

EFFECTIVIDAD BACTERIOSTATICA DE DOS TIPOS DE HIDROXIDO DE CALCIO, CON DOS VEHICULOS DIFERENTES FRENTE AL *Enterococcus faecalis*



Bohórquez Y., Camacho P., Peña T., Reyes A., Robayo I.¹
Chamorro V.²
Malaver P.³
López de Mesa C.⁴

Resumen:

Objetivo: Comparar la efectividad bacteriostática del hidróxido de calcio (EUFAR) ® mezclado con dos vehículos y el Ultracal XS® (Ultradent) frente al *Enterococcus faecalis*. **Tipo de estudio:** Experimental **Métodos:** *Enterococcus faecalis* se obtuvo en el laboratorio LEMA de la Universidad de los Andes, se cultivo en caldo estéril de TSB, verificando a las 24 horas su crecimiento. El estudio se realizó, mediante dos procedimientos. **Antibiograma:** se realizaron a razón de 4 cajas de Petri, divididas así: para los grupos experimentales (GE) se prepara el hidróxido de calcio Eufar ®, utilizando dos vehículos diferentes: Lidocaína al 2% con Epinefrina (GE-A1), Clorhexidina al 2% (GE-A2). Del mismo se prepara el Hidróxido de Calcio Ultracal XS® (GE-B). La última caja de Petri se utilizó como grupo control del medio (GC). Se llevan las cajas de Petri a la incubadora a 35 ° C, durante 48 horas, en donde se observó los halos de inhibición en dos tiempos a las 24 y a las 48 horas. **Concentración Mínima Inhibitoria:** Este ensayo contiene diferentes concentraciones de Hidróxido de calcio (Eufar®) con Lidocaína y clorhexidina e hidróxido de calcio Ultracal XS ®, estos son inoculados con *Enterococcus faecalis*; después de un periodo de inoculación, los 12 tubos de ensayo por concentración en los que se encuentra la mezcla son examinados por la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano durante 48 horas. La actividad del producto a analizar debe ser menor a mayor concentración. **RESULTADOS: Antibiograma:** se observa respuesta inhibitoria en GE-A2. **Concentración mínima inhibitoria:** el Ge-A2 presenta inhibición de crecimiento bacteriano en todas las concentraciones en las que fue diluido. **CONCLUSIONES:** La efectividad bacteriostática del Hidróxido de calcio (EUFAR) ® es mayor que la del Hidróxido de calcio ULTRACAL XS (ULTRADENT) ®, frente al *Enterococcus Faecalis*. Se observó que el Hidróxido de calcio junto con la clorhexidina GE - A2, presentan la mayor inhibición del *Enterococcus faecalis*, por esto se reconoce este como el mejor vehículo en su utilización con el Hidróxido de calcio (EUFAR) ®.

Palabras claves: Hidróxido de Calcio, *Enterococcus faecalis*, Bacteriostático.

Abstract:

Objective: To compare the bacteriostatic effectiveness of calcium hydroxide (EUFAR) ® mixed with two vehicles and Ultracal XS ® (Ultradent) against *Enterococcus faecalis*. **Methods:** *Enterococcus faecalis* was obtained in the laboratory LEMA, University of the Andes, was grown in sterile TSB broth, checking after 24 hours growth. The study was conducted by two procedures. **Sensitivity:** is conducted at a rate of 4 petri dishes, divided as follows: for the experimental groups (GE) is prepared calcium hydroxide Eufar ®, using two different vehicles: 2% lidocaine with epinephrine (GE-A1), Chlorhexidine 2% (GE-A2). The same is prepared calcium hydroxide Ultracal XS ® (GE-B). The last Petri dish was used as medium control group (CG). They take the Petri dishes to the incubator at 35 ° C for 48 hours, where the halos of inhibition observed in two times at 24 and 48 hours. **Minimal Inhibitory Concentration:** This essay contains different concentrations of calcium hydroxide (Eufar ®) with lidocaine and chlorhexidine and calcium hydroxide Ultracal XS ®, they are inoculated with *Enterococcus faecalis*, after a period of inoculation, the 12 test tubes per concentration where is the mixture are examined for the presence or absence of bacterial growth for 48 hours. The activity of the product for testing should be better at higher concentrations. **Results:** Antibigram: inhibitory response is observed in GE-A2. Minimum inhibitory concentration: Ge-A2 presents the inhibition of bacterial growth at all concentrations in which it was diluted. **Conclusions:** The bacteriostatic effectiveness of calcium hydroxide (EUFAR) ® is greater than that of calcium hydroxide Ultracal XS (Ultradent) ®, against *Enterococcus faecalis*. It was observed that calcium hydroxide with chlorhexidine GE - A2 showed the highest inhibition of *Enterococcus faecalis*, so this is recognized as the best vehicle to be used with calcium hydroxide (EUFAR) ®.

Keywords: Calcium hydroxide, *Enterococcus faecalis*, Bacteriostatic

*Estudiantes X semestre. ** Asesor Científico. *** Asesora Metodológica. **** Asesora Estadística.

Introducción:

La pulpa Dental es un tejido blando que contiene nervios, vasos sanguíneos y tejido conectivo. Esta se puede ver afectada por diferentes factores: de origen químico, traumático, térmico, eléctrico y bacteriano; razón por la cual debemos identificar los microorganismos más frecuentes en las lesiones del tejido pulpar, que pueden generar además de una afección sintomática y dolorosa, la necrosis. (1). Dentro de la clasificación de las lesiones peri apicales encontramos la periodontitis apical crónica también conocida en la nueva clasificación como periodontitis apical crónica, esta es una infección de origen pulpar con inflamación y destrucción del periodonto apical; asintomático, aunque puede haber dolor espontáneo no sensible a la percusión ni a la palpación, no hay respuesta a las pruebas eléctricas y térmicas, el órgano pulpar está necrótico e infectado, hay leve movilidad en algunos casos; a nivel radiográfico se observa zona radio lúcida delimitada bien definida a nivel peri apical y en algunas ocasiones leve ensanchamiento del espacio del ligamento periodontal, este tipo de lesiones son las que en un amplio porcentaje ocasionan la infección del conducto con *Enterococcus faecalis*. (2). Este microorganismo es anaerobio facultativo, estos son los que terminan predominando en las lesiones de origen dental en estado crónico. Se ha comprobado en estudios in Vitro e in vivo que las bacterias son capaces de colonizar y desarrollarse en el interior de los túbulos dentinarios del conducto radicular y que, a veces, no se consigue su eliminación completa con la instrumentación. (3).

Cuando el medicamento intra conducto permanece más tiempo en este lugar puede penetrarse en lugares no alcanzados por instrumentos o sustancias irritantes. Además actúa como barrera física previniendo el suministro nutritivo a la bacteria y la aparición de una nueva infección. (4).

Por lo tanto, los principios del tratamiento endodóntico de un diente deben minimizar el número de microorganismos alojados en los túbulos dentinales, debido a que estos pueden constituir un depósito en el canal de la raíz, infección de los tejidos circundantes y la reinfección. Un estudio informó que el

Enterococcus faecalis no invade los túbulos dentinales hasta después de dos semanas de incubación cuando el cemento está intacto. (5).

Uno de los objetivos del tratamiento de conductos es siempre la obturación tridimensional del sistema de conductos incluyendo todas sus ramificaciones. Para conseguirlo, la fase de desinfección y conformación debe favorecer la remoción de todos los restos orgánicos, facilitar un buen acceso al foramen y ofrecer una superficie adecuada para la colocación del material de obturación permanente. Se ha demostrado que la instrumentación e irrigación bacteriana brindará del 50% al 70% de conductos infectados libres de microorganismos. Estos y sus productos tóxicos son responsables del desarrollo y persistencia de las lesiones periapicales. Es por ello crucial el tratamiento del conducto radicular infectado para evitar la recidiva de la enfermedad. (6). La irrigación con agentes antimicrobiales y el medicamento intraconducto Hidróxido de Calcio son usados con el propósito de eliminar las bacterias; el hidróxido de calcio puede ser presentado de dos maneras comerciales: pasta y polvo, cada una por separado posee las características generales como lo son su baja solubilidad en agua, su pH alcalino, aproximadamente de 12.5, esta gran propiedad le permite convertirse en un excelente bactericida, incluso las esporas son eliminadas al ponerse en contacto con este elemento. (7)

La solución anestésica utilizada como vehículo certifica que cerca a un pH de 7.4 puede ser más efectiva y diligente ante los microorganismos dado que al mezclarlo con el Hidróxido de Calcio llega a formar una pasta homogénea que es fácil de retirar del conducto radicular debido a que no se consolida. Esta combinación de medicamentos no presenta ninguna alteración química entre los mencionados y llegan a mantener su pH. Algunos escritores afirman que esta combinación no tiene ningún cambio significativo sobre el *Enterococcus faecalis* y las pseudomonas, puesto que el hidróxido de calcio por sí solo no posee efecto sobre estos. (8).

Otro de los vehículos que utilizamos fue la clorhexidina, esta es utilizada como sustancia intraconducto en endodoncia, tiene un gran espectro de actividad antimicrobiana por

sus características, se absorbe a la pared celular del microorganismo; En concentraciones menores ejerce una función bacteriostática, en altas concentraciones es un potente bactericida; Otras de sus características es la baja toxicidad a los tejidos peri apicales en algunos, estudios previos comprueban que la clorhexidina al ser mezclada con hidróxido de calcio, fueron eficientes en la eliminación de *Enterococcus faecalis*, el vehículo y el medicamento determina la velocidad de disociación iónica que causa la pasta que se solubiliza y se reabsorbe a tasas diferentes por los tejidos peri apicales y desde el interior del conducto radicular.(9) Cuanto más baja la viscosidad, mayor será la disociación iónica. El alto peso molecular de los vehículos de uso común minimiza la dispersión de hidróxido de calcio en los tejidos y mantiene la pasta en la zona deseada para períodos más largos de tiempo. (9).

La acción bactericida del $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ha sido relacionada con la liberación de iones hidroxilo, los cuales son radicales altamente oxidantes, altamente reactivos y letales para las bacterias. En ellas puede causar daño a la membrana citoplasmática, al destruir sus fosfolípidos; desnaturalización de proteínas por alcalinización, por lo que muchas enzimas pierden su actividad biológica, alterando el metabolismo celular; daño al ADN bacteriano, inhibiendo la replicación celular y la pérdida de genes. También se ha postulado que el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ es capaz de alterar el pH del medio donde es colocado e incluso hasta en sitios distantes, lo cual aumenta su efecto bactericida. El hidróxido de calcio, al ser una sustancia altamente alcalina (pH entre 10- 12), sus efectos dependen también de la preparación química y de la disponibilidad del Ion hidroxilo en solución. Es un polvo blanco que se obtiene por la calcinación del carbonato cálcico. (10). Varios estudios in Vitro han comprobado la desinfección de los túbulos dentinales por medicamentos, han recomendado al hidróxido de calcio como una sustancia poderosa, alcalina debido a sus efectos biológicos. Apoyada esta teoría por estudios realizados ente el hidróxido de calcio y *Enterococcus faecalis* Este debe difundirse por los túbulos dentinales y alcanzar niveles suficientes para ser mortal (11). Los medios de transporte (vehículos) se pueden clasificar

en acuoso, viscosos y aceitosos, las propiedades clínicas del hidróxido de calcio dependen del cambio de vehículo utilizado. (12).

Es por esto que surgió la necesidad de establecer ¿cuál es la efectividad bacteriostática del Hidróxido de Calcio asociado a los vehículos (lidocaína al 2% y Clorhexidina al 2%), y la capacidad en la eliminación del *Enterococcus faecalis*? de tal manera que proporcionen mayor eficacia clínica.

El objetivo de este estudio fue comparar la efectividad bacteriostática del hidróxido de calcio (EUFAR) ® mezclado con dos vehículos y el Ultracal XS® (Ultradent) frente al *Enterococcus faecalis*.

Método

Estudio Experimental. El objeto de estudio fue la efectividad bacteriostática del hidróxido de calcio, frente al *Enterococcus faecalis*, proveniente de un cultivo realizado en el laboratorio LEMA de la Universidad de los Andes. El laboratorio realizó dos procedimientos un antibiograma y determino la concentración mínima inhibitoria. Teniendo en cuenta que el microorganismo es anaerobio; Se realizó el cultivo por medio de la anaerobiosis; según Laboratorio LEMA.

Antibiograma:

Se sembró una cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, microorganismo anaerobio facultativo en 4 cajas de Petri con medio de Agar Muller Hilton. En el (GE- A1) se realizó la mezcla de Hidróxido de calcio EUFAR a una concentración de 0.09 gramos de polvo y 300 micro litros de solución anestésica Lidocaína al 2%, luego esta solución se diluyo en una caja de Petri con la cepa de *Enterococcus faecalis*; En el (GE-A2) mezclamos de Hidróxido de calcio EUFAR a una concentración de 0.09 gramos de polvo y 300 micro litros de Clorhexidina al 2%, luego diluimos esta solución en una caja de Petri con la cepa de *Enterococcus faecalis*. En el (GE-B) a la caja de Petri que contiene la cepa de *Enterococcus faecalis*, se le aplico el Hidróxido de calcio Ultracal XS ®.La ultima caja contiene el (GC),este contiene el grupo control donde solamente se sembró la cepa de *Enterococcus faecalis*, este ensayo se utilizo

para establecer un control de calidad interno y asegurar que el procedimiento ofrezca un resultado confiable, se llevaron las cajas de Petri a la incubadora a 35 ° C, durante 48 horas, en donde se observamos los cambios en dos tiempos a las 24 y a las 48 horas. La recolección de resultados se realizó en las primeras 24 horas y completadas las 48 horas.

Concentración mínima inhibitoria:

Este ensayo contiene diferentes concentraciones del producto a analizar en este caso (Hidróxido de calcio (EUFAR®) con Lidocaína y clorhexidina e hidróxido de calcio Ultracal XS ®), estos son inoculados con *Enterococcus faecalis*; después de un adecuado periodo de inoculación, los tubos de ensayo en los que se encuentra la mezcla fueron examinados por la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano según la concentración a la que se encuentra la solución. La actividad del producto a analizar debe ser la menor concentración en la cual es inhibido el crecimiento del microorganismo. (13). Para este procedimiento los microorganismos fueron sometidos a un crecimiento en el caldo de Tripticasa de soya (TSB) por 24 horas; se lavaron los microorganismos con solución salina a una concentración del 0.85%. Luego se colocaron 4 filas de 12 tubos en una gradilla, cada una de ellas dispuesta para concentraciones al 1%, 2%, 5% y 100%, en donde al primer tubo de cada fila se le dispensaron 4ml de TSB y 2.4ml de TBS del tubo # 2 al 12; Se dispensaron 0.4ml de la solución a analizar (Hidróxido de calcio (EUFAR®) – Lidocaína 2%) en el primer tubo de la fila de doce quedando este con un volumen total de 4.4ml; Se mezclaron las soluciones en el vortex y se transfirieron 2ml del primer tubo al segundo tubo de la misma fila, este procedimiento se repitió en los tubos restantes hasta llegar al último tubo de la fila (# 12); en donde se descartaron 2ml, para que el volumen total de este sea 2.4ml, después se inoculó cada tubo con 0.1ml (100 micro – litros) de la bacteria *Enterococcus faecalis*, Luego se inoculó un tubo de control que contiene solamente 0.1ml del medio de cultivo TSB además de inocular un tubo de control que contiene solamente 0.1ml del microorganismo *Enterococcus faecalis*. Los tubos de ensayo se incubaron por 48 horas a 35 ° C, pasadas las 48 horas las soluciones contenidas en los

tubos de ensayo se incubaron en cajas de Petri en Agar nutritivo para la toma de resultados. Se tomó una caja de Petri para dos tubos, por fila de 12 tubos se utilizaron 6 cajas. Se tomó el tubo # 1 y con un asa estéril se llevó la solución al Agar en la caja de Petri hasta que se completó este procedimiento con los tubos restantes de cada fila. Se colocaron las cajas de Petri en la incubadora a 35 ° C, durante 24 horas. Posteriormente durante la toma de resultados la concentración mínima inhibitoria se expresa en miligramos por litro (MG/L) y el resultado se reportó tomando el tubo inmediatamente anterior al cual hubo crecimiento bacteriano, realizando esta lectura de derecha a izquierda (del tubo # 12 al #1). Luego según el tubo en donde no haya crecimiento bacteriano se verifica en una tabla la concentración y los MG/L a los que se debe encontrar Hidróxido de calcio (EUFAR®) – Lidocaína 2% para inhibir el crecimiento bacteriano. (13).

Dentro de las consideraciones éticas los investigadores declaran no tener conflicto de intereses. Además debe tenerse en cuenta que los resultados de esta investigación no afectarán la comercialización de dichos productos por lo que nuestro objetivo es específicamente institucional y académico.

Resultados:

Antibiograma

A las 24 horas se observó el inicio de formación de un halo de inhibición alrededor del medicamento; pasadas las 48 horas en el GE – A1 Y GE – B, hubo formación de halo de inhibición, mientras que en el GE- A2, si hubo inhibición del microorganismo creando un promedio de

1.243 cm 2. (Figura 1 y Tabla 1)



Figura 1. Resultados Antibiograma GE-A2 A las 24 horas.

MUESTRA	ANÁLISIS	TÉCNICA	RESULTADO
Hidróxido de calcio EUFAR disuelto Lidocaína (GE- A1)	Evaluación de la actividad antimicrobiana para <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC2921.	Prueba de difusión.	No presentó Inhibición Área: 0 cm 2
Hidróxido de calcio EUFAR disuelto Clorhexidina (GE- A2)	Evaluación de la actividad antimicrobiana para <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC2921.	Prueba de difusión.	Presentó inhibición Área 1: 1,183 cm2 Área 2: 1,329 cm2 Área 3: 1,217 cm2 Promedio= 1,243 cm 2
Evaluación de la actividad antimicrobial del Hidróxido de calcio ULTRACAL (GE- B)	Evaluación de la actividad antimicrobial para <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC2921	Prueba de difusión.	No presentó Inhibición Área: 0 cm 2

Tabla 1. Grado De inhibición bacteriana (Antibiograma).

GE – A1: Hidróxido de calcio (EUFAR) + Lidocaína 2%.

GE – A2: Hidróxido de calcio (EUFAR) + Clorhexidina 2%.

GE – B: Hidróxido de Calcio (ULTRACAL XS (ULTRADENT)).

Concentración Mínima Inhibitoria

Después de pasar las concentraciones al 1%, 2%, 5% y 100% de cada uno de los grupos GE – A1, GE – A2 y GE-B a cajas de Petri, se tomo el 100% como resultado final el GE – A1 tubo inhibición en el tubo # 2; GE – A2 tubo # 8 y GE – B tubo # 2; Según el tubo donde se presento inhibición se saca el valor mg/l. (Figura 2 y Tabla 2)

En la figura 3 podemos observar que el único grupo que presento inhibición en todas las concentraciones a las que fue sometido el medicamento fue GE – A2.

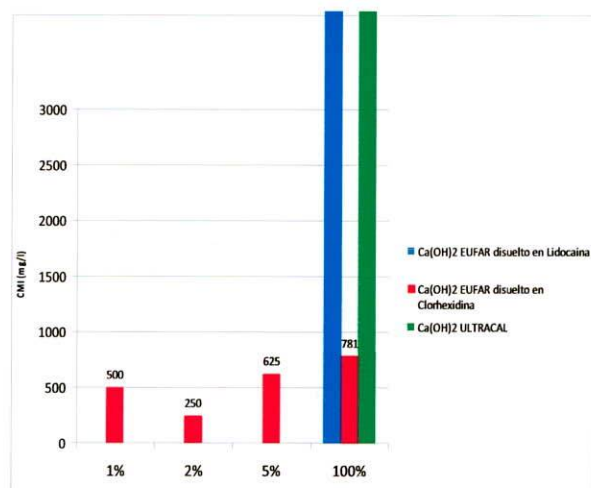
Figura 2. Resultados CMI. Tubo 8 sin crecimiento bacteriano.



Tabla 2. Resultados de concentración mínima inhibitoria según la concentración a la que se utilizo el medicamento.

MUESTRA	ANÁLISIS	CMI 1%	CMI 2%	CMI 5%	CMI 100%
Hidróxido de calcio EUFAR disuelto Lidocaína (GE- A1)	Coefficiente mínimo inhibitorio CMI para <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 método NTC 2455.	No presentó inhibición	No presentó inhibición	No presentó inhibición	CMI = 50.000 mg/l.
Hidróxido de calcio EUFAR disuelto Clorhexidina (GE- A2)	Coefficiente mínimo inhibitorio CMI para <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 método NTC 2455.	CMI = 500 mg/l.	CMI = 250 mg/l.	CMI = 625 mg/l.	CMI = 781 mg/l.
Evaluación de la actividad antimicrobial del Hidróxido de calcio ULTRACAL (GE- B)	Coefficiente mínimo inhibitorio CMI para <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 método NTC 2455.	No presentó inhibición	No presentó inhibición	No presentó inhibición	CMI = 50.000 mg/l.

Figura 3. Comparación de la concentración mínima inhibitoria de EUFAR® con dos vehículos y ULTRACAL® para la inhibición del *Enterococcus faecalis*.



Discusión:

Se selecciono, el *Enterococcus faecalis* en este estudio porque es una bacteria facultativa que al ser aislada se encuentra dentro de los conductos radiculares infectados y puede estar relacionada con el fracaso del tratamiento del conducto radicular. (11,14,15) Sin embargo, la importante participación del *Enterococcus faecalis* con enfermedades asintomáticos periapicales apoya la hipótesis de que los *Enterococcus* son microorganismos en general no muy virulento, y su emergencia como patógenos puede ser mucho más relacionada con la resistencia a varios agentes antimicrobianos que a la alta virulencia. (11)

Los estudios han revelado que el *Enterococcus faecalis* tiene la capacidad de penetrar en los túbulos dentinarios, a veces en un grado de profundidad, esta propiedad puede permitir que esta especie pueda escapar de la acción de los instrumentos de endodoncia y soluciones de irrigación utilizadas durante la preparación biomecánica. (16). Estudios realizados por Stephen y col, en 2005, nos dicen que A pesar de que el mecanismo exacto de acción del $\text{Ca}(\text{OH})_2$ aún es desconocido, su

actividad antimicrobiana es generalmente considerada estar relacionada con la liberaciones de iones de hidroxilo en un entorno acuoso produciendo (a) Daño a la membrana citoplasmática (b) Desnaturalización de proteína, (c) daño en el DNA. (16)

Según estudios realizados por Gomes, Souza y Col, concluyeron que el gel de Clorhexidina sola inhibe completamente el crecimiento del *Enterococcus Faecalis*. La combinación de Hidróxido de Calcio y Clorhexidina tiene una acción antibacteriana al 100% en sus primeros días. Esta acción se da debido a su pH alto (12.8) (Clorhexidina pH 7.0, Hidróxido de Calcio pH 11.0), sugiriendo un incremento de la capacidad de la molécula ionizada de Clorhexidina (17)

Basado en los resultados de esta investigación el hidróxido de calcio al ser asociado con vehículos como la choherxidina, represento una muy marcada eficacia ante el *E. faecalis*, muy posiblemente por su efecto al elevar el pH y ser efectivo con un pH acido.

Conclusiones:

- Bajo las condiciones de este estudio la mezcla de Hidróxido de calcio con Lidocaína GE – A1; GE – A2 Clorhexidina y GE – B Ultracal XS, mostró en el antibiograma un mayor halo de inhibición en el GE –A2.
- Se observo que el Hidróxido de calcio junto con la clorhexidina GE – A2, presentan la mayor inhibición del *Enterococcus faecalis*, por esto se reconoce este como el mejor vehículo en su utilización con el Hidróxido de calcio (EUFAR) ®.
- La efectividad bacteriostática del Hidróxido de calcio (EUFAR) ® es mayor que la del Hidróxido de calcio ULTRACAL XS (ULTRADENT) ®, frente al *Enterococcus Faecalis*.

1. Sahli, C., Brau, C., Aguadé, E. Endodoncia. Técnicas clínicas y bases científicas. Ed. Masson. Barcelona. 2001. Capítulos 6 y 7.
2. Estrela C y Col. Antimicrobial Evaluation of Calcium Hydroxide in Infected Dentinal Tubules. Journal Endodontic. 1999; 25,(6):416 – 418.
3. Berríos Q. *et al.* Respuesta pulpar frente a diferentes agentes cementantes. Rev. Estomatología. 2004; 14(1-2):84-8.
4. Siqueira. JF. y col. Disinfection by Calcium Hydroxide Pastes of Dentinal Tubules Infected with Two Obligate and One Facultative Anaerobic Bacterium. Journal Endodontic. 1996; 22(12):674 – 676.
5. Athanassiadis, B., Abbott, PV, Walsh LJ. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontic. 2007. Australian Dental Journal Supplement 52 :(1): 64-82.
6. Sorlano C. y col. Endodontic therapy associated with calcium hydroxide as an intracanal dressing: microbiology evaluation by the checkerboard DNA- DNA hybridization technique. Journal of endodontic. 2005; 31 (2): 302- 307.
7. Behnen, M. y Col. Antimicrobial activity of several calcium hydroxide preparations in root canal dentin. Journal of Endodontic. 2001; 27(12):765 – 767.
8. Leal, D. Pulgarín, M. Difusión del Ion calcio de cuatro materiales con base en hidróxido de calcio: Calasept - Ultracal, conos de Hidróxido de calcio, Eufar. Tesis postgrado de endodoncia. 1999. T.O.E 0042. Colegio Odontológico Colombiano
9. Gomes BPFA., Souza SFC y Col. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. International Endodontic Journal. 2003. 36: 267-275.
10. Barquero León L., Rodríguez Cavallini E. Efecto Antibacteriano in Vitro del Hidróxido de Calcio. UCR. 2005; (7):77 – 80.
11. Rocas, IN. y col. Association of *Enterococcus faecalis* With Different Forms of Periradicular Diseases. Journal of Endodontic. 2004; 30(5): 315 – 320.
12. Sorlano C. y col. Endodontic therapy associated with calcium hydroxide as an intracanal dressing: microbiology evaluation by the checkerboard DNA- DNA hybridization technique. Journal of endodontic. 2005; 31 (2):302 – 307.
13. Norma técnica colombiana, NTC 2455, 3ra actualización, Desinfectantes, limpiadores líquidos para uso doméstico, ed. Icontec. 15 – 21.
14. Peculiene V. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root –filled canals in a Lithuanian population. Journal of Endodontic. 2000, 26(12):593-95.
15. López-Marcos JF. Etiología, clasificación y patogenia de la patología pulpar y periapical. Medicina oral - patología oral - bucal 2004; 9: 52-62.
16. Stephen J. y col. Dentinal Tubule Disinfection Using Three Calcium Hydroxide Formulations. Journal of Endodontic. January 2005, 31(1): 50 – 52.
17. Gomes, Souza y Col. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine *in vitro*. Journal Endodontic. 2003 ;(36):267-275.