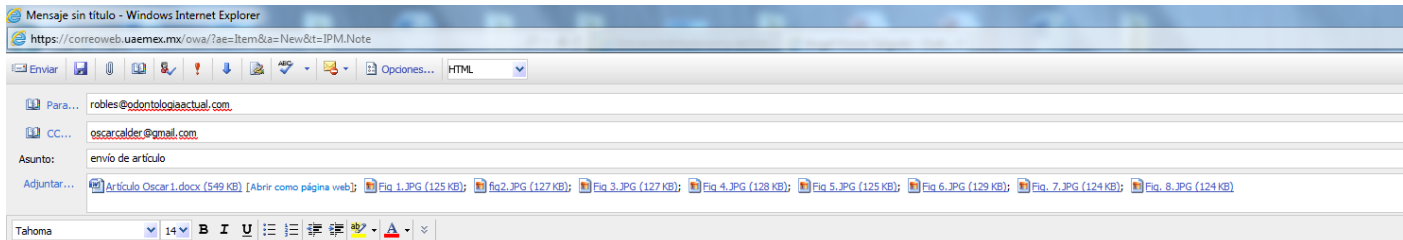
D.C.S.P. Angel Visoso Salgado

C.D.Oscar Manuel Calderón Ricoy

D. en I. Isaías de la Rosa Gómez

M. en C. Julio Adolfo Acosta Calderón

E. en E. Brissa Itzel Jiménez Valdés



-BUENA TARDE LIC. ROBLES, SOY EL DR. VISOSO. LE ENVÍO UN ARTÍCULO "EFECTO ANTIMICROBIANO DE TRES TIPOS DE ALGAS CONTRA EL ENTEROCOCCUS FAECALIS"; PARA PONERLO A SU CONSIDERACIÓN, CON LA FINALIDAD DE SU PUBLICACIÓN.

QUEDO EN ESPERO DE ACUSE DE RECIBIDO.

SALUDOS CORDIALES.



Toluca, Edo México, agosto  
2014

**M. EN C.S. SARA GABRIELA MARIA EUGENIA DEL REAL SÁNCHEZ**

Coordinadora de Posgrado

**CIEAO UAEMex**

PRESENTE.

Por medio de la presente el que suscribe **OSCAR MANUEL CALDERON RICOY** alumno de la 8ª. generación de la especialidad de Endodoncia, le informo que he concluido mi proyecto terminal titulado "**EFFECTO ANTIMICROBIANO DE TRES TIPOS DE ALGAS MARINAS CONTRA EL *ENTEROCOCCUS FAECALIS***", el cual ha sido revisado y aprobado por mi director y asesores, por lo cual le solicito de la manera más atenta me permita continuar con los trámites correspondientes para la obtención del Diploma de Especialista en Endodoncia.

Sin más por el momento quedo a sus órdenes

Atentamente:



**C.D. Oscar Manuel Calderón Ricoy**



**UAEM**

Universidad Autónoma  
del Estado de México

Toluca, Méx., Septiembre 03 de 2014

**C.D. OSCAR MANUEL CALDERON RICOY**  
**ALUMNO EGRESADO DE LA ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

La que suscribe, M. EN C.S. Sara Gabriela María Eugenia del Real Sánchez, Coordinadora de Posgrado de la Facultad de Odontología por medio de la presente, manifiesto que el alumno egresado de la Especialidad en Endodoncia; **C.D. Oscar Manuel Calderón Ricoy**, ha concluido su proyecto terminal titulado "*Efecto antimicrobiano de tres tipos de algas marinas contra el E. faecalis*", por lo que puede continuar con los trámites correspondientes para su impresión y los administrativos de expedición de diploma de la Especialidad correspondiente.

Sin más por el momento, me despido.

**ATENTAMENTE**  
**PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO**

**"2014, 70 Aniversario de la Autonomía ICLA-UAEM"**

**M. EN C.S. Sara Gabriela María Eugenia del Real Sánchez**  
Coordinadora de Posgrado  
Facultad de Odontología



c.c.p. archivo

**FO**

**FACULTAD ODONTOLOGIA**



Jesús Carranza esq. Paseo Tollocan, C.P. 50130, Toluca, Estado de México  
Tels. (722) 2 17 96 07 y 2 17 90 70. Ext. 5060



Toluca, Edo México, agosto  
2014

**M. EN C.S. SARA GABRIELA MARIA EUGENIA DEL REAL SÁNCHEZ**

Coordinadora de Posgrado

**CIEAO UAEMex**

PRESENTE.

Los que suscriben catedráticos adscritos de la Universidad Autónoma del Estado de México, y del Posgrado de Endodoncia, de la facultad de Odontología UAEMex, hacemos constar que el estudiante de la 8ª. generación **C.D OSCAR MANUEL CALDERON RICOY** ha concluido satisfactoriamente su proyecto terminal de investigación básica titulado "**EFEECTO ANTIMICROBIANO DE TRES TIPOS DE ALGAS MARINAS CONTRA EL *ENTEROCOCCUS FAECALIS***" para poder obtener su Diploma de Especialista en Endodoncia.

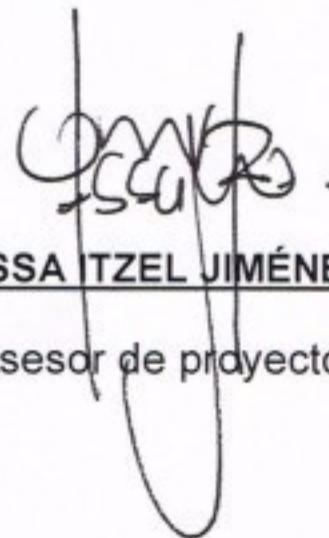
Sin otro particular por el momento, se extiende la presente constancia para los fines que más convengan al interesado.

Atentamente



DR. C.S.P. ÁNGEL VISOSO SALGADO

Director del proyecto terminal



E.E. BRISSA ITZEL JIMÉNEZ VALDES

Asesor de proyecto terminal