

# EFFECTIVIDAD DE LA ACTIVACIÓN ULTRASÓNICA CON BIOSPADA EN TUBOS DE DENTINA FRENTE A *ENTEROCOCCUS FAECALIS*, ESTUDIO IN VITRO.

Cárdenas Rodríguez Katherine<sup>1</sup>, Ruíz Belalcázar Daniela Fernanda<sup>2</sup>, Gustavo  
Adolfo Velasco Flechas<sup>3</sup>, Sandra Elizabeth Aguilera Rojas<sup>4</sup>

## RESUMEN

*Enterococcus faecalis* es un microorganismo capaz de sobrevivir en áreas inalcanzables del conducto radicular, reportando una prevalencia del 24% a 77% en tratamiento endodóntico fallido. **Objetivo:** Comparar la efectividad de Biospada 60 y el Hipoclorito de sodio (NaOCl) 5,25% activados con ultrasonido en la desinfección de tubos de dentina infectados con *E. faecalis*. **Método:** 96 tubos de dentina fueron incubados con cepa ATCC 29212 de *E. faecalis* durante 18 días. Se dividieron en 4 grupos: Biospada 60 (Grupo A), NaOCl 5,25% (grupo B), NaOCl 5,25% + Biospada 60 (grupo C) y grupo control (grupo D). 48 horas después de la Irrigación Ultrasónica Pasiva se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC). 1 espécimen de cada grupo fue llevado a Microscopía Electrónica de Barrido. **Resultados:** Todos los grupos tuvieron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo D. No hubo diferencias significativas entre los grupos A y B. **Conclusiones:** Se observó mejor efectividad antibacteriana en el grupo C. Biospada 60 puede considerarse un coadyuvante del NaOCl para la desinfección del conducto radicular. **Palabras clave:** Enterococcus faecalis, Ultrasonidos, Irrigantes del Conducto Radicular, Hipoclorito de Sodio, Endodoncia.

1. Odontóloga, facultad de Odontología Universidad Antonio Nariño
2. Odontóloga, facultad de Odontología Universidad del Valle
3. Odontólogo Especialista en Endodoncia, Universidad Santo Tomás, Candidato a Maestría en Odontología, Universidad Nacional de Colombia.
4. Odontóloga Especialista en Semiología y Cirugía Oral, Fundación Universitaria San Martín

# EFFECTIVENESS OF ULTRASONIC ACTIVATION WITH BIOSPADA IN DENTIN TUBES AGAINST ENTEROCOCCUS FAECALIS. IN VITRO STUDY

Cárdenas Rodríguez Katherine<sup>1</sup>, Ruíz Belalcázar Daniela Fernanda<sup>2</sup>, Gustavo

Adolfo Velasco Flechas<sup>3</sup>, Sandra Elizabeth Aguilera Rojas<sup>4</sup>

## ABSTRACT

*Enterococcus faecalis* is a microorganism able to survive in unapproachable areas of the root canal, reporting a prevalence of 24% to 77% in failed endodontic treatment.

**Objective:** To compare the effectiveness of Biospada 60 and 5.25% sodium hypochlorite activated with ultrasound in the disinfection of dentin tubes infected with

*Enterococcus faecalis*. **Method:** 96 dentin tubes were incubated with *E. faecalis* strain ATCC 29212 for 18 days. They were divided into 4 groups: Biospada 60

(Group A), NaOCl 5.25% (Group B), NaOCl 5.25% + Biospada 60 (Group C) and control group (Group D). 48 hours after Passive Ultrasonic Irrigation, colony-forming

units (CFU) were counted. 1 specimen from each group was taken to Scanning Electron Microscopy. **Results:** All groups had statistically significant differences with

respect to group D. There were no significant differences between groups A and B.

**Conclusions:** Better antibacterial effectiveness was observed in group C. Biospada 60 can be considered an adjuvant to NaOCl for disinfection of root canal. **Key**

**words:** *Enterococcus faecalis*, Ultrasonics, Root Canal Irrigants, Sodium Hypochlorite, Endodontics.

1. Odontóloga, facultad de Odontología Universidad Antonio Nariño

2. Odontóloga, facultad de Odontología Universidad del Valle

3. Odontólogo Especialista en Endodoncia, Universidad Santo Tomás, Candidato a Maestría en Odontología, Universidad Nacional de Colombia.

4. Odontóloga Especialista en Semiología y Cirugía Oral, Fundación Universitaria San Martín

## Introducción

A diferencia de la cavidad oral, el sistema de conductos radiculares no tiene microbiota comensal y cualquier microorganismo detectado allí se considera un patógeno potencial.(1)La presencia de microorganismos en la pulpa dental está directamente asociada con el desarrollo de una patología periapical, por lo que establecer un control efectivo de las infecciones es un objetivo clave de la terapia endodóntica. (2) La infección dentro del conducto radicular inicia una vez la pulpa se expone luego de caries, trauma, enfermedad periodontal, iatrogenia, o por procedimientos previos. Una vez establecida, la infección avanza gradualmente en dirección apical, hasta alcanzar los tejidos perirradiculares a través del foramen apical, conductos laterales y túbulos dentinales. Seguidamente, se desarrolla el proceso inflamatorio que dependiendo de los factores de virulencia bacterianos y el sistema de defensa del huésped, ocasiona un daño significativo del tejido perirradicular con la formación de absceso o reabsorción ósea.(3)(4)

Las infecciones endodónticas son causadas por biopelículas microbianas adheridas a las superficies de la dentina que alteran el estado ambiental dentro del conducto radicular y lo tornan más anaerobio.(5) Los tipos de especies bacterianas anaeróbicas encontradas son Prevotella, Porphyromonas, Fusobacterium, Eubacterium, y Actinomyces junto con Streptococos anaerobios facultativos(6), hasta especies muy resistentes como *Enterococcus faecalis* que se caracterizan por sobrevivir en condiciones ambientales y nutricionales desfavorables (7).*Enterococcus Faecalis* es un indicador biológico ampliamente evaluado, caracterizado por sobrevivir con un

suministro deficiente de nutrientes que crece sin el apoyo sinérgico de otras bacterias, lo que lo hace un patógeno muy resistente al tratamiento endodóntico, (8)(9)(10) y es capaz de invadir los túbulos dentinarios gracias al colágeno, el cual utiliza como sustrato principal para su unión específica con la dentina.(11)(12)

Por lo anterior, la desinfección del sistema de conductos radiculares sigue siendo un gran reto por las limitaciones de la preparación mecánica y la persistencia de microorganismos que colonizan sitios anatómicos complejos y de difícil acceso, especialmente en la porción apical. (7) Es necesario implementar un protocolo de irrigación adecuado para reducir el número de microorganismos en el conducto radicular(13) ya que la irrigación manual es el método más utilizado, pero es ineficaz en la desinfección de la zona apical e istmo y transporta el irrigante solo 1 mm más allá de la punta de la aguja. (14) Este enfoque ha ido mejorado con la irrigación ultrasónica pasiva (PUI), en la cual se utiliza un dispositivo ultrasónico que produce energía acústica, que genera ondas ultrasónicas, cavitación y calor, favoreciendo así la eliminación de barrillo dentinal, abriendo los túbulos y maximizando el efecto antibacteriano del irrigante.(15) En la búsqueda de superar los inconvenientes de los irrigantes convencionales en endodoncia, se han introducido nanopartículas antimicrobianas que brindan un nuevo avance para la prevención y tratamiento de infecciones dentales debido a sus excelentes propiedades químicas y físicas.(16) El objetivo de este estudio fue Comparar la efectividad de Biospada 60 y el Hipoclorito de sodio al 5,25% activados con ultrasonido en la desinfección de tubos de dentina infectados con *Enterococcus faecalis*.

## **Materiales y métodos**

Este estudio fue aprobado por el comité de Ética de la Institución Universitaria Colegios de Colombia UNICOC (Bogotá). Inicialmente, se diseñó un protocolo en un modelo in vitro de infección intraconducto en dientes unirradiculares con cepas ATCC 29212 de *Enterococcus faecalis*. Para el ensayo de este protocolo se realizó una prueba piloto, en la cual se utilizaron 4 grupos, cada uno con 4 tubos de dentina, el grupo A correspondía a Biospada 60, el grupo B a Hipoclorito de sodio 5,25% , grupo C Biospada60 + Hipoclorito de sodio 5,25% y el grupo D a Control donde los tubos de dentina fueron infectados y no se les practicó ningún protocolo de irrigación ni activación. Se procedió a inocular 100 ul de suspensión bacteriana en una escala de McFarland de 0,5 en los tubos de dentina estériles, y se dejaron incubando durante 18 días y día de por medio, las bacterias alimentaban con caldo BHI. Luego se realizó la irrigación ultrasónica pasiva de cada grupo para finalmente observar y contar UFC/ml a las 48 horas. Esta prueba ensayo piloto arrojó resultados favorables, aunque se evidenciaron errores durante el proceso que sirvieron para hacer ajustes correspondientes.

### **Selección y preparación de especímenes**

Se utilizó el software Real Statistics para estimar tamaño de muestra para un ANOVA, con una confianza del 95%, potencia 80%, efecto error del 0,61, el tamaño de la muestra correspondió a 24 muestras por grupo. Se utilizaron un total de 96 dientes permanentes unirradiculares humanos extraídos por razones ortodónticas y periodontales. Se incluyeron dientes con raíces intactas y ápices maduros, sin

caries, tratamientos de endodoncia y restauraciones. Se excluyeron dientes con caries radicular, reabsorción radicular externa, facetas de desgaste y longitud radicular menor a 10mm. Los dientes fueron almacenados en solución salina durante 1 semana a temperatura ambiente, cada diente fue decoronado con disco de diamante (Edenta AG, Au Suiza) y se estandarizó la longitud radicular a 10mm desde la unión ameloementaria hasta apical (Fig1). Seguidamente se desinfectaron con NaOCl 5,25% (Prodont) durante 15 minutos para remover tejido orgánico. Inicialmente, los conductos radiculares fueron permeabilizados con lima preserie #10 k, después instrumentados hasta lima 80 conicidad 2 % (Coltene, Suiza) y luego con Peeso 1 y 2 (Maillefer, Suiza), entre lima y lima se irrigó con NaOCl 5,25% y una irrigación final con EDTA al 17%(Eufar) y luego inactivación del NaOCl 5,25% residual con solución salina. Se secaron con puntas de papel y se recubrió apicalmente cada raíz con ionómero de vidrio tipo 1 (GC,América), se esterizaron en autoclave durante 17 minutos a 134°C para garantizar un entorno libre de microorganismos (Fig2). Todos los procedimientos experimentales fueron realizados por el mismo operador.

### **Inoculación**

La cepa bacteriana *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 se sembró en agar sangre e incubó durante 48 horas a 37° en incubadora con atmósfera de CO<sub>2</sub>.(Fig3) (LabG&M Microgen) Una colonia fue colocada en infusión de cerebro y corazón (BHI) para obtener una suspensión bacteriana equivalente a 0,5 según escala de McFarland, y luego inocular 10-6 ml en cada tubo de dentina(Fig4). Se incubaron en CO<sub>2</sub> durante 18 días a 37° para permitir el crecimiento bacteriano.(Fig5) Se suministró caldo BHI estéril (20 µl) en los conductos radiculares día de por medio.

### **Irrigación y activación**

La muestra se dividió en 4 grupos experimentales (n=24) según el irrigante a utilizar. (Fig6) para después aplicarles irrigación ultrasónica pasiva(PUI) (Fig 7 y 8). con ultrasonido (D6/Woodpeaker) y puntas ultrasónicas (DTE Satelec ED4), las cuales fueron sumergidas en NaOCl 5,25% durante 5 minutos y luego flameadas para eliminar microorganismos y evitar contaminación cruzada en cada espécimen.

- Grupo A: n= 24 tubos de dentina irrigados con 3 ml de Biospada 60, PUI 3 ciclos de 20 segundos, 1 ml del irrigante dispensado por ciclo.
- Grupo B: n= 24 tubos de dentina irrigados con 3ml de Hipoclorito de sodio 5,25%, PUI 3 ciclos de 20 segundos, 1 ml del irrigante dispensado por ciclo.
- Grupo C: n= 24 tubos de dentina irrigados con 3 ml de Hipoclorito de sodio al 5.25%, PUI 3 ciclos de 20 segundos (1 ml del irrigante por ciclo), luego 3 ml de solución salina, PUI 1 ciclo de 20 segundos, y seguidamente irrigación con 3 ml de Biospada 60, PUI 3 ciclos de 20 segundos (1ml del irrigante por ciclo).
- Grupo D o control negativo n= 24 tubos de dentina infectados con la cepa *E. faecalis* durante 18 días y no se les aplicó ningún irrigante.

### **Evaluación del crecimiento bacteriano UFC**

Previo secado de los conductos, se introdujo una lima manual #80 (Coltene, Suiza) con movimientos de watch winding 3-4 veces, cada lima se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 ml que contenía 1 ml de PBS (Fig9) y se llevó al vórtex V1 Plus (Boeco, Germany) durante 60 segundos(Fig10). Se realizaron diluciones seriadas 3 diluciones 1 en 10 , para facilitar el cálculo de UFC, luego se tomaron 50 µl y se

sembraron en agar sangre. Las placas se incubaron a 37°C por 48 horas en CO<sub>2</sub>. Para el recuento de UFC se utilizó un contador de colonias (Boeco, Germany)(Fig11) para evaluar crecimiento bacteriano en cada grupo (Fig12-13-14-15). A los datos recopilados del conteo se le aplicó la fórmula: UFC/ml = Número de Colonias x factor de dilución.

### **Preparación de muestra para observación mediante SEM**

Aleatoriamente se eligió 1 tubo de dentina de cada grupo de estudio para realizar la observación por medio de microscopia electrónica de barrido y confrontar los resultados obtenidos en la prueba In vitro. Inicialmente se realizaron procesos de fijación y deshidratación para preservar las muestras biológicas y mantener su superficie intacta para la observación; posteriormente pasaron al secador de punto crítico semiautomático SAMDRI®-795 (Tousimis, EEUU) donde se dispusieron las muestras completamente sumergidas en alcohol puro, el sistema se enfrió a -15°C y luego, se empezó a purgar todo el alcohol remplazándolo con CO<sub>2</sub> en estado líquido. Cuando todo el alcohol fue remplazado, el sistema se calentó a 30°C, aumentando la presión de la recámara por encima de 1400 psi, siendo un estado de punto crítico para el CO<sub>2</sub>. Cuando el sistema logró estar estable, comenzó a liberar CO<sub>2</sub> dejando la muestra completamente seca y las estructuras intactas; a las muestras se les aplicó una capa de oro muy delgada de aproximadamente 10 nm de espesor. Una vez las muestras fueron metalizadas pasaron a ser observadas por SEM( LYRA3 TESCAN). Las imágenes con microscopio electrónico de barrido de después de protocolo de Irrigación Ultrasónica Pasiva en el grupo D control,



mostraron invasión bacteriana de *Enterococcus faecalis* en superficies del conducto radicular y túbulos dentinales en tercios medio y apical mientras que para los grupos A (Biospada 60), B (NaOCL 5,25%) y C (Biospada 60 + NaOCl 5,25%) se observaron los túbulos dentinales limpios, sin microorganismos residuales. (Figs 16 a 21).

### **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se organizaron en una tabla de Excel y luego fueron analizados estadísticamente con el software Real Statistics. Se aplicó la prueba de Shapiro Wilk que demostró la obtención de un único grupo con distribución normal (Grupo D), posteriormente, se aplicó Kruskal-Wallis para comparar los recuentos finales de UFC entre los 3 grupos (Tabla 1), y se realizaron comparaciones entre grupos utilizando la prueba Post Hot Nemenyi test. Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0,05$  (Tabla 2).

## RESULTADOS

En la presente investigación se buscaba comparar la efectividad de cada irrigante de forma individual y combinada (Grupos A, B y C) por medio del recuento de unidades formadoras de colonia (UFC) respecto al grupo control o grupo D al cual no se le realizó ninguna irrigación (Gráfica 3). Los resultados de los recuentos de UFC de cada grupo se resumen en la (Tabla 1).

En el análisis descriptivo, el promedio mínimo de UFC fue 16.666,7 para el grupo C, seguido del grupo B de 33.333,3 siendo el doble del anterior, seguido del grupo A que presenta 8 veces más UFC que los grupos anteriores. (Tabla 2). Con la prueba de Shapiro Wilk se encontró que las UFC no presentaron distribución normal ( $p > 0,05$ )\*, por tal razón se aplicó la prueba de Kruskal Wallis para comparar los 4 grupos ( $p < 0,05$ )\*\* obteniendo valores con diferencias estadísticamente significativas. (Tabla 2) Debido a esto se aplicó la prueba POC HOC Nemenyi para identificar las diferencias, encontrando que entre el grupo A y D existe una diferencia de 18.491.666,7 de UFC, igual sucedió entre el grupo B y D 18.708.333 de UFC, C y D con 18.725000 de UFC, con promedios de diferencias estadísticamente significativas cercanos a los 19.000.000 de UFC. (Tabla 3).

En los grupos A, B y C las UFC de *E. faecalis* disminuyeron significativamente  $p < 0.05$  en comparación al grupo D además se puede observar la efectividad de los irrigantes entre ellos mismos siendo  $p > 0,01$  (Gráfica 2).

El porcentaje de efectividad encontrado con respecto al grupo control fue de 98.7%, 99.8% y 99.9% respectivamente para el grupo A, B y C (Gráfica 3). La aplicación de la irrigación ultrasónica pasiva (PUI) demostró que potencializa la reducción bacteriana.

## DISCUSIÓN

Los fracasos endodónticos son consecuencia de la prevalencia de bacterias en el espacio del conducto radicular. Numerosos irrigantes se han desarrollado y utilizado en los últimos años, pero desafortunadamente las comunidades microbianas establecidas en biopelículas son difíciles de erradicar, y las bacterias encapsuladas en biopelículas maduras son altamente resistentes a la actividad antimicrobiana.(17)(18) El presente estudio se realizó para evaluar la efectividad de Biospada 60 y el Hipoclorito de sodio al 5,25% activados con ultrasonido en la desinfección de tubos de dentina infectados con *Enterococcus faecalis*. Este microorganismo fue elegido porque comúnmente está involucrado en el fracaso del tratamiento endodóntico y ha demostrado ser muy persistente en condiciones anaeróbicas dentro del conducto radicular, (19)(20) encontrándose alrededor del 89,6% en infecciones secundarias y 67.5% en infecciones primarias.(21)

En este estudio se observó que el grupo C donde se aplicaron los irrigantes de forma combinada Biospada 60 + Hipoclorito de sodio 5,25% tuvieron una mayor efectividad en la desinfección de *Enterococcus faecalis*, en comparación con su aplicación de forma individual. Sin embargo, también se pudo evidenciar que Biospada 60 fue igual de efectivo que Hipoclorito de sodio 5,25%. De acuerdo con los hallazgos presentes, la efectividad en la desinfección también se atribuye a la irrigación ultrasónica pasiva donde se demostró que una activación de 3 ciclos con PUI de 20 segundos cada uno, produce limpieza y reducción bacteriana favorables, lo que resulta beneficioso para el tratamiento endodóntico, ya que es un método

que mejora el flujo del irrigante a las complejidades del sistema de conductos radiculares.(22) Este proceso se llevó a cabo con puntas de ultrasonido ( DTE ED4) las cuales se reutilizaron previa desinfección por inmersión en Hipoclorito de sodio 5000 ppm por 15 minutos posterior flameación directa en la llama de 5-20 segundos, una técnica muy utilizada en el campo de la microbiología.(23)(24)

Biospada 60 cuyo principio activo es cloruro De Dimetiloctadecil[3-(trimetoxisilil)propil]amonio, contiene amonio cuaternario, según Bapat et al. las actividades antimicrobianas del amonio cuaternario contra *E. faecalis*, pueden conducir a resultados de tratamiento exitosos en odontología clínica ya interactúan con la membrana bacteriana y provoca la muerte por contacto. (25) Vale la pena señalar, que a la fecha no hay reportes en la literatura sobre la efectividad de Biospada 60 en Endodoncia, por esta razón, los resultados no se pueden comparar con estudios anteriores.

Adicionalmente se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM) para evaluar la presencia de biopelículas, así como los efectos de los protocolos de irrigación ultrasónica pasiva probados en estas comunidades microbianas de *Enterococcus faecalis*. El presente estudio, proporcionó un modelo anatómico bien estandarizado que permitió la comparación en los 3 grupos experimentales, 1 tubo de dentina en cada grupo, donde las imágenes de microscopía electrónica de barrido, son consistentes con los resultados, ya que se observaron los túbulos dentinales libres de biopelícula de *Enterococcus faecalis*, demostrando así la efectividad de la irrigación ultrasónica pasiva con Biospada60 e Hipoclorito de Sodio 5,25%.

La microscopía electrónica de barrido generalmente se utiliza para observar biopelículas intrarradiculares, no obstante, con esta técnica solo se puede realizar una evaluación cualitativa o semicuantitativa de los especímenes observados.(26)

Como se mencionó anteriormente, no hay evidencia científica acerca de la efectividad del Bioespada 60 en endodoncia. Dado que en este estudio no existió una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo A Biospada 60 y el grupo B Hipoclorito de sodio al 5.25%, Biospada 60 puede llegar a ser un desinfectante potencial, de forma individual o como coadyuvante, mejorando el proceso de desinfección en el conducto radicular, pero se requieren estudios clínicos futuros para maximizar su uso y donde se estudie el componente activo de esta molécula en un modelo animal o celular que permita evaluar la toxicidad y posteriormente la realización de pruebas in- vivo.

## CONCLUSIONES

- Biospada 60 tuvo la misma efectividad antimicrobiana que Hipoclorito de sodio 5,25% en la eliminación de *E. faecalis* en el modelo propuesto.
- La combinación de Biospada 60 + Hipoclorito de sodio al 5,25% obtuvo menor UFC/ml, por lo que podría ser considerada como coadyuvante de la desinfección del conducto radicular.
- La activación ultrasónica pasiva potencializó la reducción bacteriana de *E. faecalis* en todos los irrigantes.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Doctora Claudia Andrea Cruz y su equipo de trabajo del laboratorio REMA, por su colaboración en la realización de las pruebas microbiológicas en la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

Al Centro de Microscopía Microcore de la Universidad de los Andes en el procesamiento de las muestras para la Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Y al Profesor de estadística Gerardo Ardila Duarte, por su paciencia y eficiencia en el análisis de datos estadísticos.



## ANEXOS

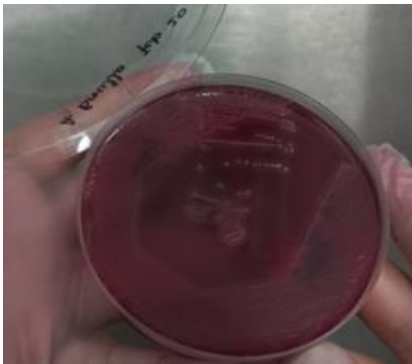
### Fotografías



Fig1: Tubo de dentina 10mm



Fig 2: Esterilización de la muestra



**Fig 3:** Cepa ATCC 29212 *E. faecalis*



Fig4: Inoculación



Fig 5: Incubación en CO2.



Fig 6: Tubos de dentina agrupados



Fig 7: Administración de irrigante

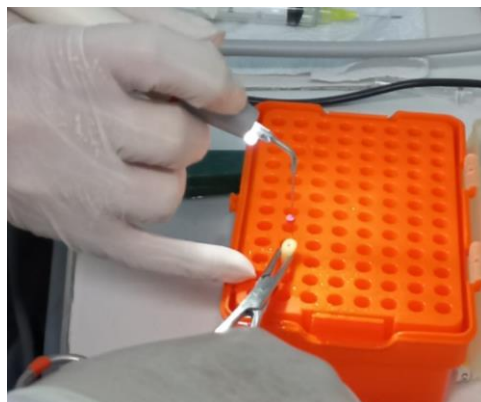


Fig8: Irrigación Ultrasónica Pasiva



Fig9: Muestra extraída con lima N° 80



Fig10: Agitación con vòrtex

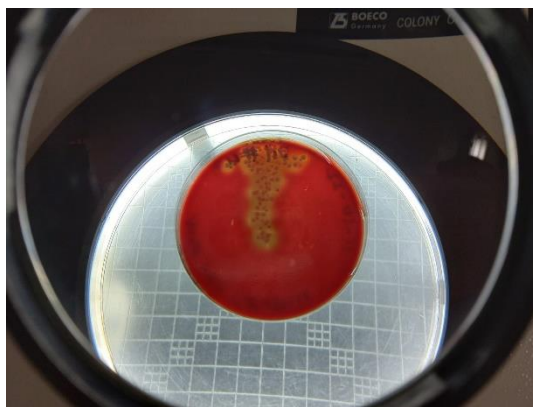


Fig11: Conteo UFC en contador de colonias

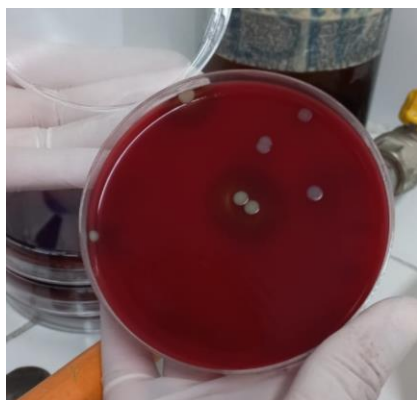


Fig12: Grupo A: UFC Biospada



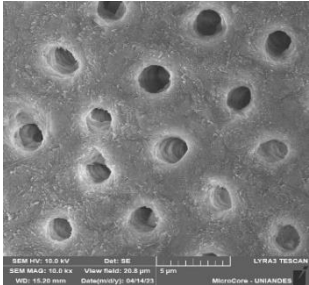
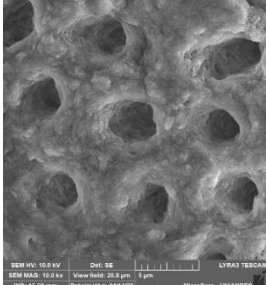
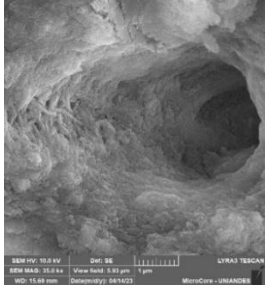
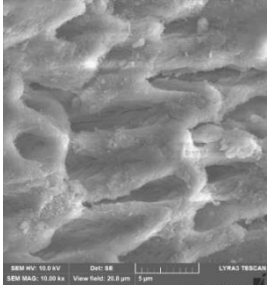
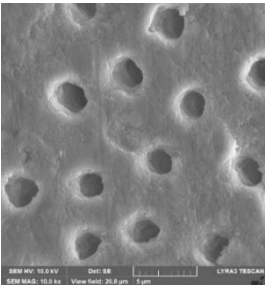
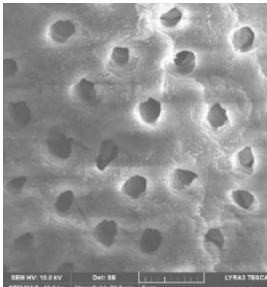
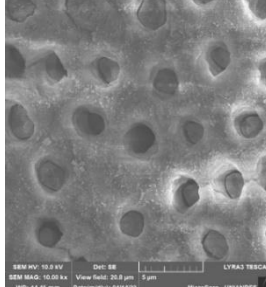
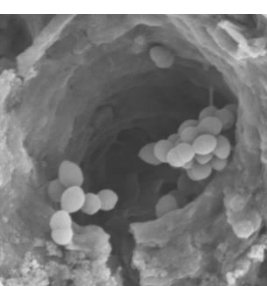
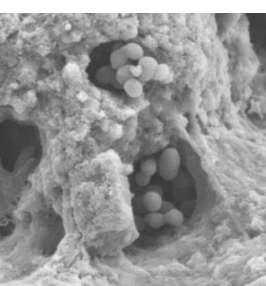
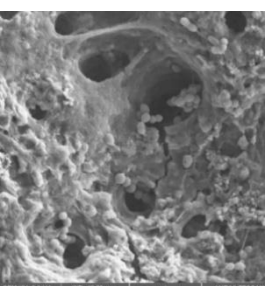
Fig13: Grupo B: UFC Hipoclorito de sodio



Fig14: Grupo C UFC Combinado



Fig15: UFC Grupo D control

|                       |                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                      |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>GRUPO A</b></p> |  <p>Fig 16: Tercio medio aumento 10.0 kx</p>                                                               |  <p>Fig 17: Tercio apical aumento 10.0 kx</p>                                                             |  <p>Fig 18: Túbulo dentinal del tercio apical aumento 35.0 kx</p>                                                                                 |
| <p><b>GRUPO B</b></p> |  <p>Fig 19: Tercio medio aumento 10.00 kx</p>                                                              |  <p>Fig 20: Tercio medio aumento 10.0 kx</p>                                                              |                                                                                                                                                                                                                                      |
| <p><b>GRUPO C</b></p> |  <p>Fig 21: Tercio medio aumento 10.0 kx</p>                                                              |  <p>Fig 22: Tercio apical aumento 10.00 kx</p>                                                           |                                                                                                                                                                                                                                      |
| <p><b>GRUPO D</b></p> |  <p>Fig 23: Invasión de Enterococcus faecalis en túbulo dentinal del tercio apical (aumento 30,7 kx)</p> |  <p>Fig 24: Invasión de Enterococcus faecalis en túbulo dentinal de tercio apical (aumento 26,1 kx)</p> |  <p>Fig 25: Colonización de Enterococcus faecalis en superficie del conducto radicular y túbulo dentinal del tercio medio (aumento 11.0 kx)</p> |

## Tablas y gráficas

Tabla 1: Conteo de UFC por solución irrigante

| CONTEO UFC                                                                                                                                                                  |                                        |                                                          |                                                                                           |                                 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| DIENTE                                                                                                                                                                      | GRUPO A:<br>BIOSPADA<br>60<br>(UFC/mL) | GRUPO B:<br>HIPOCLORITO<br>DE SODIO<br>5,25%<br>(UFC/mL) | GRUPO C:<br>BIOSPADA 60<br>+<br>HIPOCLORITO<br>DE SODIO<br>5,25%<br>COMBINADO<br>(UFC/mL) | GRUPO D:<br>CONTROL<br>(UFC/mL) |
| 1                                                                                                                                                                           | 0,0                                    | 200.000,0                                                | 0,0                                                                                       | 39.600.000,0                    |
| 2                                                                                                                                                                           | 200.000,0                              | 0,0                                                      | 0,0                                                                                       | 10.800.000,0                    |
| 3                                                                                                                                                                           | 0,0                                    | 0,0                                                      | 0,0                                                                                       | 22.400.000,0                    |
| 4                                                                                                                                                                           | 0,0                                    | 0,0                                                      | 0,0                                                                                       | 7.200.000,0                     |
| 5                                                                                                                                                                           | 400.000,0                              | 0,0                                                      | 0,0                                                                                       | 26.400.000,0                    |
| 6                                                                                                                                                                           | 0,0                                    | 200.000,0                                                | 0,0                                                                                       | 42.800.000,0                    |
| 7                                                                                                                                                                           | 400.000,0                              | 0,0                                                      | 0,0                                                                                       | 23.600.000,0                    |
| 8                                                                                                                                                                           | 800.000,0                              | 0,0                                                      | 0,0                                                                                       | 37.600.000,0                    |
| 9                                                                                                                                                                           | 0,0                                    | 0,0                                                      | 0,0                                                                                       | 29.200.000,0                    |
| 10                                                                                                                                                                          | 0,0                                    | 0,0                                                      | 0,0                                                                                       | 28.000.000,0                    |
| 11                                                                                                                                                                          | 0,0                                    | 200.000,0                                                | 0,0                                                                                       | 38.800.000,0                    |
| 12                                                                                                                                                                          | 200.000,0                              | 0,0                                                      | 0,0                                                                                       | 16.800.000,0                    |
| 13                                                                                                                                                                          | 200.000,0                              | 0,0                                                      | 400.000,0                                                                                 | 18.200.000,0                    |
| 14                                                                                                                                                                          | 400.000,0                              | 0,0                                                      | 0,0                                                                                       | 12.400.000,0                    |
| 15                                                                                                                                                                          | 0,0                                    | 0,0                                                      | 0,0                                                                                       | 14.200.000,0                    |
| 16                                                                                                                                                                          | 600.000,0                              | 0,0                                                      | 0,0                                                                                       | 17.600.000,0                    |
| 17                                                                                                                                                                          | 0,0                                    | 200.000,0                                                | 0,0                                                                                       | 31.000.000,0                    |
| 18                                                                                                                                                                          | 0,0                                    | 0,0                                                      | 0,0                                                                                       | 13.200.000,0                    |
| 19                                                                                                                                                                          | 200.000,0                              | 0,0                                                      | 0,0                                                                                       | 9.000.000,0                     |
| 20                                                                                                                                                                          | 200.000,0                              | 0,0                                                      | 0,0                                                                                       | 800.000,0                       |
| 21                                                                                                                                                                          | 0,0                                    | 0,0                                                      | 0,0                                                                                       | 600.000,0                       |
| 22                                                                                                                                                                          | 1.200.000,0                            | 0,0                                                      | 0,0                                                                                       | 3.600.000,0                     |
| 23                                                                                                                                                                          | 200.000,0                              | 0,0                                                      | 0,0                                                                                       | 4.000.000,0                     |
| 24                                                                                                                                                                          | 1.000.000,0                            | 0,0                                                      | 0,0                                                                                       | 2.000.000,0                     |
| <b>TOTAL</b>                                                                                                                                                                | <b>6.000.000,0</b>                     | <b>800.000,0</b>                                         | <b>400.000,0</b>                                                                          | <b>449.800.000,0</b>            |
| Recuento de Unidades Formadoras de Colonias UFC de Enterococcus faecalis después de la irrigación con Hipoclorito de sodio al 5,25%, Biospada 60 y la combinación de ambos. |                                        |                                                          |                                                                                           |                                 |

**Tabla 2: Análisis estadístico del conteo de UFC por cada grupo**

|                                                                      | n  | Mean         | Standard Deviation | Median       | Maximum      | Minimum   | IQR          | SWp-value | Kruskal-Wallis Test |
|----------------------------------------------------------------------|----|--------------|--------------------|--------------|--------------|-----------|--------------|-----------|---------------------|
| GRUPO A: BIOSPADA 60 (UFC/mL)                                        | 24 | 250.000,0    | 340.077            | 200.000,0    | 1.200.000,0  | 0,0       | 400.000,0    | 0,002 *   | 0,000*              |
| GRUPO B: HIPOCLORITO DE SODIO 5,25% (UFC/mL)                         | 24 | 33.333,3     | 76.139             | 0,0          | 200.000,0    | 0,0       | 0,0          | 0,001 *   |                     |
| GRUPO C: BIOSPADA 60 + HIPOCLORITO DE SODIO 5,25% COMBINADO (UFC/mL) | 24 | 16.666,7     | 81.650             | 0,0          | 400.000,0    | 0,0       | 0,0          | 0,000 *   |                     |
| GRUPO D: CONTROL (UFC/mL)                                            | 24 | 18.741.666,7 | 13.152.679         | 17.200.000,0 | 42.800.000,0 | 600.000,0 | 19.750.000,0 | 0,261**   |                     |

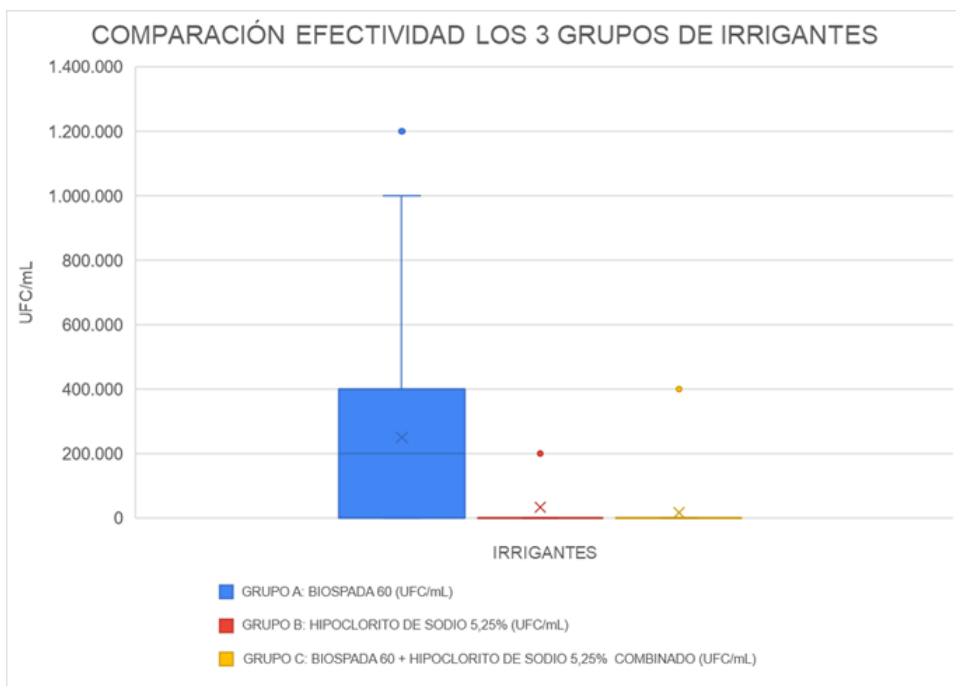
Lo siguiente indica que \*  $p < 0.05$  valores estadísticamente significativos; \*\*

$p > 0.05$  valores no significativos estadísticamente.

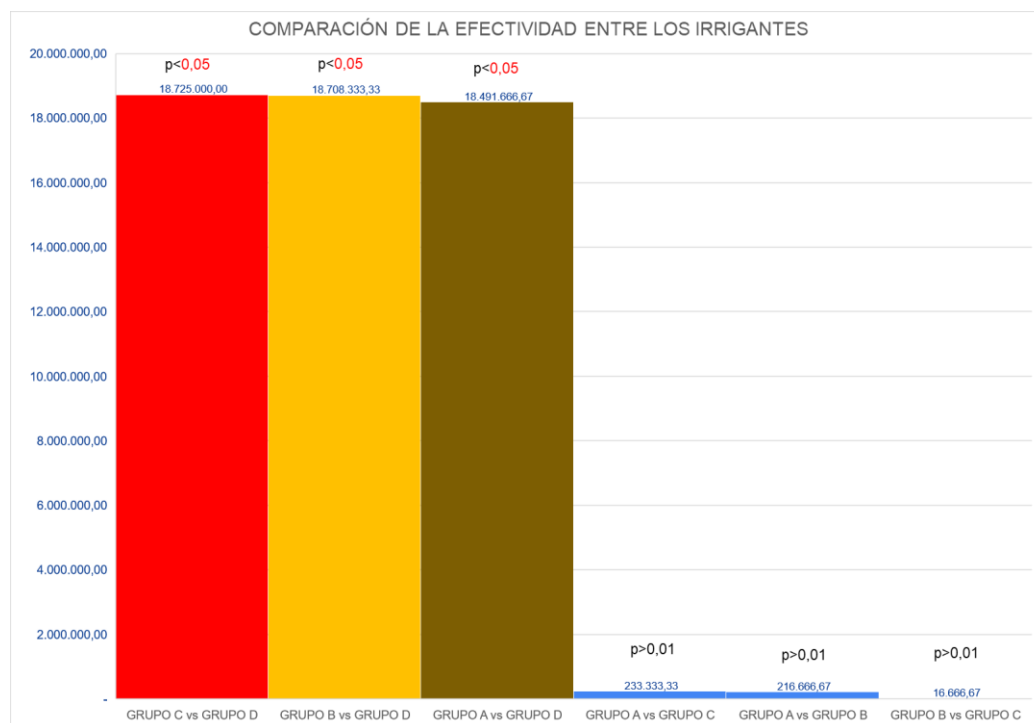
**Tabla 3: Análisis descriptivo de de Nemenyi**

| Grupo 1                                                              | Grupo 2                                                              | mean         | lower         | upper        | p-value |
|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|--------------|---------------|--------------|---------|
| GRUPO A: BIOSPADA 60 (UFC/mL)                                        | GRUPO B: HIPOCLORITO DE SODIO 5,25% (UFC/mL)                         | 216.666,7    | 0,00          | 5.186.456,8  | 0,246   |
| GRUPO A: BIOSPADA 60 (UFC/mL)                                        | GRUPO C: BIOSPADA 60 + HIPOCLORITO DE SODIO 5,25% COMBINADO (UFC/mL) | 233.333,3    | 0,00          | 5.203.123,4  | 0,093   |
| GRUPO A: BIOSPADA 60 (UFC/mL)                                        | GRUPO D: CONTROL (UFC/mL)                                            | 18.491.666,7 | 13.521.876,58 | 23.461.456,8 | 0,000   |
| GRUPO B: HIPOCLORITO DE SODIO 5,25% (UFC/mL)                         | GRUPO C: BIOSPADA 60 + HIPOCLORITO DE SODIO 5,25% COMBINADO (UFC/mL) | 16.666,7     | 0,00          | 4.986.456,8  | 0,967   |
| GRUPO B: HIPOCLORITO DE SODIO 5,25% (UFC/mL)                         | GRUPO D: CONTROL (UFC/mL)                                            | 18.708.333,3 | 13.738.543,25 | 23.678.123,4 | 0,000   |
| GRUPO C: BIOSPADA 60 + HIPOCLORITO DE SODIO 5,25% COMBINADO (UFC/mL) | GRUPO D: CONTROL (UFC/mL)                                            | 18.725.000,0 | 13.755.209,91 | 23.694.790,1 | 0,000   |

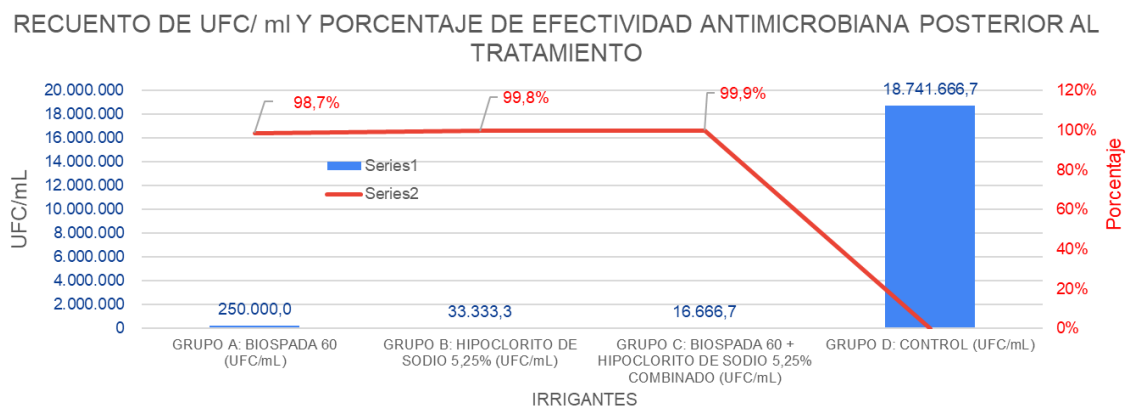
**Gráfica 1: Comparación conteo UFC grupos A, B Y C**



**Gráfica 2: Comparación de la efectividad entre los irrigantes según UFC.**



**Gráfica 3: Recuento de UFC/ ml y porcentaje de efectividad antimicrobiana posterior al tratamiento**





## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Persoon IF, Özok AR. Definitions and Epidemiology of Endodontic Infections. *Curr Oral Heal Rep*. 2017;4:278–85.
2. Boutsoukis C, Arias- MT. Present status and future directions – - irrigants and irrigation methods. *Int Endod J*. 2022;55:588–612.
3. Jr JFS. Present status and future directions : Microbiology of endodontic infections. *Int Endod J*. 2022;55:512–30.
4. Dioguardi M, Gioia G Di, Illuzzi G, Arena C, Carlo V, Caponio A, et al. Inspection of the Microbiota in Endodontic Lesions. *Dent J*. 2019;7:47:1–15.
5. Narayanan LL, Vaishnavi C. Endodontic microbiology. *J Conserv Dent*. 2010 Oct;13(4):233–9.
6. Bouillaguet S, Manoil D, Girard M, Louis J, Gaïa N, Leo S, et al. Root Microbiota in Primary and Secondary Apical Periodontitis. *Front Microbiol*. 2018;9:1–11.
7. Singh H. Microbiology of Endodontic Infections. *J Dent Oral Heal*. 2016;2(5):2–5.
8. Alghamdi F, Shakir M. The Influence of *Enterococcus faecalis* as a Dental Root Canal Pathogen on Endodontic Treatment: A Systematic Review. *Cureus*. 2020 Mar;12(3):e7257.
9. Sedgley CM, Lennan SL, Appelbe OK. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. *Int Endod J*. 2005;38:735–42.

10. Gaeta C, Marruganti C, Ali IAA, Fabbro A, Pinzauti D, Santoro F, et al. The presence of *Enterococcus faecalis* in saliva as a risk factor for endodontic infection. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023;13:1061645.
11. Chivatxaranukul P, Dashper SG, Messer HH. Dentinal tubule invasion and adherence by *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*. 2008 Oct;41(10):873–82.
12. Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res*. 1987 Aug;66(8):1375–9.
13. Moreira RN, Pinto EB, Galo R, Falci SGM, Mesquita AT. Passive ultrasonic irrigation in root canal: systematic review and meta-analysis. *Acta Odontol Scand*. 2019;77(1):55–60.
14. Piazza A, Dal-fabbro R, Cosme-silva L, Duarte PCT, Loureiro C, Cust Z, et al. Effectiveness of Passive Ultrasonic Irrigation Protocols in Simulated Complex Root Canal Cavities. *Oral*. 2023;3:1–10.
15. Llena C, Forner L, Cambralla R, Lozano A. Effect of three different irrigation solutions applied by passive ultrasonic irrigation. *Restor Dent Endod*. 2015;7658:143–8.
16. Raura N, Garg A, Arora A, Roma M. Nanoparticle technology and its implications in endodontics : a review. *Biomater Res*. 2020;24:21:1–8.
17. A. Bystrom GS. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J*. 1985;18:35–40.
18. Kovac J, Kovac D. Effect of irrigating solutions in endodontic therapy. *Bratisl*

Lek Listy. 2011;112(7):410–5.

19. Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, Gomes BPFA. Antimicrobial Susceptibility and Characterization of Virulence Genes of *Enterococcus faecalis* Isolates from Teeth with Failure of the Endodontic Treatment. *J Endod*. 2016 Jul;42(7):1022–8.
20. Bulacio M de LÁ, Galván LR, Gaudioso C, Cangemi R, Erimbaue MI. *Enterococcus Faecalis* Biofilm. Formation and Development in Vitro Observed by Scanning Electron Microscopy. *Acta Odontol Latinoam*. 2015 Dec;28(3):210–4.
21. Sedgley C, Nagel A, Dahlén G, Reit C, Molander A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. *J Endod*. 2006 Mar;32(3):173–7.
22. Susila A, Minu J. Activated Irrigation vs. Conventional non-activated Irrigation in Endodontics - A Systematic Review. *Eur Endod J*. 2019;4(3):96–110.
23. Takahashi M, Honzawa T, Tominaga R, Aoyagi H. Analysis of the influence of flame sterilization included in sampling operations on shake-flask cultures of microorganisms. *Sci Rep*. 2020 Jun;10(1):10385.
24. Richardson PS. Review: Flame sterilization. *Int J food Sci Technol*. 1987;22:3–14.
25. Bapat RA, Parolia A, Chaubal T, Yang HJ, Kesharwani P, Phaik KS, et al. Recent Update on Applications of Quaternary Ammonium Silane as an

Antibacterial Biomaterial: A Novel Drug Delivery Approach in Dentistry. *Front Microbiol.* 2022;13:927282.

26. Bhuva B, Patel S, Wilson R, Niazi S, Beighton D, Mannocci F. The effectiveness of passive ultrasonic irrigation on intraradicular *Enterococcus faecalis* biofilms in extracted single-rooted human teeth. *Int Endod J.* 2010;43(3):241–50.