

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA



Estudio comparativo de la eficacia antibacteriana in vitro entre el Cloruro de Benzalconio, NaOCl al 5.25% y Nanopartículas de Plata ante el Enterococcus Faecalis.

Trabajo terminal para obtener el diploma de Especialidad en
Endodoncia

Presenta

Rocío Chávez Castillo

Presidente

Dr. Miguel Ángel Cadena Alcantar

Sinodales

Dra. Ana Gabriela Carillo Varguez

MC Nydia Alejandra Castillo Martínez

Tijuana Baja California, Abril 2015



Estudio comparativo de la eficacia antibacteriana in vitro entre el Cloruro de Benzalconio, NaOCl al 5.25% y Nanopartículas de Plata ante el *Enterococcus Faecalis*.

Trabajo terminal para obtener el diploma de Especialidad en Endodoncia

Presenta

Rocío Chávez Castillo

Presidente

Dr. Miguel Ángel Cadena Alcantar

Sinodales

Dra. Ana Gabriela Carillo Varguez

MC Nydia Alejandra Castillo Martínez

Sinodal Externo

Dr. Oscar Rene Bolaños

Abril 2015

INDICE

1. Resumen.....	
...iv	
2. Abstract.....	
.....v	
3. Introducción.....	
..1	
3.1. Antecedentes.....	
....1	
3.2. Marco	
Teórico.....	4
3.2.1. Microbiología.....	
...4	
3.2.2. Irrigantes.....	
...6	
3.2.3. Cloruro de	
Benzalconio.....	7
3.2.4. Hipoclorito de	
Sodio.....	8
3.2.5. Nanoparticulas de	
Plata.....	9
4. Justificación.....	
12	
5. Planteamiento del	
Problema.....	13
6. Hipótesis.....	
14	
7. Objetivos.....	
15	

8. Variables.....	
...16	
9. Materiales y	
Métodos.....	17
9.1. Tipo de	
Estudio.....	17
9.2. Universo de	
Estudio.....	17
9.3. Criterios de	
Inclusión.....	17
9.4. Criterios de	
Exclusión.....	18
9.5. Criterios de	
Eliminación.....	18
9.6. Metodología.....	
19	
9.7. Resultados.....	
23	
9.8. Discusión.....	
31	
9.9. Conclusiones.....	
33	
10. Anexos.....	
.34	
11. Agradecimientos.....	
36	
12. Dedicatoria.....	
...37	
13. Referencias	
Bibliográficas.....	38

1. RESUMEN

Introducción: Cuando el *Enterococcus faecalis* está presente en pequeñas cantidades, su eliminación puede ser fácil, mas sin embargo, en grandes cantidades su erradicación puede tornarse complicada. *E. faecalis* puede encontrarse en diversas formas lo cual lo convierte en un sobreviviente excepcional en el conducto radicular.

Por estas razones es trascendente conocer la sensibilidad o resistencia de *Enterococcus faecalis* frente a los diversos agentes antimicrobianos utilizados durante la terapia endodóntica.

La morfología del sistema de conductos genera dificultades al profesional para lograr el total debridamiento del contenido del conducto, ya que con la sola instrumentación manual no se tiene acceso a todas las estribaciones de éste. Por tal razón, se ve obligado a utilizar sustancias irrigantes que le permitan llegar a estas zonas con el fin de obtener una mejor desinfección del conducto radicular

Objetivo: Comparar in vitro las propiedades antibacterianas de la solución de Cloruro de Benzalconio, el Hipoclorito de Sodio y las Nanoparticulas de Plata ante el *Enterococcus Faecalis*.

Metodología: La bacteria *Enterococcus Faecalis* fue sembrada en cajas petri con agar sangre de carnero al 5%, posteriormente dicha caja fue dividida en cuatro para la colocación de sensidiscos sumergidos en Cloruro de Benzalconio, el Hipoclorito de Sodio, Nanoparticulas de Plata y Suero Fisiológico como grupo control. Las cajas petri fueron incubadas durante 24 horas, para posteriormente medir el halo de inhibición.

2. ABSTRACT

Introduction: When the *Enterococcus faecalis* is present in small quantities , their removal can be easy, but yet , in large quantities eradication can become complicated. *E. faecalis* can be found in various forms which makes it an exceptional survivor in the root canal. For these reasons it is important to know the sensitivity or resistance of *Enterococcus faecalis* against various antimicrobial agents used during endodontic therapy. The morphology of the duct system generates professional difficulties to achieve complete debridement of the contents of the pipe as the one hand instrumentation not have access to all the foothills of it. For this reason, you must use irrigating substances that allow you to reach these areas in order to get a better root canal disinfection

Objective: To compare in vitro antibacterial properties of the solution of benzalkonium chloride, sodium hypochlorite and Silver nanoparticles with *Enterococcus faecalis*.

Methodology: The bacterium *Enterococcus faecalis* was sown in Petri dishes with blood agar at 5%, then this box was divided into four for placing sensidiscs immersed in benzalkonium chloride, sodium hypochlorite, Nanoparticles Silver and Saline as control group. Petri dishes were incubated for 24 hours and then measuring the zone of inhibition.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 ANTECEDENTES.

Existen datos relacionados a la odontología y su tratado, encontrada en el Papiro de Edwin Smith datado aproximadamente en el siglo XVII a.C., ⁽¹⁾ sin embargo la ciencia en el área de la odontología aún se considera joven. Se considera como era observacional, aquella época en donde solo se dedicaban a observar la enfermedad y su desarrollo sin ningún tratamiento con base científica, y en contraste, la era científica es aquella en donde se comenzaron a realizar tratamientos de las enfermedades con base de investigaciones científicas previas. ⁽²⁾

La era Científica en la Odontología, ha tenido mayor presencia en los últimos 150 años aproximadamente. Podemos dividirla en la época Pre-restauradora y la época Restauradora según los tratamientos aplicados y esto define hacia donde se dirige los estudios científicos en la odontología. ⁽²⁾

La época Pre – Restauradora encontramos diversas culturas en las que se relata la existencia de una enfermedad como la causante de la pérdida dental, teniendo en su mayoría como tratamiento, la extracción dental. Sin embargo hasta mediados del siglo XIX aún se pensaba en la teoría de la “Larva Dental” como causa de la caries dental. ⁽³⁾ Sin embargo, los estudios del Dr. Miller respecto a la presencia y proliferación de microorganismos, así como la desmineralización del esmalte a causa del ácido producido por estos microorganismos, causaron demasiada controversia a partir de su publicación y difusión en el Congreso Médico Internacional en Londres. ^(4,5) A partir de estos hallazgos, la investigación científica se basó en los alimentos y en la presencia de microorganismos presentes en la cavidad bucal para así entender mejor las enfermedades bucales y sus tratamientos. ⁽²⁾

La enfermedad bucal con mayor prevalencia en boca es la caries, en la cual se encuentra presente el *Streptococo Mutans*, siendo ésta bacteria de mayor importancia en el estudio para el estudio de dicha enfermedad. ⁽⁶⁾ La caries en forma avanzada puede afectar también a la pulpa dental, provocando una instalación de microorganismos originando un proceso infeccioso.

La razón de los tratamientos endodónticos es la erradicación de la infección, y prevenir que los microorganismos presentes infecten o re-infecten la raíz y/o los tejidos adyacentes. Estos tratamientos han sido practicados desde 1928 obteniendo un tremendo éxito a través de los últimos años. ⁽⁷⁾ Varios factores químicos y físicos, también pueden inducir inflamación periradicular, siendo que evidencias científicas indican que la presencia de microorganismos son esenciales para la progresión e instalación de diversas formas de lesiones periapicales. ⁽⁸⁾

La patogenia de la pulpa dental y de los tejidos periapicales depende en gran medida de las bacterias. La cámara pulpar y los conductos radiculares de los dientes sin vitalidad y no tratados están ocupados por una masa gelatinosa de restos pulpares necróticos y líquido hístico, porciones de tejido momificado, y tejido vivo que se encuentra algunas veces en la porción apical del conducto radicular. Por lo general también hay bacterias. ⁽⁹⁾

En 1890 Willoughby Miller publicó el libro "Microorganismos de la boca humana", que llegó a ser la base de la microbiología odontológica en Estados Unidos. Cuatro años más tarde se convirtió en el primer investigador en identificar bacterias en la pulpa enferma. La mayoría de los trabajos que investigaron la flora de los conductos radiculares infectados han comunicado la presencia de numerosas bacterias. ⁽⁹⁾

Casi 700 especies de bacterias pueden ser encontradas en la cavidad oral, en donde entre 100 a 200 de estas especies tienen mayor participación. Las

infecciones endodónticas son de origen polimicrobianas, con una predominancia de bacterias anaerobias en infecciones primarias. ⁽¹⁰⁾

El aumento de la intensidad de la infección está íntimamente ligada a la complejidad y la fisiología del biofilm de bacterias, el anfitrión de la herencia genética, y los trastornos sistémicos. Los síntomas surgen por la mejora de la biopelícula patogenicidad / complejidad. ⁽¹¹⁾

Los objetivos finales de tratamiento endodóntico son la erradicación de la etiología microbiana; la curación completa de patología periapical; y restauración para proporcionar un sello coronal, la función de restauración, y prevenir la reinfección. La inflamación pulpar predominantemente se ha asociado con la participación de microbios y / o trauma dental. Sin embargo, es un proceso reaccionario multifactorial. ⁽¹²⁾

Los problemas de endodoncia (con evidencia clínica de problemas de pulpa y / o tejido periapical) son razones comunes y claves por qué los pacientes buscan atención dental. Sustentar la demanda de tratamiento de endodoncia es el cultivo el reconocimiento de que los problemas de endodoncia tienen un impacto en la calidad de vida. Por otra parte, se reconoce que la pérdida de dientes se asocia con el deterioro de la calidad de vida y que la ubicación y la distribución de la pérdida de dientes afectan a la gravedad del deterioro. ^(13,14,15)

El éxito de la terapia de endodoncia depende de la preparación adecuada, la desinfección y la obturación del conducto radicular, proporcionando las condiciones óptimas para la reparación del tejido periapical ⁽¹⁶⁾ Numerosas técnicas y dispositivos de riego han sido probados para mejorar la limpieza y desinfección del sistema de conductos radiculares ^(17, 18)

El fracaso en los tratamientos endodónticos, así como infecciones recurrentes y otras afecciones en dichos tratamientos, requieren de un nuevo tratamiento ya que encontramos diferentes tipos de microorganismos. El *Enterococcus*

Faecalis y Cándida Albicans han sido identificadas en la mayoría de los retratamientos en caso de los fracasos endodonticos. ^(19, 20,21)

3.2 MARCO TEORICO

3.2.1 Microbiología

Enterococcus faecalis es una bacteria en forma de coco dispuesta en cadenas o pares, Gram positiva, anaerobia facultativa, inmóvil y no esporulada. El tamaño de cada célula oscila entre 0,5 y 0,8 micrómetros y es habitante normal del tracto gastrointestinal humano. La temperatura óptima de crecimiento in vitro de este microorganismo es de 35°C, no obstante, se ha observado crecimiento entre 10°C y 45°C. ⁽²²⁾

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. Una característica notable de esta especie la constituye su capacidad para sobrevivir y crecer en microambientes que pudieran ser tóxicos para otras bacterias. ^(7, 22)

Cuando el Enterococcus faecalis está presente en pequeñas cantidades, su eliminación puede ser fácil, mas sin embargo, en grandes cantidades su erradicación puede tornarse complicada. E. faecalis puede encontrarse en diversas formas lo cual lo convierte en un sobreviviente excepcional en el conducto radicular. Este microorganismo puede tener las siguientes características: ^(7, 22, 23)

- Sobrevive en medio ambiente con pocos nutrientes
- Sobrevive en presencia de algunos medicamentos (Hidróxido de Calcio) e irrigantes (hipoclorito de sodio).

- Crea biofilmes en conductos recubiertos de medicamentos
- Invade y metaboliza fluidos a través de los túbulos dentinarios y se adhiere al colágeno
- Convierte el estado en viable aunque no en cultivable
- Adquiere resistencia a los antibióticos
- Sobrevive a los ambientes extremos con pH alcalino, alta salinidad y altas temperaturas
- Perdura en periodos largos sin nutrirse y utiliza fluidos tisulares provenientes del ligamento periodontal

Por estas razones es trascendente conocer la sensibilidad o resistencia de *Enterococcus faecalis* frente a los diversos agentes antimicrobianos utilizados durante la terapia endodóntica.

Sundqvist et al. demostraron que *E. faecalis* fue la bacteria más comúnmente recuperada en los dientes después de fracasos en la terapia de conducto radicular. Molander et al. encontró el *E. faecalis* con mayor frecuencia en los casos de retratamiento con periodontitis apical.

La capacidad de *E. faecalis* para formar biopelículas puede conferir una ventaja ecológica en ciertas situaciones. Por ejemplo, las cepas clínicas de *E. faecalis* aisladas de pacientes con endocarditis infecciosa se asociaron significativamente con una mayor formación de biopelículas de nonendocarditis aislados clínicos.

Estos rasgos de virulencia y otros también han sido identificados en los casos clínicos en presencia de *E. faecalis* en conductos radiculares y de la cavidad oral. ⁽²⁴⁾

3.2.2 Irrigantes

La irrigación del sistema de conductos, se define como el lavado y aspiración de todos los restos y sustancias que puedan estar contenidos en la cámara pulpar o conductos radiculares. ⁽²⁵⁾

Históricamente, un sin número de compuestos en solución acuosa han sido sugeridos como irrigantes conducto radicular, incluidas las sustancias inertes, tales como cloruro de sodio (solución salina) o biocidas altamente tóxicos y alergénicos tales como formaldehído. Además, como irrigantes endodónticos entran en contacto con los tejidos vitales, por lo tanto deben de ser sistémicamente no tóxico, no cáustico a los tejidos periodontales y tener poco potencial de causar una reacción anafiláctica. El debridamiento completo del conducto radicular es esencial para el éxito del tratamiento endodóntico. La preparación biomecánica del conducto radicular consiste no solamente en remover tejido pulpar, restos necróticos, microorganismos y dentina infectada, sino también en la conformación que facilita la obturación que sellará el foramen apical. El objetivo final de la preparación químico-mecánica es proveer limpieza en el conducto radicular, y paredes dentinales lisas a las cuales el material obturador pueda adherirse. ⁽²⁶⁾

La morfología del sistema de conductos genera dificultades al profesional para lograr el total debridamiento del contenido del conducto, ya que con la sola instrumentación manual no se tiene acceso a todas las estribaciones de éste. Por tal razón, se ve obligado a utilizar sustancias irrigantes que le permitan llegar a estas zonas con el fin de obtener una mejor desinfección del conducto radicular. ⁽²⁷⁾

3.2.3 Cloruro de Benzalconio

Fracasos del tratamiento de conducto radicular puede ser causada por infecciones secundarias después de la penetración de las bacterias orales en el sistema de conductos radiculares durante el tratamiento, entre las citas, o después de la conclusión del tratamiento endodóntico. ⁽²⁸⁾ Esta invasión secundaria de la bacteria oral puede ocurrir después de una ruptura de la cadena aséptica durante el tratamiento, después de la fuga de las restauraciones temporales entre las citas, o después de desglose / fractura de la restauración permanente.⁽²⁹⁾ Recientes microorganismos invasores pudieran encontrar una variedad de condiciones que pueden favorecer en su establecimiento como bio películas o su inclusión en las biopelículas preexistentes, es decir, presencia de humedad y fuentes de nutrientes a partir de exudados de los tejidos periapicales. ⁽³⁰⁾

El cloruro de benzalconio (BAK) es un detergente catiónico que expresa una alta afinidad a proteínas de membrana. Se cambia la resistencia iónica de las membranas celulares. Es utilizado como sanitizante y desinfectante sin considerar su propiedad fungicida, específicamente sobre los géneros *Trichophyton*, *Epidermophyton* y "*Cándida*, al igual que otros compuestos de amonio cuaternario, como cloruro de alquildimetilbencilamonio y cloruro dedecildimetilamonio.⁽³¹⁾ BAK, debido a sus actividades antibacterianas, es ampliamente utilizado, especialmente en oftalmología y odontología así mismo en desinfectantes orales como los enjuagues bucales. ⁽³²⁾ Su concentración en el enjuague bucal desinfectante oral puede alcanzar hasta un 10% mientras que en gotas para los ojos que varía entre 0,004 a 0,05%. Debido a la cronicidad y el uso generalizado de este tipo de tratamientos, efectos colaterales de BAK son de gran importancia. La toxicidad del BAK, probablemente relacionados con sus actividades prooxidativos, es dependiente de la dosis timeand. También hace que la proteína se desnaturalise su acción y la alteración de las membranas citoplasmáticas. Este fenómeno podría ser útil para aumentar la capacidad de penetración de los compuestos de la solución oftalmológica activos. ⁽³³⁾

3.2.4 Hipoclorito de Sodio

El Hipoclorito de sodio ha sido definido por la Asociación Americana de Endodoncistas como un líquido claro, pálido, verdeamarillento, extremadamente alcalino y con fuerte olor clorino, que presenta una acción disolvente sobre el tejido necrótico y restos orgánicos y además es un potente agente antimicrobiano. Químicamente, el NaOCl, es una sal formada de la unión de dos compuestos químicos, el ácido hipocloroso y el hidróxido de sodio, que presenta como características principales sus propiedades oxidantes. De todas las sustancias utilizadas actualmente, hipoclorito de sodio parece ser la más ideal, ya que cubre más de los requisitos para endodoncia irrigante que cualquier otro compuesto conocido ⁽³⁴⁾

Las concentraciones de NaOCl usadas en endodoncia varían entre 0,5% y 6%. La dilución del NaOCl disminuye significativamente su acción antibacteriana, su capacidad de disolución de tejido y de desbridamiento del conducto, pero también disminuye su toxicidad. ⁽³⁵⁾

La utilización del NaOCl puede ocasionar efectos adversos; entre los descritos en la literatura podemos mencionar lesiones en los tejidos periorales y orales (piel y mucosas), lesiones en la mucosa ocular, inyección de NaOCl en la región periapical ^(36, 37, 38, 39) y lesiones de hipersensibilidad. ⁽⁴⁰⁾

El hipoclorito de sodio (NaOCl) fue primero recomendado como una solución antiséptica por Henry Dakin para la irrigación de heridas para los soldados en la primera guerra mundial. Posteriormente, en 1920, se describió la solución de Dakin, 0.5% NaOCl, en la terapia endodóntica. El NaOCl es aún el irrigante más utilizado en la endodoncia moderna por sus propiedades antibacterianas, lubricativas, y disolvente de tejido. La evidencia disponible actualmente es a favor de hipoclorito de sodio como el principal irrigante endodóntico. ⁽⁴¹⁾

3.2.5 Nanopartículas de Plata

La plata ha sido empleada durante miles de años como metal precioso por el ser humano en aplicaciones tan dispares como joyería, utensilios, moneda, fotografía o explosivos. De todos estos usos, uno de los más importantes es su empleo como agente desinfectante con fines higiénicos y médicos. Hipócrates, padre de la medicina moderna, describió el empleo de polvo de plata para su aplicación en la curación de heridas y en el tratamiento de úlceras. Sin embargo, después de la introducción de los antibióticos en 1940 el uso de las sales de plata disminuyó. ⁽⁴²⁾

El efecto antimicrobiano de las sales de plata es conocido desde el siglo XIX. En estudios realizados en la actualidad se ha establecido la plata como "oligodinámica" debido a su capacidad para producir un efecto bactericida a concentraciones muy bajas. Esta característica de los iones Ag^+ se debe a su gran reactividad frente a sustancias como proteínas, enzimas, ADN, etc. ⁽⁴³⁾

Por su parte, el efecto bactericida de las nanopartículas de plata se conoce también desde hace tiempo pero el mecanismo de acción de las mismas se ha estudiado recientemente, aunque sigue sin conocerse completamente. Su mecanismo de acción consiste en unirse a la membrana celular de las bacterias provocando modificaciones en la permeabilidad y en la respiración de la bacteria.

Finalmente, como efecto complementario a la acción bactericida, las nanopartículas de plata desprenden de su superficie iones Ag^+ que contribuyen al efecto bactericida del mismo modo que los iones Ag^+ procedentes de las sales de plata. ⁽⁴⁴⁾

Desde un punto de vista químico, la síntesis de nanopartículas en disolución (disolución coloidal) requiere del empleo de métodos que permitan obtener un control preciso sobre el tamaño y la forma de las nanopartículas para así

obtener un conjunto de partículas monodispersas que presenten una propiedad determinada. En general, la síntesis de nanopartículas metálicas en disolución se lleva a cabo mediante el empleo de los siguientes componentes: i) precursor metálico; ii) agente reductor; iii) agente estabilizante. El mecanismo de formación de las disoluciones coloidales a partir de la reducción de iones plata consta de dos etapas diferentes: nucleación y crecimiento. El proceso de nucleación requiere una alta energía de activación mientras que el proceso de crecimiento requiere una baja energía de activación. El tamaño y la forma de las nanopartículas dependerá de las velocidades relativas de estos procesos que pueden ser controladas a través de la modificación de los parámetros de reacción. ^(45,46)

Para la elaboración de las nanopartículas de plata los primeros métodos descritos son el método Lee-Meisel ⁽⁴⁷⁾ y el método Creighton. ⁽⁴⁸⁾ El primero de ellos consiste en una variación del método Turkevich para la obtención de nanopartículas de oro, en el que se emplea AgNO_3 en lugar de HAuCl_4 como precursor metálico y citrato de sodio como agente reductor. En el método Lee-Meisel se obtienen nanopartículas de plata con una distribución amplia de tamaño de partícula (polidispersas). El método Creighton consiste en la reducción de AgNO_3 con el agente reductor NaBH_4 . Este método es el más popular en la actualidad y da lugar a la obtención de nanopartículas de plata de aproximadamente 10 nm y con una distribución estrecha de tamaños (monodispersas).

El polímero poli (vinil pirrolidona) (PVP) es uno de los más ampliamente usados como agentes estabilizantes de nanopartículas metálicas. ⁽⁴⁹⁾ Existen también un buen número de publicaciones en el que este polímero se ha empleado en la síntesis de nanopartículas de plata. Así, una de las primeras síntesis consistió en la fotoreducción de AgNO_3 en presencia de PVP como agente estabilizante empleando radiación UV de 243 nm.

Un interesante método de síntesis de nanopartículas de plata es el que ha desarrollado el grupo del Profesor Liz-Marzán. En este caso se ha empleado dimetilformamida (DMF) como disolvente y como agente reductor frente a sales de plata en diferentes condiciones de reacción. ⁽⁵⁰⁾ Así, se han conseguido nanopartículas de diferentes tamaños empleando aminopropiltriétoxosilano (APS) o polivinilpirrolidona (PVP) como agentes estabilizantes o incluso nanoprismas de plata.

Se puede prevenir la agregación de las nanopartículas en disolución mediante el empleo de agentes estabilizantes. Uno de los métodos más habituales es el empleo de ligandos orgánicos de cadena alquílica larga con grupos funcionales como tioles, ⁽⁵¹⁾ carboxilatos, ⁽⁵²⁾ fosfinas oxidadas ⁽⁵³⁾ o aminas. ⁽⁵⁴⁾

Sin embargo, el uso de estos agentes permite, por un lado, evitar la agregación de las nanopartículas en disolventes orgánicos y, por otro, ejercer un control preciso sobre su tamaño, su forma y su monodispersidad mediante la modificación de las condiciones de reacción.

4. JUSTIFICACIÓN

La mayor parte de las patologías endodónticas se vinculan con la presencia de bacterias. Los túbulos dentinarios sirven como ruta para la penetración de bacterias y toxinas en el interior de los conductos radiculares. Cuando la pulpa se torna necrótica alberga millones de bacterias. Durante su crecimiento y progresión los microorganismos propician la inflamación de los tejidos periodontales a través del orificio apical y conductos laterales.

Existen soluciones antisépticas para el tratamiento de los conductos radiculares, sin embargo la solución a base de Nanopartículas de plata ha demostrado importantes propiedades antibióticas, antifúngica y antivirales. Se espera que las Nanopartículas de plata logren mejorar procedimientos en la eliminación de microorganismos en el área odontológica y no solo los tratamientos endodónticos, sino también abrirle campo a otras áreas de la odontología. Aun se estudia el grado de toxicidad de dicho componente por lo que se pretende realizar el estudio in vitro y comparar sus propiedades con la solución de Cloruro de Benzalconio y el Hipoclorito de Sodio para concluir sus ventajas y desventajas que pudiera presentar en los tratamientos endodónticos.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Cuando una pieza dental necesita tratamiento endodóntico, en la mayoría de las ocasiones encontramos que el motivo es por lesiones con presencia de microorganismos bacterianos. Por tal motivo es importante para el éxito de los tratamientos la eliminación de la mayor parte de los microorganismos que puedan estar presentes en los conductos radiculares. La eliminación parcial de estos microorganismos puede llevar al fracaso de los tratamientos de endodoncia llevando esto a los retratamientos o inclusive a la exodoncia. Se espera de un irrigante para conductos radiculares que tenga la capacidad de la eliminación de la mayor cantidad de microorganismos presentes para lograr el éxito en los tratamientos. No existe una solución ideal para la eliminación del *Enterococcus Faecalis*. Las tres soluciones que serán utilizadas en este estudio se tienen consideradas como soluciones antisépticas, por lo que se espera evaluar su comportamiento ante esta bacteria frecuentemente presente en los tratamientos de endodoncia.

Por lo que nos planteamos la siguiente pregunta:

¿Cuál de los tres Irritantes son capaces de eliminar el *Enterococcus Faecalis*, Hipoclorito de Sodio al 5.25%, Cloruro de Benzalconio y las Nanopartículas de Plata?

6. HIPÓTESIS

H0. Las tres soluciones tienen el mismo efecto antibacteriano.

H1. La solución a base de Nanopartículas de Plata tiene un mejor efecto antibacteriano.

H2 La solución a base de Cloruro de Benzalconio tiene un mejor efecto antibacteriano.

H3. La solución a base de Hipoclorito de Sodio al 5.25% tiene un mejor efecto antibacteriano.

HI. La solución a base de Nanopartículas de Plata tiene un mejor efecto antibacteriano.

7. OBJETIVO

Comparar in vitro las propiedades antibacterianas de la solución de Cloruro de Benzalconio, el Hipoclorito de Sodio y las Nanoparticulas de Plata ante el Enterococcus Faecalis.

8. VARIABLES

Dependientes: Enterococcus Faecalis

Independientes: Solución de Cloruro de Benzalconio, Hipoclorito de Sodio y Nanoparticulas de Plata

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 TIPO DE ESTUDIO.

Se realizara un estudio Prospectivo, Longitudinal y Experimental, abierto a los investigadores en donde las variables serán conocidas y analizadas de forma comparativa y longitudinal en un modelo prospectivo.

9.2 UNIVERSO DE ESTUDIO

Considerando que la variable a evaluar será la acción antimicrobiana de las soluciones de Cloruro de Benzalconio, NaOCl al 5.25%, Nanoparticulas de Plata y Suero fisiológico como grupo control ante el Enterococcus Faecalis, por lo que para este estudio se contempló realizar 20 muestras en la que se incluyen los cuatro grupos según la solución utilizada, teniendo un total de 80 reactivos por analizar.

9.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Para que las muestras sean incluidas en este estudio serán considerados los siguientes criterios:

- Que cada caja Petri se encuentre en las condiciones optimas para realizar el muestreo.
- El sembrado de la bacteria deberá seguir los protocolos y ser de forma uniforme y equitativa en relación a las demás muestras.
- Cumplir con los tiempos establecidos por el protocolo sin alteraciones. Tiempo de 24 horas.
- Que la conservación de las muestras se mantengan a las temperaturas establecidas en el protocolo.
- Las soluciones utilizadas deberán encontrarse sin alteraciones o modificaciones en sus proporciones ya previamente establecidas.

- La manipulación de las muestras y/o reactivos deberán de realizarse dentro de una cámara de anaerobiosis manteniendo los protocolos de seguridad y en el ambiente adecuado.

9.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

En el presente estudio fueron considerados los siguientes puntos como criterios de exclusión:

- La utilización de cajas Petri que hayan sido utilizadas previamente.
- Soluciones alteradas en sus propiedades o contaminadas con otras soluciones.
- Manipulación en condiciones fuera de lo establecido en los protocolos de seguridad por el Centro de Ciencias de la Salud, Valle de las Palmas.

9.5 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

Según los procesos elaborados se tomaron los siguientes criterios para eliminación de muestras en este estudio:

- Fractura de Cajas Petri y/o defectos en las mismas.
- Contaminación de muestras con otras soluciones no establecidas en el estudio.
- Presencia de alteraciones no deseadas en el agar por mala manipulación.
- Muestras que no cumplan los protocolos establecidos en el estudio tal como horarios y temperaturas, así como su manipulación en el ambiente ideal.

9.6 METODOLOGÍA

Equipo y Materiales

Los recursos que a continuación se presentan son los considerados con gran importancia para la realización de la tesis presentada, siendo que al ser un estudio prospectivo y longitudinal, éstos pueden variar según el progreso de dicha investigación.

Equipo y Material	Marca
Caja Petri, Marca Corning	Corning
Agar sangre de carnero al 5%	
Plumón	Sharpie
Cloruro de Sodio	Pisa
Sensidiscos en Blanco 6mm	BBI
Bacteria Enterococcus faecalis	
Cloruro de Benzalconio	
Biological Safeti Cabinet	Labconco, Purifier,
Guantes de nitrilo	KX Medical
Bata quirúrgica	Ambiderm
Sterile Polyester, Tipped Applicators	Puritan
Vasos Estériles	DeltaLab
Hipoclorito de Sodio al 5%	
Pinzas de Curación Estériles	Hu-friedy
Nanoparticulas de Plata	

Jeringa y aguja Estéril	BD
Software Motic Images Plus 2.0.	

Fabricación de nanopartículas

El procedimiento consto de reacciones de soluciones coloidales con la sobresaturación de sales, y la creación de un precipitado por nucleación homogénea o heterogénea. Después de la nucleación, el crecimiento de las nanopartículas se llevó a cabo por medio de difusión. La gradiente de concentración, cambios de temperatura, agitación y surfactantes permitieron la modificación del incremento de tamaño.

En primer lugar, se preparo una solución de plata con el sodio tetrahidroborato (NaBH_4) que se incluye como agente reductor. La relación entre la plata y el agente reductor es mayor que una. Después de la reacción, se añadió un estabilizador para el control de tamaño y uniformidad (aminas primarias como polivinilpirrolidona). Para dicho experimento las concentraciones de nanopartículas van de 100 mg/mL de plata, el tamaño de las nanopartículas tuvieron una media de 5 nm con recubrimiento.

Activación de la cepa

La cepa de *Enterococcus faecalis* fue seleccionada para este estudio. Dentro de la cabina Labconco, Purifier, Biological Safeti se tomo una alícuota de 100ul de la bacteria con una micropipeta, posteriormente se vació tal contenido en el tubo de eppendorf con tripticaseina de soya y se sellaron, los tubos fueron colocados en la incubadora Shell Lab a 37°C durante siete días. Al término de este tiempo la caja petri se dividió en cuatro partes para la colocación de los sensidiscos, Dentro de la cabina Labconco, Purifier, Biological Safeti se tomo con un aplicador con punta de poliéster estéril el crecimiento bacteriano y se

sembró por difusión en cajas de agar sangre carnero al 5%, se colocaron los sensidiscos con los irrigantes previamente establecidos, se incubaron durante 24 horas, terminado el periodo de incubación se midieron los halos de inhibición con un Software llamado Motic Images Plus 2.0.

Las muestras se dividieron de la siguiente manera:

Grupo 1: Hipoclorito de Sodio 5.25%

Grupo 2: Cloruro de Benzalconio

Grupo 3: Nanopartículas de Plata, 100 mg/mL

Grupo 4: Grupo control, Suero Fisiológico

Preparación de los sensidiscos

Los sensidiscos se tomaron con pinzas estériles, posteriormente se embebieron con el agente antimicrobiano, después y se colocaron cuidadosamente sobre el medio de cultivo, se incubaron por 24 horas. Se midieron los halos de inhibición con un con un Software llamado Motic Images Plus 2.0.

Variables por captarse

Se midieron los halos de inhibición utilizando Hipoclorito de Sodio al 5.25%, Cloruro de Benzalconio y Nanopartículas de plata al 100 mg/mL con un Software llamado Motic Images Plus 2.0.

Análisis Estadístico

Se utilizó la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) para medir la variabilidad de la inhibición con los 3 agentes, así mismo se utilizó pruebas de diferencia de medias para comparar el efecto entre cada uno de ellos.

Considerando que las variables a evaluar fueron la acción antimicrobiana del Hipoclorito de Sodio al 5.25%, de la solución de Cloruro de Benzalconio, de las Nanopartículas de Plata al 100 mg/mL y Suero fisiológico como grupo control,

evaluados en cultivos de *Enterococcus Faecalis* fueron determinadas 20 muestras en la que se incluyen los cuatro grupos según la solución utilizada, teniendo un total de 80 reactivos por analizar con la aplicación de la siguiente fórmula general:

$$n = \frac{z^2 \sigma^2}{e^2}$$

Dónde:

n= número buscado de elementos de la muestra

N= Tamaño de la población

z= nivel de confianza elegido

σ = Desviación estándar determinada

e= error de estimación permitido

Para el presente proyecto se determinaron los siguientes valores que fueron aplicados para determinar el tamaño de la muestra.

z= 1.96 para 95% de nivel de confiabilidad

σ = 0.24 mm

e= 0.11 mm de error de estimación permitido

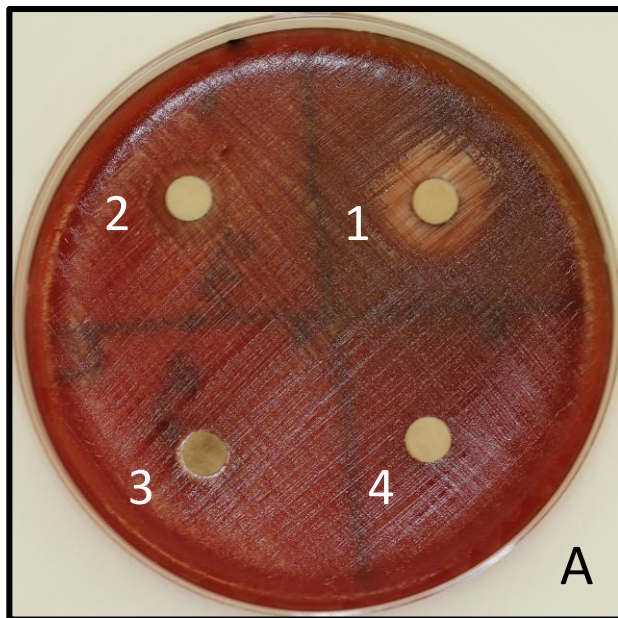
$$1-\alpha = 0.95\%$$

n=20

$$n = \frac{(1.96)^2(0.24)^2}{(0.11)^2} = 20 \text{ muestras para cada grupo}$$

10.

Los halos de inhibición del Hipoclorito de sodio al 5.25% fueron en un 85% de los casos de 11 a 13 mm., en un 15% entre los 14 a 16 mm. (Figura A).



- 1.- Hipoclorito de Sodio al 5.25%
- 2.- Cloruro de Benzalconio
- 3.- Nanoparticulas de Plata
- 4.- Suero Fisiologico

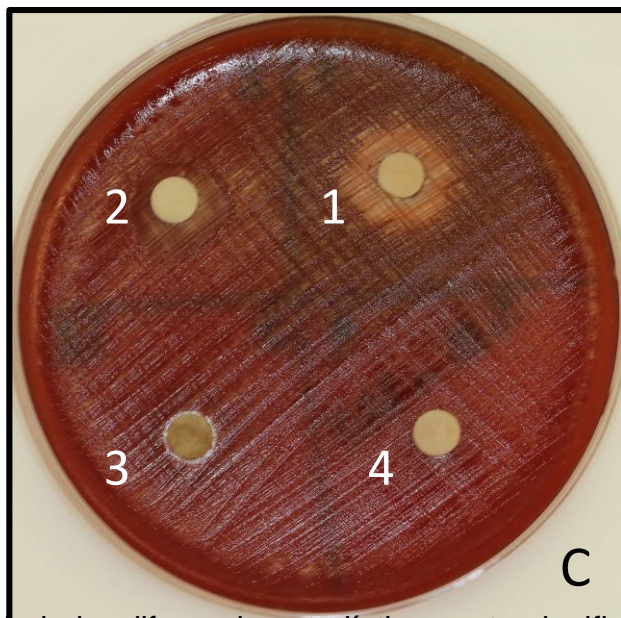
En cuanto al efecto antibacteriano de la Cloruro de Benzalconio, la mayoría de los elementos de la muestra, correspondientes al 55%, presentaron valores en el rango de los 11 a los 13 mm seguidos del grupo que presentó valores dentro del rango de los 8 a los 10 mm (35%). Las muestras que presentaron un efecto menor le correspondió a los halos de 14 a 16 mm representaron el 10% de la muestra. (Figura B)



- 1.- Hipoclorito de Sodio ala 5.25%
- 2.- Cloruro de Benzalconio
- 3.- Nanoparticulas de Plata
- 4.- Suero Fisiologico

B

Respecto al efecto antibacteriano de la Nanoparticulas de Plata se observó que la mayoría de los casos se presentaron en el rango de los 5 a los 7 mm (90% de la muestra), mientras que al grupo que presentó valores entre los 8 a los 10 mm le correspondió un 10%. (Figura C)



- 1.- Hipoclorito de Sodio al 5.25%
- 2.- Cloruro de Benzalconio
- 3.- Nanoparticulas de Plata
- 4.- Suero Fisiologico

No hubo diferencia estadísticamente significativa entre el efecto antimicrobiano del Hipoclorito de Sodio al 5.25% y el Cloruro de Benzalconio. Estadísticamente ambas fórmulas presentan el mismo efecto antimicrobiano. Se observó una

diferencia significativa entre el Hipoclorito de Sodio al 5.25% y las Nanopartículas de plata.

En las tablas 1 a 4 se muestran la frecuencia y porcentaje de los halos de inhibición (en mm) para la solución de Hipoclorito de Sodio al 5.25%, Cloruro de Benzalconio y Nanopartículas de Plata.

Tabla 1. Efecto del Hipoclorito de Sodio al 5.25% sobre la bacteria *Enterococcus faecalis*.

Halo de inhibición	Frecuencia	Porcentaje
11 - 13mm	17	85%
14 - 16mm	3	15%
Total	20	100%

Tabla 2. Efecto del Cloruro de Benzalconio sobre la bacteria *Enterococcus faecalis*.

Halo de inhibición	Frecuencia	Porcentaje
8 - 10mm	7	35%
11 - 13mm	11	55%
14 -16mm	2	10%
Total	20	100%

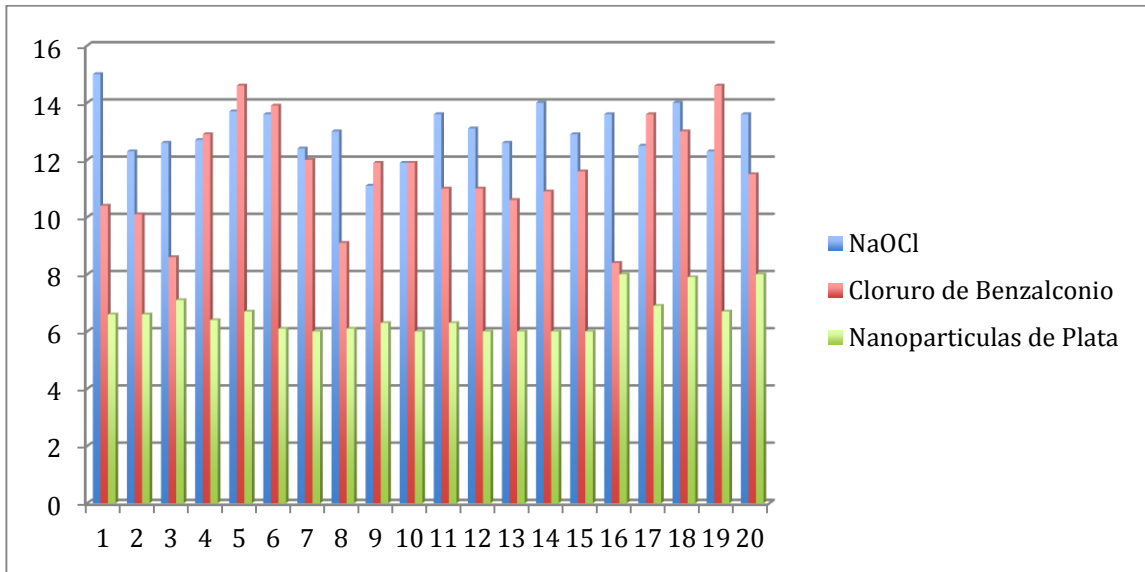
Tabla 3. Efecto de las Nanopartículas de Plata sobre la bacteria *Enterococcus faecalis*.

Halo de inhibición	Frecuencia	Porcentaje
5 - 7mm	18	90%
8 - 10mm	2	10%
Total	20	100%

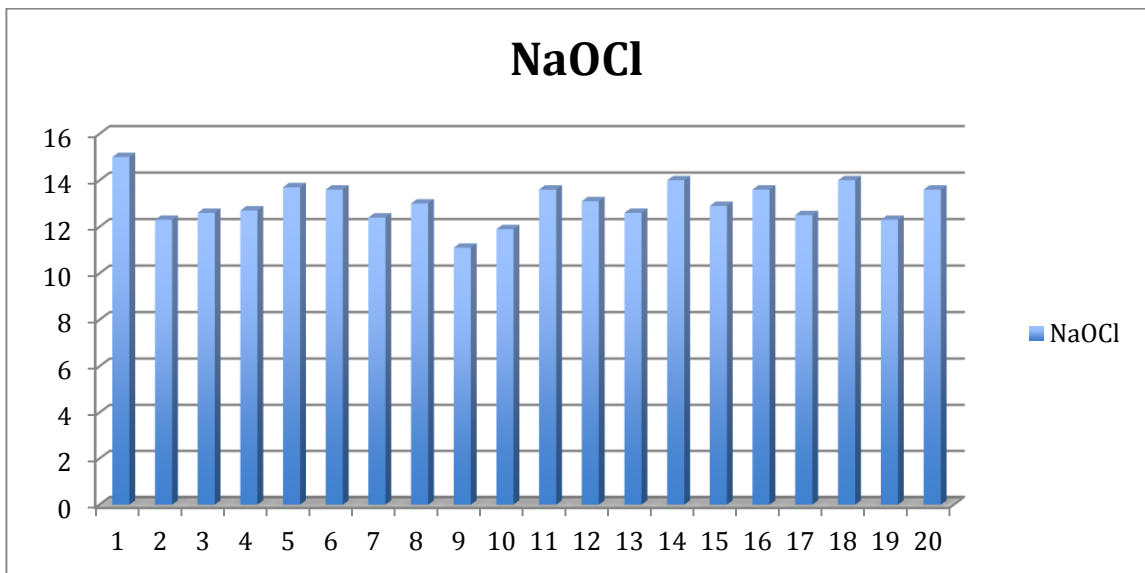
Tabla 4. Efecto de Hipoclorito de Sodio al 5.25%, Cloruro de Benzalconio y las Nanopartículas de Plata sobre la bacteria *Enterococcus faecalis*.

	5 -7		8 – 10		11 – 13		14 – 16		Total	
	mm		mm		mm		mm			
	Frec	%	Frec	%	Frec	%	Frec	%	Frec	%
Hipoclorito de Sodio 5%	0	0	0	0	17	85	3	15	20	100
Cloruro de Benzalconio	0	0	7	35	11	55	2	10	20	100
Nanopartículas de Plata	18	19	2	10	0	0	0	0	20	100
Total	18	30	9	15	28	46.7	5	8.3	60	100

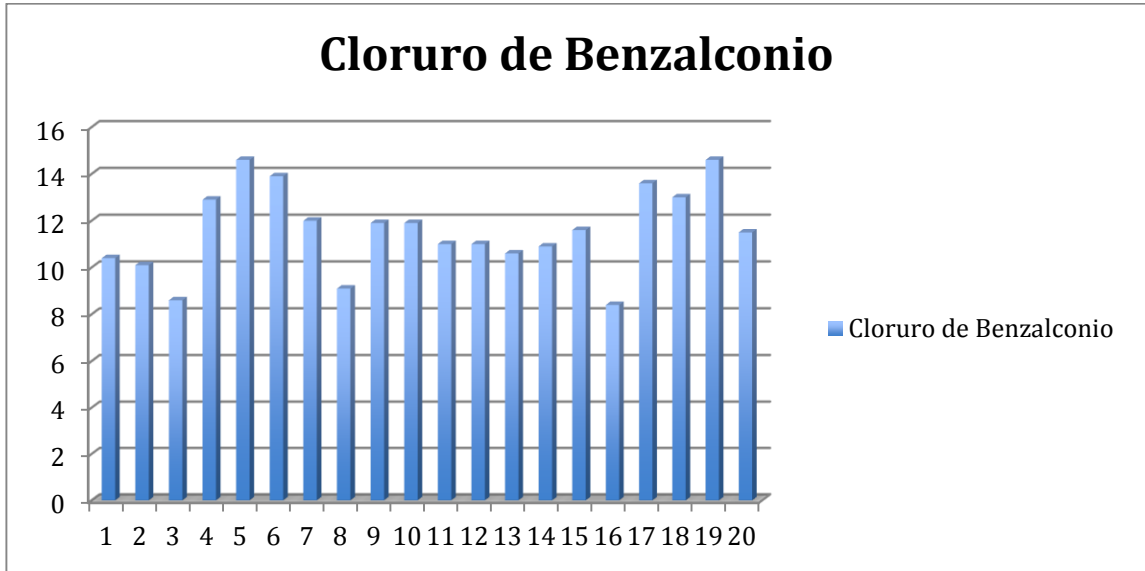
Grafica 1. Efecto de Hipoclorito de Sodio al 5.25%, Cloruro de Benzalconio y las Nanopartículas de Plata sobre la bacteria *Enterococcus faecalis*.



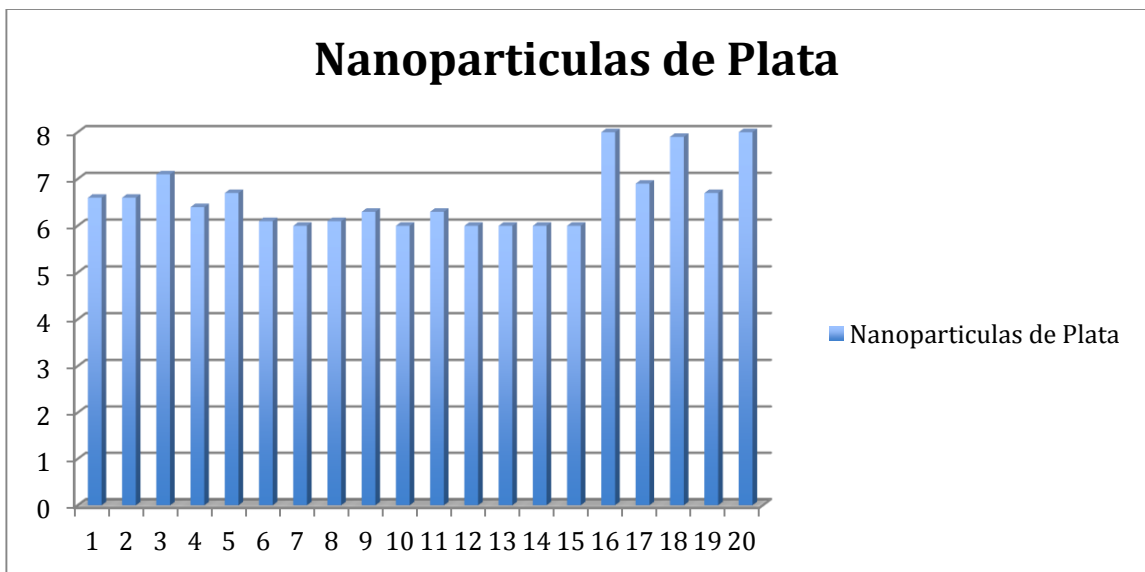
Grafica 2. Efecto del Hipoclorito de Sodio al 5.25% sobre la bacteria *Enterococcus faecalis*.



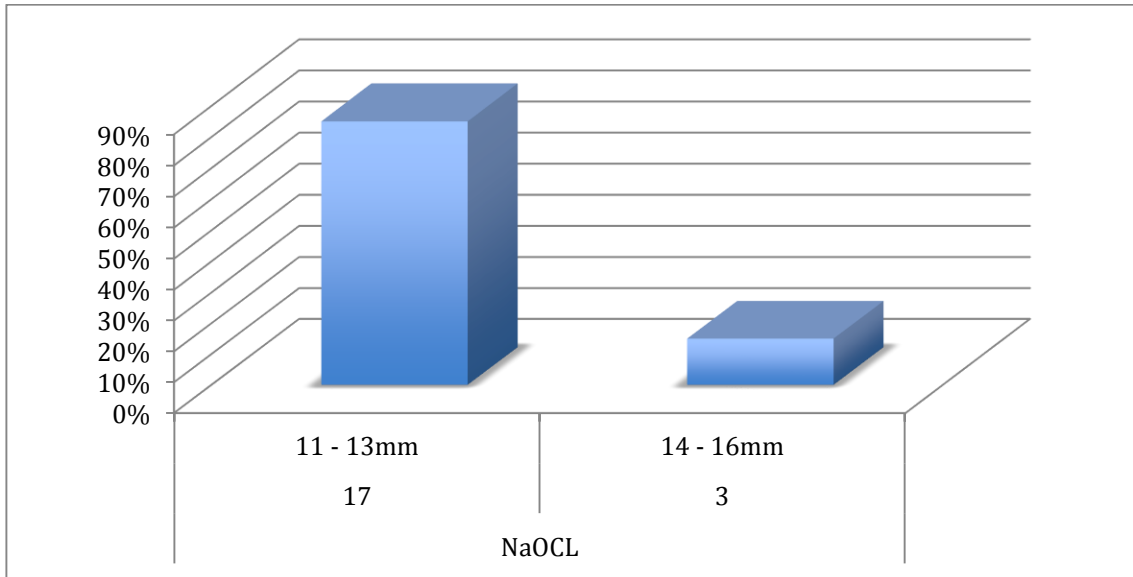
Grafica 3. Efecto del Cloruro de Benzalconio sobre la bacteria *Enterococcus faecalis*.



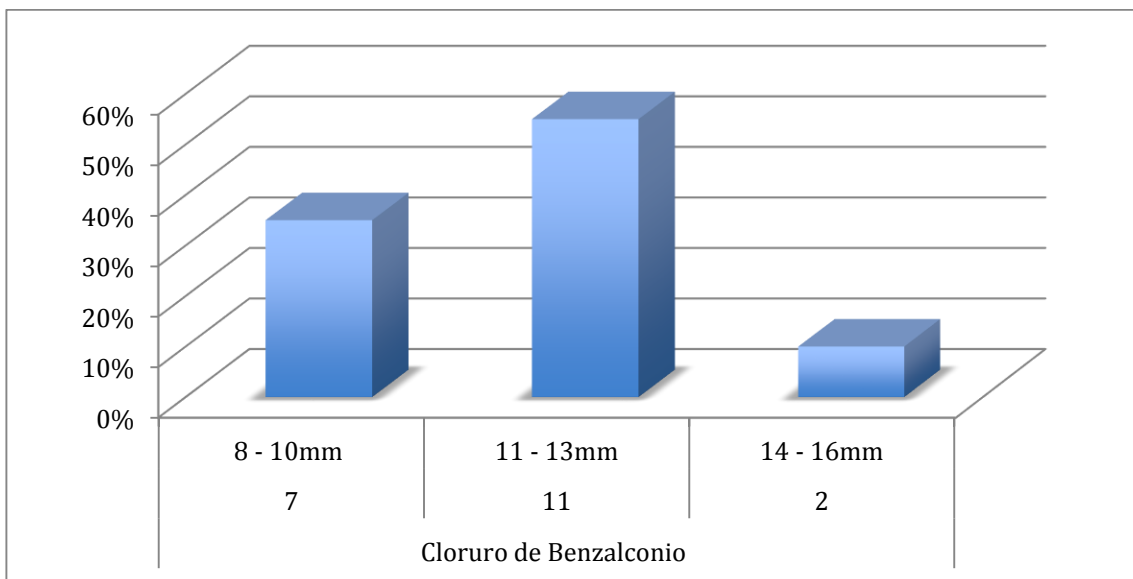
Grafica 4. Efecto de las Nanopartículas de Plata sobre la bacteria *Enterococcus faecalis*.



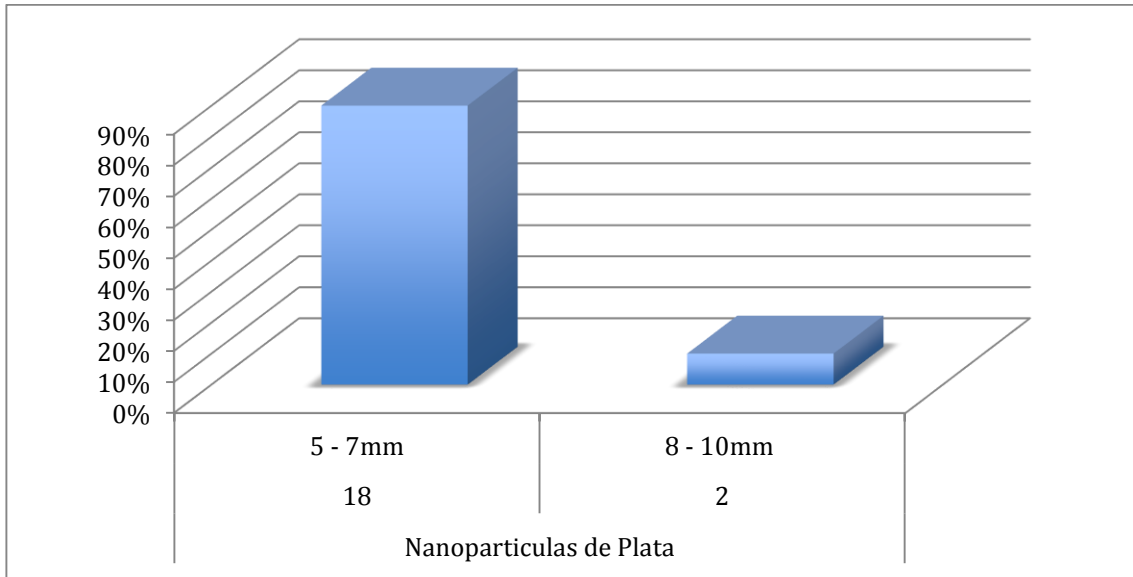
Grafica 5. Efecto en porcentaje del Hipoclorito de Sodio al 5.25% sobre la bacteria *Enterococcus faecalis*.



Grafica 6. Efecto en porcentaje del Cloruro de Benzalconio sobre la bacteria *Enterococcus faecalis*.



Grafica 7. Efecto en porcentaje de las Nanopartículas de Plata sobre la bacteria *Enterococcus faecalis*.



11. DISCUSIÓN

En la presente investigación se evaluó in vitro la actividad antimicrobiana de distintos materiales utilizados en la terapia de conductos radiculares. Aunque los resultados de las investigaciones in vitro no pueden ser extrapolados a las situaciones in vivo son una forma de aproximación que nos permite evaluar y comparar la eficacia de los materiales dentales. Una ventaja que tuvimos en este trabajo fue el poder evaluar la capacidad antibacteriana de diferentes irrigantes antisépticos sobre la bacteria *Enterococcus faecalis*.

La finalidad del tratamiento endodóntico es 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 los residuos orgánicos e inorgánicos y las bacterias no pueden ser completamente eliminadas y a menudo persisten en su interior.

Se ha demostrado 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.

Sundqvist et al. demostraron que *E. faecalis* fue la bacteria más comúnmente recuperada en los dientes después de fracasos en la terapia de conducto radicular. Molander et al. encontró el *E. faecalis* con mayor frecuencia en los casos de retratamiento con periodontitis apical.

Los resultados del presente estudio han mostrado que la Hipoclorito de Sodio al 5.25%, Cloruro de Benzalconio y las Nanopartículas de Plata poseen eficacia antimicrobiana. El efecto antimicrobiano del Hipoclorito de sodio al 5.25% fue mayor que el de Cloruro de Benzalconio y las Nanopartículas de Plata, con los valores más altos en los halos de inhibición, entre 11 a 13 mm.

Beyser Pipkin y cols.⁽⁵⁵⁾ Describen el uso de la solución de Dakin, 0,5% NaOCl, en la terapia de endodoncia. NaOCl solución sigue siendo el irrigante endodóntico más favorecida en la práctica de endodoncia moderna debido a sus antibacterianos, lubricante, y las propiedades de disolución de tejido. Aunque NaOCl tiene muchas ventajas, la falta de estabilidad química es una desventaja importante de esta solución. Las propiedades de desinfección y desodorización de cloro se reconocieron por primera vez en el comienzo del siglo XIX. Cloritas hipo son los más útiles de los desinfectantes de cloro.

Pieper y cols.⁽⁵⁶⁾ Demostraron que el Cloruro de Benzalconio es un tensioactivo anfótero que contiene moléculas anfipáticas, tales como nitrógeno cuaternario asociado con un sustituyente hidrófobo, que son capaces de reducir la tensión superficial y aumentar el área de superficie de sustratos de crecimiento, insolubles en agua hidrófobos

Otros autores⁽⁵⁷⁾ en su último estudio, han mostrado que las nanopartículas de plata con una superficie parcialmente oxidada podrían ser transportadores de iones Ag⁺ quimisorbidos en cantidades suficientes como para producir un efecto bactericida, mientras que las nanopartículas de plata sintetizadas bajo atmósfera de nitrógeno no presentan actividad bactericida.

12. CONCLUSIÓN

En función de los objetivos planteados y de acuerdo con los resultados obtenidos podemos concluir que:

1.- El Hipoclorito de Sodio al 5.25%, Cloruro de Benzalconio y las Nanopartículas de Plata tienen efecto antibacteriano sobre la bacteria *Enterococcus faecalis*.

2.- El agente antimicrobiano que presentó mejor efecto sobre las bacterias *Enterococcus faecalis* fue el Hipoclorito de Sodio al 5.25% seguido del Cloruro de Benzalconio y las Nanopartículas de Plata. El Hipoclorito de Sodio al 5.25% y el Cloruro de Benzalconio tuvieron un efecto antibacteriano similar.

4.- Las Nanopartículas de Plata fueron las que mostraron menor efecto antibacteriano sobre la bacteria *Enterococcus faecalis*.

Como medio de recomendación sugiero seguir utilizando el Hipoclorito de Sodio al 5.25%, por su acción en disolver tejido necrótico y restos orgánicos, por poseer propiedades lubricativas, además es un potente agente antimicrobiano, que al mismo tiempo se recomienda por su fácil manejo y su bajo costo.

13. ANEXOS

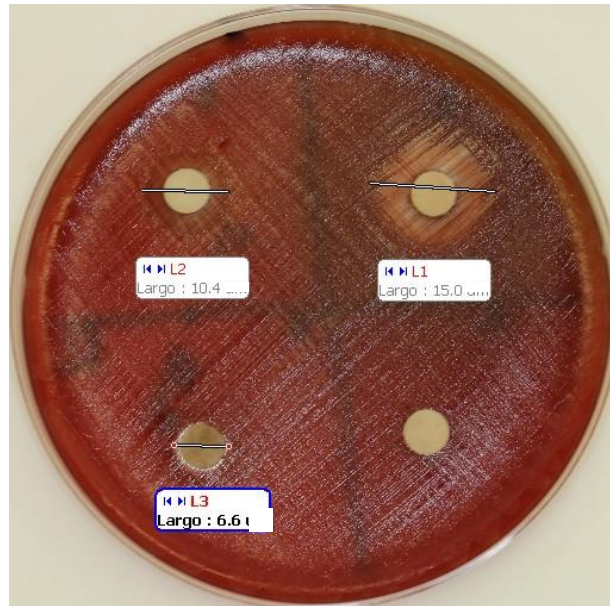


Imagen 1. L1.- 15.0mm, L2.- 10.4mm y L3.- 6.6mm



Imagen 2. L1.- 12.6mm, L2.- 8.6mm y L3.- 7.1mm

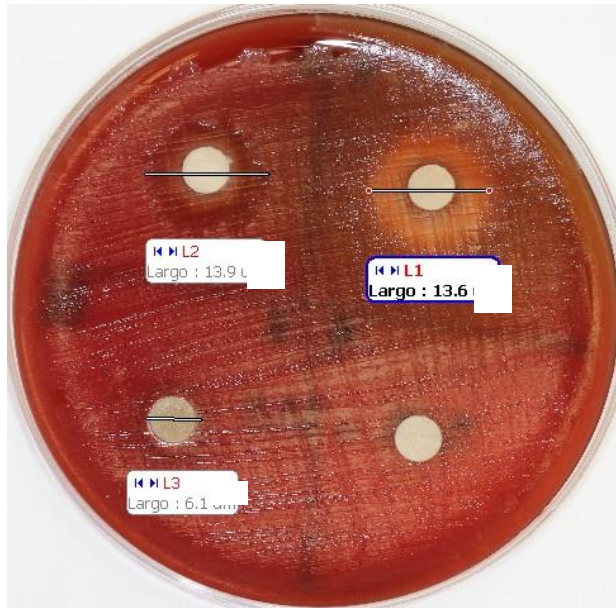


Imagen 3. L1.- 13.6mm, L2.- 13.9mm y L3.- 6.1mm

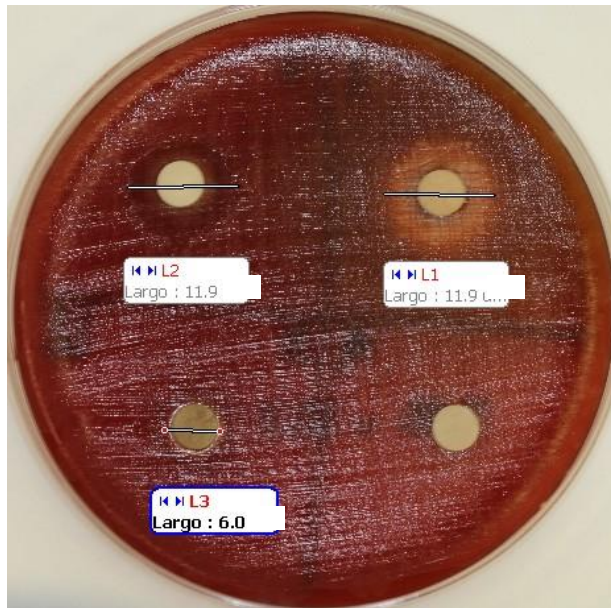


Imagen 4. L1.- 11.9mm, L2.- 11.9mm y L3.- 6.0mm

14. AGRADECIMIENTOS

Primero que nada le agradezco a Dios por permitirme tener buena salud y gracias a ello poder cumplir un sueño mas en mi vida.

Le agradezco a mis papas por todas sus principios, valores y por siempre inculcarme el deseo de salir adelante y ser mejor persona, a mis hermanos por siempre apoyarme en todo, ya que parte de lo que soy, se los debo a ellos.

A la Universidad Autónoma de Baja California por brindarme la oportunidad de seguirme superando.

Le agradezco a la Dra. Ana Gabriela Carillo Varguez por todas sus enseñanzas, por confiar en mi y darme la oportunidad de ser parte de este gran proyecto, la Especialidad en Endodoncia.

A mi tutor y director de tesis, Dr. Miguel Ángel Cadena Alcantar por todo su apoyo para la realización de esta tesis.

A todos mis maestros de la Especialidad en Endodoncia por todas sus enseñanzas.

A la Mtra. Nydia Alejandra Castillo Martínez por el apoyo incondicional, la paciencia y el tiempo que me brindó como guía durante la tesis.

A todos mis compañeros de la Especialidad en Endodoncia por su gran apoyo, especialmente en mis últimos meses de embarazo.

Por ultimo pero no menos importante, si no al contrario, a mi esposo Eduardo Serena Gómez, por siempre confiar en mi, por dejarme volar tan alto pero siempre tomados de la mano, por todos los desvelos, por todas sus enseñanzas, por darme ese gran apoyo para hacer realidad un sueño mas, ya que mis sueños los hace parte de el y juntos los hacemos realidad.

Gracias a Dios por darnos la gran bendición de ser padres y que nuestra hija Adriana sea parte de este gran sueño hecho realidad.

15. DEDICATORIA

A Dios, mis padres, mis hermanos, mi esposo y mi Hija Adriana.

16. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Llorens AI, Malgosa-Morena a. Paleontopatología. Elsevier España. 2003.
2. Ismail AI, Hasson H, Sohn W. Dental Caries in the Second Millenium. J Dent Educ 2001 Oct; 65 (10): 953 - 959.
3. Hoffman - Axthelm W. History of Dentistry. Chicago: Quintessence Pub. Co., 1981: 16 -108, 292, 311.
4. Miller W. Dental Caries. Am J Dent Sci 1883; 17: 77 - 130.
5. Barret W. The etiology of Dental Caries. Am Dent Assoc Trans 1885; 24: 91 - 114.
6. Loesche WJ. Microbiology of Dental Decay and Periodontal Disease. 4th Edition. Galveston, Tx. University of Texas, Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 99.
7. Narayanan L, Vaishnavi C. Endodontic Microbiology. J Conserv Dent 2010 Oct. 13(4); 233-239.
8. Kakehashi S, Staley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ -free and conventional laboratory rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1965; 20: 340 -9.
9. Spoleti P, et al. Influencia de la Anatomia topográfica en la desinfección de conductos radiculares. EJDR 2001; 6: 25.
10. Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhist FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. Periodontal 2000 2006; 42: 205-8.
11. Fabio R.M. Leite, DDS, MSc, PhD, Gustavo G. Nascimento, DDS, MPH, Iavio F. Demarco, DDS, PhD,, DDS. Prevalence of Treponema Species Detected in Endodontic Infections: Systematic Review and Meta-regression Analysis. JOE 2015.
12. Sarah Kwang, DDS, MSD, Anita Aminoshariae, DDS, MS, Jarrod Harding, MS, Thomas A. Montagnese, DDS, MS, and Andre Mickel,

DDS, MSD. The Critical Time-lapse between Various Restoration Placements and Subsequent Endodontic Intervention. JOE 2014; 40: 1922-23.

13. Pei Liu, BDS, MDS (Endo), Phd, Colman Mcgrath, BA, BdentSci, DDPHRCS, Msc, FDSRCS, FFDRCSI, FFPH, Med, Phd, And Gary Shun Pan Cheung, BDS, Msc, MDS. Improvement in Oral Health–related Quality of Life after Endodontic Treatment: A Prospective Longitudinal Study. JOE 2014; 40: 805-810.
14. Madhavi Setty, DDS, MSD, Thomas A. Montagnese, DDS, MS, Dale Baur, DDS, MD, Anita Aminoshariae, DDS, MS, and Andre Mickel, DDS, MSD. An Analysis of Moderate Sedation Protocols Used in Dental Specialty Programs: A Retrospective Observational Study. JOE 2014; 40: 1327- 31.
15. James H.S. Simon AB, DDS, Dudley H. Glick, BS, DDS, and Alfred L. Frank, DDS. In Remembrance of James H.S. Simon. The Relationship of Endodontic–Periodontic Lesions. JOE 2013; 39: 41-46.
16. Aline Martins Justo, DDS, MSc, Ricardo Abreu da Rosa, DDS, MSc, Manuela Favarin Santini, DDS, MSc, Maria Beatriz Cardoso Ferreira, MD, PhD, Jefferson Ricardo Pereira, DDS, PhD, Marco Antonio Hungaro Duarte, DDS, PhD, and Marcus Vinicius Reis So, DDS, PhD. Effectiveness of Final Irrigant Protocols for Debris Removal from Simulated Canal Irregularities. JOE 2014; 40-. 2009-14.
17. Mancini M, Cerroni L, Iorio L, et al. Smear layer removal and canal cleanliness using different irrigation systems (EndoActivator, EndoVac, and passive ultrasonic irrigation): field emission scanning electron microscopic evaluation in an in vitro study. J Endod 2013; 39: 1456-60.
18. Kamel WH, Kataia EM. Comparison of the efficacy of smear clear with and without a canal brush in smear layer and debris removal from instrumented root canal using WaveOne versus ProTaper: a

- scanning electron microscopic study. *J Endod* 2014; 40:446-50.
19. Emre Iriboz, DDS, PhD, Koral Bayraktar, DDS, Dilek Turkeydin, DDS, PhD, and Bilge Tarcin, DDS, PhD. Comparison of Apical Extrusion of Sodium Hypochlorite Using 4 Different Root Canal Irrigation Techniques. *JOE* 2015; 40: 380-84.
 20. De-Deus G, Barino B, Marins J, et al. Self-adjusting file cleaning-shaping-irrigation system optimizes the filling of oval-shaped canals with thermoplasticized gutta-per-cha. *J Endod* 2012; 38(6):846-9
 21. Vianna ME, Conrads G, Gomes BP, Horz HP. Identification and quantification of archaea involved in primary endodontic infections. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1274-87
 22. Pardi G, Guilarte C, Cardoza E. Detección de *Enterococcus faecalis* en dientes con fracaso en el tratamiento endodóntico. *Acta Odontol Venez* 2009; 47: 110-121
 23. Love RM. *Enterococcus faecalis* - a mechanism of its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001; 34:399-405.
 24. Gopikrishna AV, Kandaswamy D, Jeyavel RK. Comparative evaluation of the antimicrobial efficacy of five endodontic root canal sealers against *Enterococcus faecalis* and *Candida Albicans*. *J Conserv Dent* 2006; 9: 2-12.
 25. Lasala, A. *Endodoncia*. 4ta. Edicion. Ed Salvat. Mexico D.F. 1992.
 26. Hata G, Hayami FS. Effectiveness of oxidative potential water as a root canal irrigant. *Int Endod J*. 2001; 34: 308-317.
 27. Andersen M, Lund A, Andreasen JO. In vitro solubility of human pulp tissue in calcium hydroxide and sodium hypochlorite. *Endod Dent Traumatol*. 1992; 8(10): 104-8
 28. Siqueira JF Jr. Microbial causes of endodontic flare-ups. *Int Endod J* 2003;36: 453-63.
 29. Siqueira JF Jr, Rocas IN, Favieri A, Abad EC, Castro AJ, Gahyva SM. Bacterial leakage in coronally unsealed root canals obturated with 3 different techniques. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*

2000;90:647–50.

30. ChavezdePaz LE. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. *J Endod* 2007;33(6):652–62. Erratum in: *J Endod* 2007; 33(11):1289.
31. Splendiani A, Livingston AG, Nicoletta C. Control of membrane-attached biofilms using surfactants. *Biotechnol Bioeng* 2006;94:15–23.
32. Nomura Y, Bhawal UK, Nishikiori R, Sawajiri M, Maeda T, Okazaki M. Effect of high-dose major components in oral disinfectants on the cell cycle and apoptosis in primary human gingival fibroblasts in vitro. *Dent Mater J* 2010;29:75–83.
33. Pereira HA. Novel therapies based on cationic antimicrobial peptides. *Curr Pharm Biotechnol* 2006;7:229–34.
34. Jaquez Bairan E, Marcano Caldera M. Una visión actualizada del uso del hipoclorito de sodio en endodoncia. Carlos Bóveda Z. El odontólogo invitado. Invitado #18. 2001
www.carlosbóveda.com/odontologosfolder/odontoinvitadoold/odontoinvitado-18. Búsqueda 09/06/04.
35. Yesilsoy C, Whitaker E, Cleveland D, Phillips E, Trope M. Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. *J Endod*. 1995; 21: 513-515.
36. Hülsmann M, Denden JM. Incidentes iatrogénicos durante la irrigación del conducto radicular-revisión de la literatura y presentación de un caso clínico. *Journal of Endodontics Practice-Edición en español*. 1998; 4(4): 15-26.
37. Lima Torres de Fleitas V, Sayáo Mia M, Alves S. Accidentes provocados por soluciones irrigadoras durante la práctica endodóntica. *Rev. Asoc. Odontol. Argent*. 2001; 89(2): 173-176.
38. Juárez RP, Lucas ON. Complicaciones ocasionadas por una infiltración accidental con una solución de hipoclorito de sodio. *Revista ADM*. 2001; 58(5): 173-176.

39. Becking AG. "Complications in the use of sodium hypochlorite during endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med oral Pathol.* 1991; 71(3): 346-348.
40. Kaufman AY, Keila S. Hypersensitivity to sodium hypochlorite. *Journal of Endodontics.* 1989; 15(5): 224-226.
41. Piskin B, Türkün M. Stability of various sodium hypochlorite solutions. *J of Endod.* 1995; 21(5): 253-255
42. H. J. Klasen, Burns, 2000; 26, 117-130.
43. Nair LS, Laurencin J. J. *Biomed. Nanotechnol.* 2007; 3: 301-316
44. Morones JR, Elechiguerra JL, Camahoo A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, Yacaman MJ. *Nanotechnology.* 2005; 16: 2346-2353.
45. C. Burda, X. Chen, R. Narayanan, M. A. El-Sayed, *Chem. Rev.*, 2005; 105, 1025–1102.
46. D. D. Evanoff, Jr., G. Chumanov, *ChemPhysChem*, 2005; 6, 1221–1231.
47. P. C. Lee, D. J. Meisel, *Phys. Chem.*, 1982; 86, 3391–3395.
48. J. A. Creighton, C. G. Blatchford, M. G. Albrecht, *J. Chem. Soc. Farad. Trans. II*, 1979; 75, 790-798.
49. Y. Sun, Y. Xia, *Science*, 2002; 298, 2176–2179.
50. I. Pastoriza-Santos, L. M. Liz-Marzán, *Pure Appl. Chem.*, 2000; 72, 83–90.
51. M. Brust, C. J. Kiely, *Colloids Surf. A Phys. Eng. Aspects*, 2002; 202, 175–186
52. Y. Kashiwagi, M. Yamamoto, M. Nakamoto, *J. Colloid Interface Sci.*, 2006, 300, 169–175
53. M. Green, N. Allsop, G. Wakefield, P. J. Dobson, J. L. Hutchison, *J. Mat. Chem.*, 2002 12, 2671–2674.
54. S. Nath, S. Praharaj, S. Panigrahi, S. Kundu, S. K. Ghosh, S. Basu, T. Pal, *Colloids Surf. A Phys. Eng. Aspects*, 2006, 274, 145–149.
55. Beyser Pipkin, DDS, PhD and Murat TQrk~in, DDS. Stability of Various Sodium Hypochlorite Solutions. *JOURNAL OF ENDODONTIC*

1995.;21: 253 -255

56. PieperDH,ReinekeW.Engineeringbacteriaforbioremediation.CurrOpin Biotech- nol 2000;11:262–70.
57. C.N.Lok,C.M.Ho,R.Chen,Q.Y.He,W.Y.Yu,H.Sun, P. K. H. Tam, J. F. Chiu, C. M. Che, J. Biol. Inorg. Chem., 2007, 12, 527–534.