

Efecto antimicrobiano *In vitro* del extracto etanólico al 40 % de *Piper aungustifolium* (matico) sobre *Enterococcus faecalis*

In vitro antimicrobial effect of 40% ethanolic extract of *Piper aungustifolium* (matico) on *Enterococcus faecalis*

Juan Guillermo Bornaz Acosta^{1a}

Zenaida Inofuentes Espinoza^{2b}

Denisse Ethiel Tito Aquino^{3c}

Vanessa Lissete Bornaz Arenas^{3d}

¹ Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna, Perú.

² Investigador Independiente. Tacna, Perú.

³ Universidad Andina Néstor Cáceres Velásques. Juliaca, Perú

^a Docente, Doctor en Ciencias: Biología.

^b Cirujano Dentista.

^c Docente, Magister en Odontología.

^d Docente, Doctor en Odontología.

RESUMEN

Enterococcus faecalis es considerada una cepa con gran capacidad de adaptación y tolerancia a las condiciones de un medio adverso, siendo difícil su erradicación en una endodoncia. **Objetivo:** Estudiar el efecto antimicrobiano del extracto de *Piper aungustifolium*, más conocida en nuestro medio como *matico* sobre la cepa *Enterococcus faecalis*. **Material y Métodos:** Se realizó una siembra de la cepa ATCC 29212 (*Enterococcus faecalis*) en placas con Agar Cerebro Corazón BHI, luego se colocó en las superficies de sensidiscos de 5 mm de diámetro embebidos con las soluciones del *matico*, y se hizo 3 pozos de 5 mm de diámetro por 6 mm de profundidad, utilizándose una puntera descartable de 1 ml, previamente tratada y esterilizada para colocar el hidróxido de calcio como grupo control y *Piper aungustifolium* como grupo experimental. Para cada grupo se utilizaron 24 muestras; luego se incubaron a 37°C, a las 24, 48, 72 horas y 7 días, registrándose el diámetro de los halos. **Resultados:** Los promedios de la medida del halo inhibitorio de *Piper aungustifolium* (*matico*) fueron menores que la del hidróxido de calcio. Se aplicó posteriormente T de Student ($p < 0,05$), dando como resultado diferencia estadísticamente significativa entre los datos obtenidos para las tomas a las 24, 72 y 7 días, exceptuando aquellas a las 48 horas donde no hubo diferencia entre ambas sustancias. **Conclusiones:** La *Piper aungustifolium*, demostró tener efecto antibacteriano frente al *Enterococcus faecalis*, sus medidas fueron variadas y progresivas a través de tiempo.

Palabras Clave: Antimicrobiano, *Enterococcus faecalis*, fracaso endodóntico, hidróxido de calcio, *Piper aungustifolium*.

ABSTRACT

Enterococcus faecalis is considered a strain with great adaptability and tolerance to the conditions of an adverse environment, being difficult its eradication in a root canal. **Objective:** To study the antimicrobial effect of the extract of *Piper aungustifolium*, better known in our environment as *matico* on the *Enterococcus faecalis* strain. **Material and Methods:** A sowing of the strain ATCC 29212 (*Enterococcus faecalis*) was carried out on plates with Brain Heart infusion BHI Agar, then 5 mm diameter sensidisks embedded in the *matico* solutions were placed on the surfaces, and 3 wells were made of 5 mm diameter by 6 mm deep, using a 1 ml disposable pipette cap, previously treated and sterilized to place calcium hydroxide as a control group and *Piper aungustifolium* as an experimental group. For each group, 24 samples were used; then they were incubated at 37°C, at 24, 48, 72 hours and 7 days, registering the diameter of the halos. **Results:** The averages of the measurement of the inhibitory halo of *Piper aungustifolium* (*matico*) were lower than that of calcium hydroxide. Student's T was subsequently applied ($p < 0.05$), resulting in statistically significant difference between the data obtained for the samples at 24, 72 and 7 days, except those at 48 hours where there was no difference between the two substances. **Conclusions:** *Piper aungustifolium*, proved to have an antibacterial effect against *Enterococcus faecalis*, its measures were varied and progressive over time.

Keywords: Antimicrobial, *Enterococcus faecalis*, endodontic failure, calcium hydroxide, *Piper aungustifolium*.

Introducción

Una de las enfermedades más comunes que afecta la salud bucal es la caries dental y si llega afectar los tejidos pulpaes deberá llevarse a cabo una endodoncia como la terapia más adecuada, la cual consiste en la remoción del tejido pulpar para reparar el daño, utilizando un medicamento específico (1, 2).

La finalidad de utilizar un medicamento intraconducto es principalmente contribuir con la eliminación de los microorganismos residuales y sus toxinas, luego de la preparación biomecánica. Sin embargo, el tratamiento del conducto radicular es acompañado de características clínicas relacionadas de manera indirecta con el proceso fisiopatológico de la afección del tejido pulpar, y por los procedimientos terapéuticos que pueden alterar el objetivo de la endodoncia (3, 4).

Enterococcus faecalis es una bacteria en forma de coco dispuesta en cadenas o pares, Gram positiva, anaerobia facultativa, inmóvil y no esporulada que, en años recientes, ha atraído la atención de diversos investigadores porque ha sido identificada como una causa frecuente de infección del sistema de conductos radiculares en dientes con fracaso en el tratamiento endodóntico (3,5,6).

La medicina natural ha demostrado tener múltiples beneficios que las sustancias sintéticas producidas en laboratorio. La *Piper aungustifolium* es una planta oriunda de América del Sur, conocida con el nombre de “matico” perteneciente a la familia de las *Piperáceas* originaria del Perú. Fue clasificada por el botánico, recolector, médico y farmacéutico alemán David Heinrich Hoppe (1760-1846) (6,7). Sus poderes antimicrobianos han sido reconocidos por la medicina tradicional por trabajos preliminares utilizando extractos etanólicos y/o aceites esenciales de *Piper aungustifolium* sobre diferentes cepas como *Escherichia coli*, *Stafilococcus aureus*, *Porphyrromona gingivalis* incluido, *Enterococcus faecalis* (8,9,10).

Es importante que se sigan realizando investigaciones para determinar el efecto antimicrobiano de sustancias de origen natural para utilizarlas en el tratamiento de patologías bacterianas especialmente a nivel bucal, y sean una alternativa más en el mercado frente a productos tradicionales artificiales, las que tendrían una ventaja por generar menores efectos secundarios adversos. Estos antecedentes nos han motivado a llevar a cabo la siguiente investigación que tiene como objetivo estudiar el efecto antimicrobiano “in vitro” del extracto etanólico al 40 % de *Piper aungustifolium* sobre el cultivo de *Enterococcus faecali* comparado con el hidróxido de calcio. Los resultados obtenidos traerán

beneficios directos a los pacientes sometidos a una endodoncia por tratarse de un producto natural.

Material y métodos

El Presente trabajo de investigación fue de naturaleza longitudinal, prospectiva, experimental y comparativa

Diseño: Factorial de Grupos.

Identificación de los grupos: Los grupos fueron distribuidos en 16 placas petri, 24 muestras para cada uno de los grupos. Los cuales fueron:

- Grupo experimental: *Piper aungustifolium*,
- Grupo control: hidróxido de calcio.

Criterios Incluyentes: Cepa *Enterococcus faecalis*.

Criterios Excluyentes: Cepa contaminada de *Enterococcus faecalis*.

Descripción de la Técnica: Se utilizó como materiales: 1) la cepa ATCC 29212 (*Enterococcus faecalis*), 2) un extracto etanólico al 40 % de *Piper aungustifolium*, para el desarrollo del grupo experimental, obtenido de un macerado de hojas de matico en alcohol al 96 % durante ocho días y diluido con agua hasta obtener el porcentaje indicado (10); y una pasta de hidróxido de calcio para el grupo control.

La cepa se reactivó de sus culturas originales en 250 ml de infusión caldo cerebro – corazón BHI, luego se realizó la siembra en agar cerebro corazón BHI. Las cepas de *Enterococcus faecalis* fueron diluidas para su concentración final de 1×10^6 cels/ml para los 500 ml. Se dividió la placa en 3 partes para colocar sensibilizadores embebidos con las soluciones del matico, y se hizo 3 pozos de 5 mm de diámetro por 6 mm de profundidad, utilizándose una puntera descartable de 1 ml, previamente tratada y esterilizada para colocar el hidróxido de calcio, las placas fueron rotuladas y almacenadas en la cámara de anaerobiosis y se incubaron por un lapso 7 días durante los cuales se tomó medidas a las 24, 48, 72 y 7 días.

Resultados

El halo inhibitorio del *Enterococcus faecalis* por la *Piper aungustifolium* (matico), a las 24 horas (Tabla 1), alcanzó un diámetro de 9,03 mm, oscilando entre 8,50 mm y 9,75 mm; a las 48 horas un valor promedio de 9,35 mm, oscilando entre 8,75 mm y 9,75mm; a las 72 horas el valor promedio fue de 9,77 mm, oscilando entre 9,25 mm y 10,25 mm; y finalmente a los 7 días, el halo obtuvo un valor promedio de 9,89 mm, oscilando entre 9,50 mm y 10,25 mm.

Existen diferencias significativas entre las

medias de los halos de inhibición obtenidas a través del tiempo, lo que demuestra que existen cambios en el comportamiento del halo por la *Piper aungustifolium*

(matico), dado que el efecto aumenta conforme pasa el tiempo.

Tabla 1. Comportamiento del halo inhibitorio del *Enterococcus faecalis* por la *piper aungustifolium* (matico)

Medición	Halo (mm.)			
	Media	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo
24 horas	9,03	0,38	8,50	9,75
48 horas	9,35	0,31	8,75	9,75
72 horas	9,77	0,31	9,25	10,25
7 días	9,89	0,27	9,50	10,25

Fuente: matriz de datos. ($p < 0,05$) n s.

El halo inhibitorio del *Enterococcus faecalis* por el hidróxido de calcio, a las 24 horas (Tabla 2), alcanzó un diámetro de 9,73 mm, oscilando entre 9,25 mm y 10,25 mm; a las 48 horas el halo obtuvo un valor promedio de 9,62 mm, oscilando entre 9,25 mm y 10,00 mm; a las 72 horas el valor promedio observado del halo fue de 9,58 mm, oscilando entre 9,25 mm y 10,00 mm; y finalmente, a los 7 días el halo obtuvo un valor

promedio de 9,65 mm, oscilando entre 9,50 mm y 10,00 mm.

Estadísticamente, no existen diferencias significativas entre las medias de los halos de inhibición obtenidas a través del tiempo, lo que demuestra que no existen cambios en el comportamiento del halo por el hidróxido de calcio.

Tabla 2. Comportamiento del halo inhibitorio del *Enterococcus faecalis* por el hidróxido de calcio

Medición	Halo (mm)			
	Media	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo
24 horas	9,73	0,33	9,25	10,25
48 horas	9,62	0,25	9,25	10,00
72 horas	9,58	0,22	9,25	10,00
7 días	9,65	0,17	9,50	10,00

Fuente: Matriz de datos.

P = 0,135

Tabla 3. Comparación a las 24 horas del halo de inhibición del *Enterococcus faecalis* entre la *Piper aungustifolium* (matico) y el hidróxido de calcio

Halo (mm.)	Grupo de estudio	
24 horas	Piper aungustifolium	Hidróxido de calcio
Media	9,03	9,73
Desviación estándar	0,38	0,33
Mínimo	8,50	9,25
Máximo	9,75	10,25
Total	24	24

Fuente: matriz de datos.

P = 0,000

A las 48 horas se aprecia que, para la *Piper aungustifolium* (Tabla 4), el halo obtuvo un promedio de 9,35 mm, oscilando entre 8,75 mm y 9,75 mm; mientras que para el hidróxido de calcio el promedio llegó a un valor de 9,62 mm, oscilando entre 9,25 mm y 10,00 mm.

Según estadística, las diferencias entre ambos grupos no son significativas, por lo tanto los grupos son iguales, deduciéndose que el hidróxido de calcio y la *Piper aungustifolium* son igual de efectivos a las 48 horas.

Tabla 4. Comparación a las 48 horas del halo de inhibición del *enterococcus faecalis* entre la *piper aungustifolium* (matico) y el hidróxido de calcio

Halo (mm.)	Grupo de estudio	
	<i>Piper aungustifolium</i>	Hidróxido de calcio
48 horas		
Media	9,35	9,62
Desviación estándar	0,31	0,25
Mínimo	8,75	9,25
Máximo	9,75	10,00
Total	24	24

Fuente: matriz de datos

p = 0,054

La comparación, a las 72 horas (Tabla 5). Se obtuvo un promedio de 9,77 mm para el matico, oscilando entre 9,25 mm y 10,25 mm; mientras que para el hidróxido de calcio el promedio llegó a un valor de 9,58 mm, oscilando entre 9,25 mm y 10,00 mm. Según

la prueba estadística, las diferencias entre ambos grupos son significativas, por lo tanto, los grupos son diferentes, deduciéndose que la *Piper aungustifolium* (matico) es más efectivo que el hidróxido de calcio a las 72 horas.

Tabla 5. Comparación del halo de inhibición del *enterococcus faecalis* a las 72 horas entre la *piper aungustifolium* (matico) y el hidróxido de calcio

Halo (mm)	Grupo de estudio	
	<i>Piper aungustifolium</i>	Hidróxido de calcio
72 horas		
Media	9,77	9,58
Desviación estándar	0,31	0,22
Mínimo	9,25	9,25
Máximo	10,25	10,00
Total	24	24

Fuente: matriz de datos

P = 0,022

Comparación a los 7 días (Tabla 6). El halo obtuvo un promedio de 9,89 mm para la *Piper aungustifolium*, oscilando entre 9,50 mm y 10,25 mm; mientras que el promedio llegó a un valor de 9,65 mm para el Hidróxido de calcio, oscilando entre 9,50 mm y

10,00 mm. Según la Prueba Estadística, las diferencias entre ambos grupos son significativas, por lo tanto, los grupos son diferentes, deduciéndose que la *Piper aungustifolium* (matico) es mejor que el hidróxido de calcio a los 7 días.

Tabla 6. Comparación del halo de inhibición del *Enterococcus faecalis* a los 7 días entre la *Piper aungustifolium* (matico) y el hidróxido de calcio

Halo (mm.)	Grupo de estudio	
	<i>Piper aungustifolium</i>	Hidróxido de calcio
7 días		
Desviación estándar	0,27	0,17
Mínimo	9,50	9,50
Máximo	10,25	10,00
Total	24	24

Fuente: Matriz de datos.

p = 0,001

Discusión

El tratamiento endodóntico tiene como finalidad eliminar las bacterias de los conductos infectados y prevenir la reinfección. La preparación biomecánica reduce la microbiota en los conductos radiculares infectados; no obstante, debido a la complejidad anatómica del sistema de conductos, las bacterias, los residuos orgánicos e inorgánicos, no pueden ser completamente eliminadas y a menudo persisten en su interior (11). Por otro lado se destaca que, la eliminación de microorganismos del sistema de conductos radiculares es determinante para el éxito completo de la terapia endodóntica, particularmente en los casos de dientes con pulpa necrótica y lesión periapical (12).

En el año 2003, Pappen *et al.* (13) demostraron *in vitro* que la instrumentación mecánica por sí sola no es capaz de tornar estéril el sistema de conductos radiculares, reduciendo la infección bacteriana en apenas 50 %, reforzando la necesidad del uso de una solución irrigadora con acción antimicrobiana. En la mayoría de casos, si no se utiliza un medicamento intraconducto el porcentaje de éxito disminuye significativamente (14).

En los últimos años, la fitoterapia viene siendo utilizada cada vez más en medicina para prevenir y tratar algunas infecciones, incluidas las recurrentes en las endodoncias. Trabajos previos al nuestro han demostrado que extractos y/o aceites esenciales de algunos vegetales presentaron efecto antimicrobiano sobre sepas causantes de infecciones en el hombre. Así, en 1991, Rengifo y Roncal (15) encontraron que extractos acuoso de *Piper angustifolium* "matico" presentó efecto antibacteriano sobre *Stafilococcus aureus*, *Stafilococcus piogenes*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Pseudomonas aeruginosa*.

En 1997, Claros *et al.*, (16) utilizando el método de sensidiscos, encontraron que el extracto de *Piper angustifolium* presentó un efecto inhibitorio marcado sobre cepas de *Helicobacter pylori* (16).

En el 2009, Matute (10) evaluó el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de *Piper angustifolium* en comparación con la clorhexidina al 0,12 % sobre cepas de *Streptococcus mutans* y *Lactobacilos Casei* *in Vitro*. Los resultados obtenidos mostraron un mayor halo de inhibición sobre el *Streptococos mutans* a las 24 y 48 horas con el extracto etanólico del matico sobre estas dos sepas Gram positivas anaerobias facultativas.

En el presente trabajo se tomó como medicamento control al hidróxido de calcio porque el uso de este antibiótico se ha visto incrementado en los últimos años por sus propiedades bactericidas con

elevado pH, por su capacidad de disolución en tejidos y porque su consistencia de pasta restringe físicamente la formación de colonias bacterianas en el espacio del conducto (17,18); además, porque su actividad antimicrobiana está relacionada con la liberación de iones hidroxilos en un ambiente acuoso. Los iones hidroxilos son radicales libres altamente oxidantes que muestran reactividad extrema, reaccionando con diversas biomoléculas generando daño en las bacterias como *Enterococcus faecalis* (19, 20).

En el año 2000, Solak y Öztan evaluaron el pH de las combinaciones de hidróxido de calcio con agua destilada, que contenían dos soluciones anestésicas o solución fisiológica; demostrando que los cuatro vehículos con base acuosa mostraron cambios similares de pH entre 11 y 12, lo cual limita la proliferación de microorganismos (21, 22). Además, toda preparación acuosa de hidróxido de calcio puede mantener potencialmente su pH alto por largo tiempo en el conducto radicular (23).

Finalmente, está comprobado que el hidróxido de calcio presenta mejores efectos antibacterianos que el extracto acuoso de propóleo y que el paramonoclorofenol alcanforado. Esta comparación estableció que, en función al tiempo de observación la mejor acción del álcali, comparado con los otros principios activos (24); razón por la cual se eligió como antibiótico control al hidróxido de calcio en la presente investigación.

Los resultados de este trabajo demostraron que el extracto etanólico al 40 % de *Piper angustifolium* (matico), comparado con el hidróxido de calcio como antibiótico control, presentó un mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento y desarrollo de *Enterococcus faecalis*, especialmente, a los 7 días de incubación, mejorando su efecto inhibitorio conforme transcurre el tiempo a partir de las 72 horas.

Nuestros resultados son compatibles con los obtenidos por Matute (10) que en su trabajo de tesis encontró un mayor halo inhibitorio con extracto etanólico de *Piper angustifolium* al 50 % sobre el crecimiento y desarrollo de *Streptococcus mutans*, bacteria que es la responsable principal de las caries dentales comparado con el efecto de la cicloheximida al 2 %, que se utilizó como antibiótico control. Así mismo, es también compatible con los resultados de Rengifo (15), en 1996, trabajando con extractos acuosos de *Piper angustifolium* sobre diferentes cepas de bacterias.

La actividad imh inhibitoria del extracto de *Piper angustifolium* en el presente trabajo podría deberse a la presencia de compuestos fenólicos y triterpenoides como metabolitos secundarios, los que serían

responsables de su actividad farmacológica, también porque sus hojas y ramas contienen, ácido artánico, resinas, sustancias amargas (masticina), taninos, alcaloides, saponinas, flavonoides triterpenoides determinados en estudios fotoquímicos. Además, porque la presencia de taninos contribuirían a la actividad cicatrizante; los flavonoides, a propiedades tanto antioxidantes como protectoras de la membrana celular, y la actividad antibacteriana, a las dihidrochalconas presentes en *Piper Aungustifolium* (25).

Finalmente, los resultados obtenidos en el presente estudio están en concordancia con los estudios previos realizados con esta especie vegetal, los cuales mostraron una diferencia estadísticamente significativa en la formación del halo inhibitorio, estableciendo que el extracto al 40 % de *Piper Aungustifolium* resultó ser más eficaz sobre la inhibición de *Enterococcus faecalis* que, el eficiente medicamento intraconducto, hidróxido de calcio durante las 72 horas hasta los 7 días de incubación.

Conclusiones

- El extracto etanólico al 40 % de *Piper Aungustifolium* (matico) presentó un efecto inhibitorio sobre el crecimiento y desarrollo de *Enterococcus faecalis*, el cual va incrementando a partir de las 72 horas hasta el 7 mo día de incubación comparado con el hidróxido de calcio.
- No existen diferencias significativas entre las medias de los halos de inhibición sobre el cultivo de *Enterococcus faecalis* obtenidas a través del tiempo con hidróxido de calcio, lo cual demuestra

que no se generan cambios en el efecto del hidróxido de calcio conforme transcurre el tiempo.

- A las 24 horas, se presentaron diferencias significativas entre el extracto al 40 % de *Piper angustifolium* y el hidróxido de calcio sobre el crecimiento y desarrollo del cultivo in vitro de *Enterococcus faecalis* con diferencia a favor del hidróxido; a las 48 horas no se presentaron diferencias significativas; en cambio, a las 72 horas hasta los siete días, se presentaron diferencias significativas a favor del extracto de *Piper angustifolium*.

Recomendaciones

- Se sugiere realizar un estudio *in vivo* donde se establezca la eficacia de la *Piper Aungustifolium* (matico) como medicamento intraconducto en piezas con retratamiento endodóntico y necrosis pulpar.
- Se recomienda comprobar la eficacia de la *Piper Aungustifolium* (matico) como solución irrigante en retratamientos endodónticos y pulpas necróticas.
- Se sugiere realizar una investigación que compruebe la eficacia de la *Piper Aungustifolium* (matico) como agente antibacteriano sobre bacterias anaerobias Gram negativas resistentes en tratamientos pulpares.
- Finalmente, se recomienda establecer la eficacia de la *Piper Aungustifolium* (matico) como antibacteriano, utilizando otros procedimientos para su obtención y en comparación con medicamentos usados en odontología.

Referencias bibliográficas

1. Gonzales MA, Gonzales N. Infecciones bacterianas de origen pulpar y periodontal. Oral Med Oral Pathol Surg; 2004.
2. Portenier I, Waltimo T, Haapasalo M. Enterococcus faecalis and endash; the root canal survivor and "star" in post treatment disease. Endod Topics, 2003; 6: 135-139
3. Chong Bs, Pitt Ford Tr. The role of intracanal medication in root canal treatment. J Endod, 1992; 25: 97-06.
4. Basrani B, Ghanem A, Tjäderhane L. Physical and chemical properties of chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medications. J Endod, 2004; 30(6):413-7.
5. Hauman CH, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. Int Endod J, 2003; 36: 75-85.
6. Mahabir P. Gupta. "270 plantas medicinales iberoamericanas" programa iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo. Colombia. Convenio Andrés bello, editorial presencia ltda; 1995.
7. Herrera DR, Tay LY, Kose-Jr C, Andrade TM, Rezende EC, Kozlowski Jr VA, Santos EB. Efecto antibacteriano del hidróxido de calcio y yodoformo sobre Enterococcus faecalis y Pseudomonas aeruginosa. Rev Estomatol Herediana, 2008; 18(1):5-8.
8. Zuta N. Actividad antibacteriana in vitro de extractos de Piper angustifolium (matico) y Matricaria chamomilla (manzanilla) en cepas de ataphylococcus aureus con resistencia multiple. Instituto de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud Facultad Universidad Nacional del Callao; 2014.
9. Salamanca S, y Galiano MA. Actividad antimicrobiana de cuatro especies de Piper y elucidación estructural de sus aceites esenciales. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014.
10. Matute ME. Evaluación in vitro del extracto de Piper angustifolium (Matico) y la cicloheximida como antisépticos bucales. Tesis para obtener el

- Título Profesional de Cirujano dentista. Facultad de Odontología, Universidad Nacional Federico Villarreal; 2009.
11. Peters OA. Current challenges and concepts in the preparation of root canal systems: a review. *J Endod*, 2004; 30(3): 55-67.
 12. Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundquist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*, 1997; 30(5):297-306.
 13. Pappen F., Bolzani L., Rodríguez S., Amaral MR., TanumaniFilho M. Efecto antimicrobiano de soluciones irrigadoras utilizadas en endodoncia. *Revista Estomatológica Herediana*. Enero – Diciembre, 2003; 13 (1-2): 9-11.
 14. Siqueira Jf Jr, De Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod*, 1996; 22(12):674-6.
 15. Rengifo R, Roncal M. Ensayo de la actividad antibacteriana de los extractos acuoso y crudo de las hojas de *Piper angustifolium* L. “matico”. [Tesis Bachiller]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 1991.
 16. Claros, Bilbao, Damiani, Gonzales, Estensoro, Álvarez. Actividad Anti-*Helicobacter Pylori* de *Plantago major*, *Clinopodium bolivianum*, *Caléndula officinalis* y *Piper angustifolium* por el método de difusión de disco. *BIOFARBO* 1997; 15.
 17. Orstavik D. Medicación Intraconducto. En: Pitt Ford J, editores. *Endodoncia en la práctica clínica*. México. McGraw-Hill Interamericana; 1999. pp. 106-22.
 18. Estrela C, Pécora Jd, Souza-Neto Md, Estrela Cr, Bammann Il. Effect of vehicle on antimicrobial properties of calcium hydroxide pastes. *Braz dent j*, 1999; 10:63-72.
 19. Siqueira Jf Jr, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int endodon j*. 1999; 32: 361-369.
 20. Martínez L, Acosta H, Duarte ML. Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana del hidróxido

Correspondencia

willy_bornaz@hotmail.com

Fecha de recepción: 11 de setiembre de 2019**Fecha de aceptación:** 26 de noviembre de 2019