

**EFFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA CONTRA *ENTEROCOCCUS*
FAECALIS DE LANANOPARTÍCULA BIOSPADA 60. VS NAOCL AL
5.25% EN TUBOS DE DENTINA
ESTUDIO IN VITRO**

**ANNA KARINA MANJARRES REBOLLEDO, CESAR PENAGOS
LEYTON**

INSTITUCIÓN UNIVERSITARIA COLEGIOS DE COLOMBIA UNICOC

ÁREA DE EDUCACIÓN AVANZADA Y CONTINUADA

POSTGRADO EN ENDODONCIA

**BOGOTÁ
17/11/2022 DE 2018**

**EFFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA CONTRA *ENTEROCOCCUS FAECALIS* DE LA
NANOPARTÍCULA BIOSPADA 60. VS NAOCL AL 5.25% EN TUBOS DE DENTINA
ESTUDIO IN VITRO**

ANNA KARINA MANJARRES REBOLLEDO, CESAR PENAGOS LEYTON

ASESOR CIENTÍFICO:

Dr. GUSTAVO VELASCO FLECHAS
Odontólogo. Especialista en Endodoncia Universidad Nacional

ASESOR METODOLÓGICO:

DRA. SANDRA ELIZABETH AGUILERA ROJAS
Odontóloga, Maestría Ciencias Básicas Biomédicas y Especialista en Semiología y Cirugía Oral.
Asesor metodológico.

ASESOR ESTADÍSTICO

HÉCTOR FAVIO RESTREPO
Medico Epidemiólogo y estadístico

**INSTITUCIÓN UNIVERSITARIA COLEGIOS DE COLOMBIA
UNICOC
ÁREA DE EDUCACIÓN AVANZADA Y CONTINUADA
POSTGRADO EN ENDODONCIA
BOGOTÁ
17/11/ DE 2022**

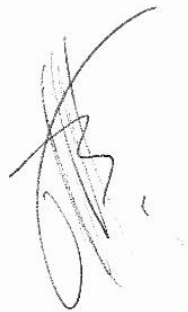
El Trabajo de grado

“EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA CONTRA *ENTEROCOCCUS FAECALIS* DE LANANOPARTÍCULA BIOSPADA 60. VS NAOCL AL 5.25% EN TUBOS DE DENTINA ESTUDIO IN VITRO”

Fue elaborado por **Anna Karina Manjarres, Cesar Penagos Leyton** como requisito para optar por el título de especialista en **Endodoncia**.

La sustentación se llevó a cabo 07 de diciembre de 2022

Acta No. 06-2022



Dr. Gustavo Adolfo Velasco Flecha
Asesor(a) Científico(a)

Dr(a). Sandra Elizabet Aguilera Rojas
Asesor(a) Metodológico(a)

Dra. Sonia R. Unriza Puin
Directora Centro de Investigación
Colegio Odontológico – CICO (Bogotá)

Dra. Sandra Elizabeth Aguilera Rojas
Directora de Investigación y Gestión del Conocimiento
Institución Universitaria Colegios de Colombia – UNICOC

DEDICATORIA

En primer lugar, a Dios y a cada una de las personas que hicieron parte del trabajo, sin su ayuda no hubiese sido posible la realización del mismo.

A nuestras familias por el apoyo incondicional y la motivación que nos brindaron para seguir adelante, en el desarrollo de este trabajo y en la culminación de los estudios para obtener el título de especialista.

AGRADECIMIENTOS

Los autores del presente trabajo expresamos nuestros agradecimientos a Dios. A nuestros padres y familia por el apoyo y la confianza brindada durante el desarrollo de este trabajo, a nuestros asesores, los Doctores. Gustavo Adolfo Velasco Flechas (Científico) y Sandra Elizabeth Aguilera (Metodológico), por orientarnos en el desarrollo del trabajo ya que sus aportes como profesionales fueron fundamentales para la culminación del mismo, a ellos nuestros más sinceros agradecimientos.

También al centro de investigación odontológica de la Universidad Javeriana y Centro de Microscopía Micro Core de la Universidad de los Andes que aceptaron su participación y colaboración en el presente estudio.

Por último, le agradecemos a los pacientes que nos donaron sus dientes extraídos para participar en el presente estudio y hacer posible la realización del mismo.

TABLA DE CONTENIDO

Cuerpo del trabajo

Introducción

1. Aspectos Teóricos- Científicos	16
1.1. Planteamiento del Problema	16
1.2. Justificación	18
1.3. Propósito	21
1.4. Antecedentes	21
1.5. Marco Teórico	23
1.5.1. Microorganismos: Microbiota Oral	23
1.5.2. Microbiota Del Sistema De Conducto Radicular	23
1.5.3. Microorganismos Anaerobios Resistentes	25
1.5.3.1. Microbiota En Infección Primaria	26
1.5.3.2. Microbiota En Infección Secundaria	26
1.6. Marco Conceptual	28
1.6.1. <i>Enterococcus Faecalis</i>	28
1.6.1.1. Generalidades	28
1.6.1.2. Mecanismos de resistencia de <i>E. faecalis</i>	30
1.6.2. Irrigantes en endodoncia	32

1.6.2.1.	Objetivo de la irrigación	32
1.6.2.2.	Acciones deseadas de los irrigantes	33
1.6.2.3.	Sistemas de irrigación	34
1.6.2.4.	Irrigantes utilizados en el tratamiento endodóntico	35
1.6.3.	Hipoclorito de Sodio	36
1.6.3.1.	Generalidades del hipoclorito de sodio	36
1.6.3.2.	Mecanismo de acción del hipoclorito de sodio	37
1.6.3.3.	Actividad antifúngica	39
1.6.3.4.	Toxicidad del NaOCl	39
1.6.3.5.	NaOCL y biopelícula.	40
1.6.4.	Nanopartículas (NP's)	41
1.6.4.1.	Clasificación de las nanopartículas.	42
1.6.4.2.	Mecanismo De Acción.	44
1.6.4.3.	Interacción electrostática	44
1.6.4.4.	Homeostasis de iones	45
1.6.4.5.	Producción de especies reactivas de oxígeno	45
1.6.4.6.	Disfunción de proteínas y enzimas	46
1.6.4.7.	Genotoxicidad e inhibición de la transducción de señales	46
1.6.5.	Nanopartículas en el uso odontológico	47

1.6.6.	Biospada 60	49
1.7.	Marco Legal	49
1.8.	Objetivos	50
1.8.1.	Objetivo General	50
1.8.2.	Objetivos Específicos	50
2.	Aspectos Metodológicos	51
2.1.	Tipo de estudio	51
2.2.	Objeto de estudio	51
2.3.	Material objeto de estudio	51
2.4.	Unidad de Observación	51
2.5.	Muestra y muestreo	51
2.6.	Criterios de selección del estudio	52
2.6.1.	Criterios de inclusión	52
2.6.2.	Criterios de exclusión.	52
2.7.	Procedimiento	53
2.7.1.	Preparación de espécimen (Tubos de dentina)	53
2.7.2.	Inoculación bacteriana	54
2.7.3.	Recopilación de la muestra	55
2.7.4.	Protocolo de Irrigación	57

2.7.5.	Protocolo de Visualización en la microscopia electrónica de barrido	58
2.7.5.1.	Fijación	59
2.7.5.2.	Deshidratación	59
2.7.5.3.	Metalizado	59
2.7.6.	Instrumento de recolección de datos	60
2.7.7.	Variables	60
2.8.	Consideraciones éticas	63
2.9.	Análisis estadístico.	64
2.9.1.	Análisis univariado	64
2.9.2.	Análisis bivariado	64
2.9.3.	Prueba piloto	64
3.	Resultados	66
4.	Discusión	74
5.	Conclusiones	81
6.	Recomendaciones	82
7.	Referencias Bibliográficas	83

ANEXOS	91
Anexo 1. Consentimiento informado	91
Anexo 2. Instrumento de recolección de datos	92
Anexo 3. Fotografías de los cultivos	93
Anexo 4. Ficha técnica del BIOSPADA 60	96
Anexo 5. INVIMA del BIOSPADA 60	97
Anexo 6. Incubadora	98
Anexo 7. Cabina de seguridad biológica clase II de tipo 2-a	99
Anexo 8. Vortex	100
Anexo 9. METALIZADOR DESK® IV	100
Anexo 10. Microscopio de barrido de electrones y de haz de iones focalizado FE-MEB LYRA3 de TESCAN.	101

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Operacionalización de variables.....	38
Tabla 2. Conteo de UFC por irrigante.....	41
Tabla 3. Análisis descriptivo de los irrigantes.....	43
Tabla 4. Comparación entre irrigantes.....	46

LISTA DE FIGURAS

1. **Figura 1.** *Biofilm en la superficie radicular*
2. **Figura 2.** *Enterococcus Faecalis*
3. **Figura 3.** *Pasos para la irrigación*
4. **Figura 4.** *Formula química del Hipoclorito de Sodio*
5. **Figura 5.** *Clasificación de las nanopartículas*
6. **Figura 6:** *Esquema protocolo recopilación de muestras*
7. **Figura 7.** *Tubos de dentina correspondiente al grupo control en el cual no fue aplicado ningún irrigate donde se puede apreciar el crecimiento bacteriano del Enterococcus Faecalis.*

Introducción

La presencia de microorganismos y sus subproductos son la principal causa de enfermedades pulpares y peri radiculares (1). La desinfección durante la terapia endodóntica se consigue por dos medios: limpieza mecánica e irrigación con soluciones antimicrobianas, sin embargo, a pesar de las diversas estrategias de preparación, queda un porcentaje significativo de tejido que permanece intacto (2). Estas áreas no alcanzadas, pueden proteger a los microorganismos de los agentes utilizados en el proceso de desinfección del conducto radicular (1).

El origen de la infección endodóntica comienza con la aparición de la caries dental, la cual genera la destrucción de esmalte y dentina dando como resultado una invasión bacteriana que alcanza la pulpa y las áreas periapicales, misma que puede llegar a desarrollar un absceso dentoalveolar y la posterior diseminación de la infección a otras áreas anatómicas (3). La infección primaria se genera a partir de bacterias aerobias y anaerobias capaces de producir ácidos que generan daño tisular, principalmente al tejido mineralizado. Los microorganismos más comunes son: *Streptococo mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces* (3).

La colonización bacteriana será asociada mayormente a microorganismos anaeróbicos como *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium* y *Peptostreptococcus spp*, generando el sinergismo bacteriano con propiedad de

potencializarse entre sí. Esta problemática, se encuentran comúnmente asociaciones de “*Streptococcus anaerobios*, *Capnocytophaga*, *Actinobacillus*, *Fusobacteria*, *Prevotella* y *Porphyromonas*” (3).

Finalmente, como respuesta a las infecciones secundarias, se evidencian las lesiones apicales y abscesos en los que se hallan microorganismos aerobios y anaerobios facultativos: *Streptococcus salivaris* menos del 8%, *Enterococcus Faecalis* del 10 al 30%, *Gramnegativas Neisriae* y *Bacilos gramnegativos*, como *Proteus Vulgaris* y *Escherichia Coli*. Los microorganismos más comunes son “*Peptostreptococcus ssp*, *Prevotella Oralis* y *Prevotellamelaninogenica*” (3).

El *Enterococcus Faecalis* es el microorganismo más aislado que se presenta con mayor frecuencia en los casos de fracaso de la terapia endodóntica, pues tiene la capacidad de penetrar y sobrevivir dentro de los túbulos dentinarios y formar una biopelícula en las paredes del conducto radicular, penetrando en el túbulo dentinal cerca de la pulpa y de la unión esmalte/cemento, aproximadamente 0.95 y 2,5 milímetros, respectivamente (4). La prevalencia del microorganismo en este tipo de infecciones oscila entre el 24% y el 77% (5). Este hallazgo puede explicarse por varios factores de supervivencia y virulencia que posee el *Enterococcus Faecalis*, incluida su capacidad para competir con otros microorganismos para invadir los túbulos dentinarios y resistir la privación nutricional y el uso de una buena técnica aséptica (5).

La irrigación del conducto radicular de una pieza dental durante el tratamiento endodóntico, tiene como propósito eliminar el tejido pulpar vital o necrótico, restos de dentina, microorganismos y sus subproductos, además de lubricar las paredes del tejido radicular (6). El irrigante óptimo del conducto radicular debe integrar la seguridad y la eficacia, especialmente en la región periapical, todo esto, mientras ejerce una presión mínima en la región apical (2).

El hipoclorito de sodio (NaOCL) es la opción preferida por los profesionales de la salud oral, por su eficaz acción antibacteriana y la capacidad de disolver los restos de tejido, utilizándose generalmente para este tipo de tratamientos dentales, concentraciones que oscilan entre el 0,5% y el 6% (2). Entre más alta sea la concentración del NaOCL, mayor será su capacidad para afectar de manera indeseable los tejidos del diente en especial la dentina (7).

Por otro lado, la utilización de nanopartículas (NP's) de materiales naturales y sintéticos está evolucionando rápidamente en la odontología. Estos biomateriales han ayudado en el tratamiento de enfermedades orales, en la erradicación de la capa de barro dentinario y de las biopelículas. Se incorporan a diversos materiales dentales por sus efectos antimicrobianos y otros aspectos beneficiosos, estas nanopartículas proporcionarán un nuevo cambio de paradigma en la odontología (8).

1. Aspectos Teóricos- Científicos

1.1. Planteamiento del problema

Si bien es cierto que el hipoclorito de sodio se considera el Gold estándar para efectuar los procesos de irrigación en el tratamiento endodóntico presenta algunas propiedades negativas. Una concentración del 1% ofrece capacidad antimicrobiana, pero en el caso del tratamiento de conducto, al usar concentraciones mayores, se potencializa su toxicidad, es decir, a concentraciones superiores a 5,25%, el hipoclorito de sodio genera hemolisis de los tejidos orgánicos afectando el ligamento periodontal y vascularmente, aumenta la permeabilidad de los vasos sanguíneos causando sangrado y edema (7), efectos no deseados durante la realización del tratamiento de conducto.

Por otro lado, teniendo presente la alta resistencia del *Enterococcus Faecalis* ante el hipoclorito de sodio y limitada capacidad bactericida a bajas concentraciones de irrigante, se considera necesario realizar la presente investigación en búsqueda de nuevas sustancias que ofrezcan mayor eficacia durante el tratamiento endodóntico con alta penetración a los microtúbulos dentinales.

Adicionalmente, la información disponible sobre el uso y efectividad de la nanopartícula Biospada 60 como agente irrigante en procedimientos endodónticos es limitada a nivel nacional, resultando necesario e interesante conocer el

comportamiento de dicho agente de manera individual y como coadyuvante del hipoclorito de sodio en la desinfección del conducto radicular.

Por tal motivo, se fundamenta la razón de esta investigación sugiriendo la siguiente pregunta de investigación:

¿Existe efectividad antimicrobiana de la nanopartícula Biospada 60 como agente coadyuvante en el proceso de desinfección química en el tratamiento convencional de conductos radiculares ante la cepa de *Enterococcus Faecalis* comparado y en combinación con el hipoclorito de sodio al 5,25% en tubos de dentina?

1.2. Justificación

Según David E. Jaramillo et al (9), a lo largo de los años se han estudiado o sugerido diversas estrategias para reducir la acumulación de biopelículas microbianas, con diversos grados de éxito. En relación con los dispositivos médicos utilizados, se han desarrollado una gama de biosuperficies que incorporan y/o liberan compuestos antimicrobianos, con el fin de contribuir a la desinfección adecuadas, además de diversos métodos de activación de irrigación, como puntas vibratorias, irrigación sónica y ultrasónica para mejorar la eficiencia de la administración de la sustancia, pues, si no se controla la cantidad de agentes patógenos, pueden poner en peligro los resultados del tratamiento de endodoncia (9).

La utilización de NP's de materiales naturales y sintéticos, está evolucionando rápidamente en la odontología. Estos biomateriales han ayudado en el tratamiento de enfermedades orales, en la erradicación de la capa de barro dentinario y de las biopelículas, incorporándose a diversos materiales dentales por sus efectos antimicrobianos y otros aspectos beneficiosos (8). Estas nanopartículas proporcionarán un nuevo cambio de paradigma en la odontología, por ende, para mejorar la acción antimicrobiana de los agentes utilizados en endodoncia, se han explorado las nanopartículas que efectúan la desinfección en los conductos radiculares mediante la acción bactericida; haciendo posible el éxito del tratamiento (2).

Las sustancias de uso odontológico a base de NP's proporcionan una mejor acción,

penetración, actúan per-se y pueden ser cargadas para producir una liberación lenta y controlada de los principios activos (10). Gracias a la nanotecnología, la disminución de las dimensiones conduce a un aumento considerable de la superficie del agente; por lo tanto, el contacto de las NP's con los microorganismos y la interacción efectiva con la membrana del patógeno, aumentan (10).

Las NP's tienen un tamaño entre 1 a 100 nanómetros y sus efectos antimicrobianos son superiores en comparación con sus contrapartes, tienen una mayor interacción con las células microbianas y poseen efecto duradero antibacteriano fuerte contra las bacterias orales sin comprometer algunas propiedades físicas. (11) Por otra parte, la eliminación de la bacteria *Enterococcus Faecalis* ha sido un gran reto en las investigaciones (12), puesto que tiene la capacidad de generar biopelículas en monocultivo y de adaptación a ambientes severos dentro de los túbulos dentinales resistiendo a medicamentos endodónticos y por consiguiente siendo difícil de eliminar.

Lo anteriormente descrito obedece a los motivos que nos llevaron a desarrollar la presente investigación, que pretende mejorar los protocolos de irrigación. Esto permitirá, no solo tener el conocimiento sobre la efectividad de la Nanopartícula Biospada 60, sino que, además, brindará las herramientas necesarias para que las instituciones prestadoras de servicios de salud y área asistencial ofrezcan tratamientos dirigidos a disminuir la posibilidad de fracaso y generar terapias basadas en evidencia científica.

Este tipo de investigaciones contribuye además, tanto a la estimulación del aprendizaje institucional, como a concientizar a los estudiantes del posgrado de endodoncia sobre la estandarización de los procesos clínicos que ofrezcan mejores resultados a los pacientes, facilitando una constante autoevaluación sobre la calidad de los tratamientos, análisis comparativo entre casos particulares, autoevaluación y crecimiento profesional a partir de tratamientos integrales, con predictibilidad y longevidad clínica.

1.3. Propósito

El propósito de la investigación es establecer si existe una efectividad antibacteriana como irrigante individual y coadyuvante del hipoclorito de sodio al 5,25% durante el proceso de irrigación química en la terapia endodoncia contra el *Enterococcus Faecalis*.

1.4. Antecedentes

Jaramillo et al (2012), Este estudio se centra en el recubrimiento de Cloruro de Benzalconio (BAK) sobre superficies de dentina y su influencia en la adhesión temprana y la formación de biopelículas por bacterias orales y del conducto radicular; Se comparó El efecto repelente de superficies recubiertas con BAK con NaOCL al 1% , evidenciando escasa formaron de biopelículas en las superficies de dentina recubiertas con NaOCL y BAK: Concluyendo que el recubrimiento de la superficie con una solución de surfactante que contiene Cloruro de benzalconio no causa daño a la membrana celular, pero podría interferir con los mecanismos celulares de adhesión debido a los cambios provocados en la resistencia iónica de las membranas celulares. Justificando las investigaciones sobre la utilidad clínica de BAK como medicamento antibiofilm.(13).

Baron Aleksandr et al (2015) , Tuvo como propósito determinar el efecto de una combinación de hipoclorito de sodio al 6% y surfactante de cloruro de benzalconio BAK al 0,008%, en la eliminación de *Enterococcus Faecalis* de dientes infectados, donde utilizaron 64 dientes unirradiculares anteriores y se dividieron en 4 grupos, N = 16 a los cuales se prepararon con instrumental rotario y se inocularon con la cepa de *Enterococcus Faecalis* por 21 días donde se les aplicó un protocolo de irrigación combinado NaOCL/BAK y NaOCL solo , mostrando una reducción significativa en la carga bacteriana en la combinación de NaOCL/BAK por lo tanto se concluye en este estudio que La adición de BAK al NaOCL redujo significativamente el número de bacterias dentro del conducto radicular después de la irrigación combinada NaOCL/BAK en comparación con el NaOCL solo (14).

1.5. Marco Teórico

1.5.1. Microorganismos: Microbiota Oral

La microbiota de la boca es una fuente asociada con caries dental, enfermedades endodónticas y enfermedades periodontales (15). Las bacterias orales comienzan a colonizar el sistema del conducto radicular después de la necrosis de la pulpa dental, permaneciendo suspendidas en el conducto radicular (estado planctónico) o adheridas a sus paredes (biopelículas), llegando a los tejidos apicales provocando infecciones extrarradiculares y constituyen comunidades microbianas complejas asociadas a abscesos apicales agudos, biopelículas extrarradiculares, e infecciones persistentes (15).

La composición de las comunidades microbianas asociadas con las infecciones endodónticas es heterogénea y puede ser modulada por varios factores como la ubicación geográfica, la presencia o ausencia de síntomas y la condición clínica (15).

1.5.2. Microbiota Del Sistema De Conducto Radicular

Las infecciones endodónticas ocurren debido a procesos infecciosos asociados a caries y/o traumatismos dentales. Esto sucede cuando los agentes bacterianos oportunistas obtienen acceso a la pulpa dental y a los tejidos periapicales (16).

A diferencia de la cavidad bucal, el entorno de un conducto radicular es único porque es un espacio aislado con morfologías de conducto muy diversificadas, por lo que, ante una infección, la pulpa experimentará un proceso dinámico de pulpitis y, finalmente, necrosis pulpar (17). La microbiota endodóntica es muy variada y dependerá del conocimiento previo de aquellos microorganismos presentes en el sistema de conducto radicular de pulpas necróticas infectadas y tratamientos endodónticos fallidos. Al día de hoy se conocen más de 500 cepas variadas de bacterias capaces de habitar en la cavidad oral, pero solo se ha aislado un pequeño grupo de microorganismos de 150 especies declaradas capaces de colonizar el sistema de conductos (18).

Los canales radiculares individuales producen una media de 5 a 7 especies diferentes por cada conducto, comúnmente encontrados en dientes con sintomatología y asintomáticos, provenientes de los siguientes géneros bacterianos, los cuales frecuentemente son aislados de los conductos radiculares: *Peptostreptococcus* (58,3%), *Streptococcus* (53,3%), *Fusobacterium* (33,3%), *Prevotella* (31,7%), *Enterococcus* (13,3%), *Gemella* (13,3%), *Staphylococcus* (13,3%), *Actinomyces* (11,7%), *Porphyromonas* (11,7%), *Clostridium* (10%), *Eubacterium* (10%), *Viellonella* (10%), *Lactobacillus* (8,3%), *Propionibacterium* (6,7%), *Bacteroides* (5%), *Cardiobacterium* (3,3%) y *Tissierella* (3,3%). Los géneros aislados en una ocasión incluían *Bifidobacterium*, *Capnocytophaga*, *Haemophilus* y *Neisseria* (18).

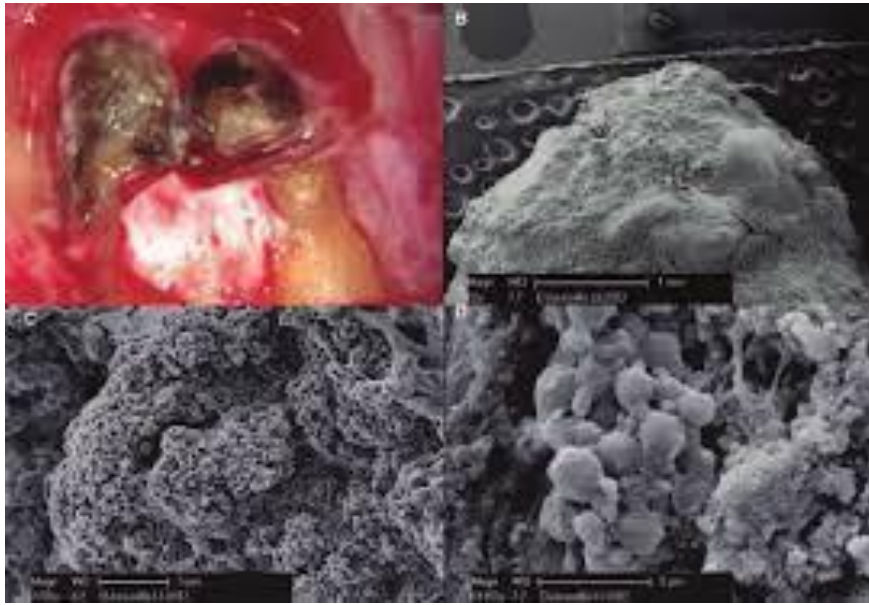


Figura 1. Biofilm en la superficie radicular, disponible en: <https://personal.us.es/segurajj/documentos/CV-Art-Sin%20JCR/2015-Endodoncia-Biofilms-Jaramillo.pdf>

1.5.3. Microorganismos Anaerobios Resistentes

Los diferentes métodos de preparación y desinfección que operan en el entorno del conducto radicular sugieren que ciertas bacterias son más capaces de sobrevivir y multiplicarse en el conducto radicular que otras, favoreciendo el crecimiento de anaerobios obligados en conductos radiculares primarios infectados y el crecimiento de facultativos en la infección endodóntica secundaria (18).

Es conocido que la microbiota del conducto radicular de dientes asintomáticos o en reparación es diferente a la microbiota de los dientes en procesos inflamatorios sintomáticos (18). Según Griffie et al., Hashioka et al. y Gomes et al. indicaron que puede haber asociaciones significativas entre ciertas especies anaerobias y algunas características clínicas endodónticas (18). Los anaerobios más frecuentemente aislados fueron: *P. micros* (35%), *Fusobacterium necrophorum* (23%), *Fusobacterium nucleatum* (11,7%), *P. intermedia/nigrescens* (16,7%), *P. gingivalis*(6,7%) y *P. endodontalis* (5%)(18).

1.5.3.1. Microbiota En Infección Primaria

Los conductos radiculares con infección endodóntica primaria presentan, en su gran mayoría, colonias de: *P. Micros*, *P. prevotii*, *F. necrophorum*, *P. intermedia/nigrescens*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus anginosus*, *S. sanguis*, *F. nucleatum*, *Gmella morbillorum*, *Streptococcus mitis*, *P. gingivalis*, *P. loescheii* y *Lactobacillus acidophilus* (18). Por otra parte, la colonización en dientes pulpar mente necróticos aislados fueron *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *porphyromonas*, *fusobacterium* , *eubacterium*, *Actinomyces* y *Streptococcus* facultativos (18).

1.5.3.2. Microbiota En Infección Secundaria

Debido a la complejidad de la anatomía del conducto radicular y la difícil

accesibilidad de la instrumentación; generan un refugio para los microorganismos. Las bacterias que permanecen en el conducto radicular de la raíz, causan infección persistente y fracaso del tratamiento de conducto (19). Por lo tanto, para lograr una desinfección adecuada, la instrumentación mecánica debe complementarse con métodos de irrigación química (19).

Adicionalmente, si el proceso inflamatorio se extiende a los tejidos del periapice, esto ocasiona lesiones óseas relacionadas con lesión apical, por consiguiente, los microorganismos y el mecanismo de defensa del huésped interactúan, destruyendo una gran cantidad de tejido periapical y dando lugar a los diferentes tipos de lesión periapical(20). Esto se conocería como infección secundaria o el absceso apical agudo. Este tipo de lesión pueden albergar varias especies bacterianas agregadas entre aerobias, anaerobias facultativas y anaerobias estrictas dentro de las cuales se agrupan diferentes géneros (20).

Las especies encontradas principalmente fueron: *Peptostreptococcus saccharolyticus*, *Peptostreptococcus tetradius*, *Staphylococcus lentus*, *Streptococcus salivarius* y *actinomyces naeslundii* (todas ellas bacterias Gram positivas) *Prevotella buccae* y especialmente *Enterococcus Faecalis* predominaron en los conductos con algún tipo de fracaso endodóntico (18).

1.6. Marco Conceptual

1.6.1. *Enterococcus Faecalis*

1.6.1.1. Generalidades

El *Enterococcus Faecalis* es una especie del género *Enterococcus*, de metabolismo fermentativo, facultativamente anaeróbico, Gram positivo que no forma endosporas (21). Este microorganismo contribuye a las fallas endodónticas al alterar las respuestas del huésped mediante su capacidad de adherirse a las células del huésped y liberando proteínas que le permiten competir con otras células bacterianas y suprimir la actividad de los linfocitos (22). La tasa de éxito de la terapia del conducto radicular en condiciones asépticas varía del 70% al 95% (21). Pero, de igual manera posee un alto porcentaje de resistencia hasta del 77% en condiciones asépticas (23).

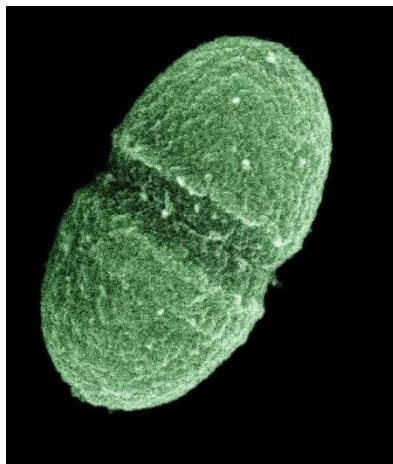


Figura 2. *E. Faecalis*, disponible en: https://en.wikipedia.org/wiki/Enterococcus_faecalis

El *Enterococcus Faecalis* está asociado mayormente a los casos asintomáticos que a los sintomáticos y puede sobrevivir en entornos muy duros, con un suministro deficiente de nutrientes y un pH alcalino alto que llega hasta 11,5 (23). Tiene la capacidad de crecer como una biopelícula en las paredes del conducto radicular y como una mono infección en los conductos tratados. Sin el apoyo sinérgico de otras bacterias hace que la alta resistencia a los agentes antimicrobianos sea un patógeno muy resistente al tratamiento del conducto radicular (23).

La presencia frecuente de *Enterococcus faecalis* dentro de los canales del conducto radicular posterior al tratamiento endodóntico fallido, lo considera un microorganismo oportunista cuya presencia significa un problema terapéutico de gran importancia (24). Cuando el *Enterococcus Faecalis* se instala en el canal radicular y sus ramificaciones, comienza una lucha de supervivencia en la cual el microorganismo es enfrentado a diversos desafíos, entre ellos, la presencia de agentes antimicrobianos utilizados durante la ejecución del tratamiento y la escasez de nutrientes del conducto limpio y obturado (24).

Lo anteriormente descrito, lleva a realizar el análisis sobre las causas por las cuales este microorganismo se encuentra en dientes que requieren la realización de un tratamiento de conducto secundario, lo cual sugiere dos hipótesis. La primera, es que el *Enterococcus Faecalis* posee la capacidad de no solo infectar sino, de colonizar los túbulos dentinarios, por lo que no resulta tan efectiva su eliminación a

través de limpieza química y mecánica del conducto radicular, debido al diámetro reducido de estas zonas anatómicas, además de la capacidad que presentan estas bacterias para unirse a las fibras colágenas (24). Por otro lado, el gran potencial de resistencia que estos cocos presentan al hidróxido de calcio, medicamentos que ataca a estas bacterias y comúnmente utilizado en este tipo de tratamientos odontológicos (24).

1.6.1.2. Mecanismos de resistencia de *E. faecalis*

Posee muchos mecanismos de supervivencia en condiciones desfavorables, como crecer en un ambiente con poco oxígeno, a pH alto, a temperaturas altas, alta salinidad y en un ambiente pobre en nutrientes (23). Incluso, autores como Narayanan L y Vaishnavi C, discutieron los mecanismos de resistencia de *Enterococcus Faecalis* para vivir en presencia de medicación intraconducto, como soluciones de hidróxido de calcio e irrigantes, y hacerlo capaz de escapar de esas medidas de desinfección quimio mecánico (23), como ya se expresó anteriormente.

La capacidad de supervivencia de estas bacterias Gram positivas en condiciones adversas se debe, además de lo mencionado, a los prolongados periodos de inanición a los que se ven obligados a experimentar, mismos en los que actúan diversos sistemas de regulación que le permiten a la bacteria soportar la falta de nutrientes, los cuales están controlados por determinados genes, que se activan ante estas condiciones deplorables para el microorganismo (24).

No obstante, el *Enterococcus Faecalis* puede usar líquido del ligamento periodontal como alimento y formar biopelículas como protección contra la resistencia del huésped y agentes desinfectantes. Además de esos mecanismos, el *Enterococcus Faecalis* tiene la capacidad de desarrollar resistencia a los antibióticos, especialmente a la eritromicina y azitromicina, y de penetrar en los túbulos dentinarios y adherirse al colágeno (23).

Diversas investigaciones sobre la resistencia del *E. faecalis* han identificado que, a un pH de 11,5 o mayor, la bacteria no puede sobrevivir; sin embargo, puede vivir al ser expuesta a concentraciones menores (24). Debido al efecto buffer de la dentina, las probabilidades de que el pH alto del hidróxido de calcio alcance los túbulos dentinarios son muy reducidas, por lo que el *Enterococcus faecalis* tiene la capacidad de penetrar a profundidad dicha estructura dental (24).

La pasta de hidróxido de calcio, utilizada en el tratamiento de conducto, por lo general tiene un pH de 12,3; no obstante, la alcalinidad de la dentina radicular no excede los 10,3 por lo que después de cubrir conductos radiculares con el hidróxido de calcio este valor puede disminuir hasta alcanzar un valor de pH 8,5- 9,0, esto a causa del efecto de taponamiento buffer de la dentina durante la instrumentación, valor que no es lo suficientemente alto como para eliminar la presencia del *Enterococcus faecalis* (24). Adicionalmente, debido al uso de medicamentos y agentes irrigantes durante el tratamiento endodóntico en sus diferentes etapas, el *Enterococcus Faecalis*, se expone a un pH alcalino, lo que ocasiona una respuesta

de estrés por parte de la bacteria, que a su vez mejora la supervivencia del mismo, incluso a concentraciones consideradas letales, convirtiéndolo en un microorganismo resistente (24).

A pesar de los mecanismos de resistencia expuestos con antelación, es necesario mencionar que la variación de esta resistencia puede estar relacionada con la existencia de diferentes cepas de este microorganismo, es decir, pueden generarse variaciones más resistentes del *Enterococcus Faecalis* (24).

1.6.2. Irrigantes en endodoncia

1.6.2.1. Objetivo de la irrigación

El principal propósito de la irrigación es la completa remoción del tejido pulpar y los microorganismos que se alojan en los conductos radiculares de los dientes tratados endodónticamente, así como también la eliminación del Smear-layer formado posterior a la

instrumentación de los canales radiculares (25). La literatura ha demostrado que la instrumentación mecánica no resulta del todo efectivo para la eliminación de estos restos de tejido radicular, encontrando que el 35% del conducto radicular se encontraba intacto después de ser tratado por medio de instrumentación manual, por lo que se requiere la ayuda la implementación de un irrigante que ofrezca la posibilidad de remover estos restos, además de eliminar microorganismos presentes y sus endotoxinas (25).

1.6.2.2. Acciones deseadas de los irrigantes

A lo largo de la historia, se han sugerido y estudiado innumerables compuestos acuosos como irrigantes de los canales radiculares, dentro de las cuales se encuentran sustancias altamente tóxicas y alérgicas como el formaldehído, hasta el cloruro de sodio o solución salina (24). El irrigante ideal debe poseer ciertas propiedades que permitan alcanzar el éxito del tratamiento endodóntico y evitar su fracaso a largo plazo, dentro de las cuales cabe resaltar las relacionadas a continuación:

Amplio espectro y eficacia antimicrobiana.

Inactivación de endotoxinas.

No tóxico, no caustico para el periodonto.

Eliminación de restos de tejido pulpar necrótico

Baja posibilidad de causar respuesta anafiláctica (24)

1.6.2.3. Sistemas de irrigación

Existen diversos métodos utilizados para la activación de las soluciones intraradiculares con el fin de poder mejorar la efectividad del irrigante. Este tipo de sistemas se pueden clasificar en dos categorías (24).

Técnicas manuales: dentro de las cuales se encuentran la irrigación con presión positiva o PPI, que se efectúa por medio de una jeringa y una aguja de irrigación endodóntica, la agitación manual con ayuda de un cono de gutaperchas y los cepillos (24).

Técnicas de agitación por medio de dispositivos: destacando las limas rotatorias plásticas, la presión apical negativa, laser y los métodos sónicos y ultrasónicos (24).

Dentro de los factores a tener en cuenta para la irrigación endodoncia, es posible mencionar, su capacidad para llegar a la totalidad del conducto radicular espacialmente al tercio apical, y la facultad para alcanzar áreas que no han sido instrumentadas por los elementos del método mecánico (24).

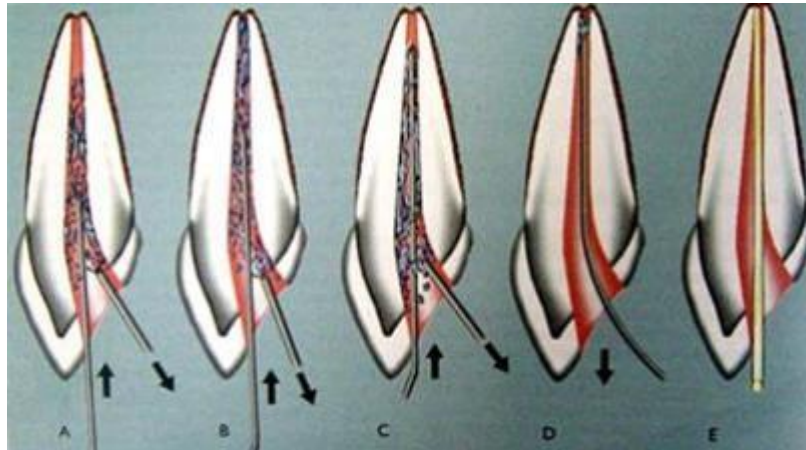


Figura 3. Pasos para una irrigación, Tomada de Ingle J. Endodontics. 4ta edición, 1994

1.6.2.4. Irrigantes utilizados en el tratamiento endodóntico

Dentro de las sustancias irrigantes se encuentran los siguientes:

Halógenos: Solución de hipoclorito de Sodio, con concentraciones que pueden variar entre el 0.5% al 5.25%.

Quelantes: EDTA al 17% (ácido etilendiaminotetraacético) y el ácido cítrico con concentraciones entre el 10-50%.

Otras soluciones: como el alcohol, suero fisiológico, agua destilada, peróxido de hidrógeno, Clorhexidina al 2%, cloroformo y MTAD (Tetraciclina y ácido cítrico) (24).

1.6.3. Hipoclorito de Sodio

1.6.3.1. Generalidades del hipoclorito de sodio

Es una sustancia irrigante usada constantemente como un desinfectante en el tratamiento de conducto debido a su efectividad al momento de disolver el tejido radicular y los microorganismos presentes en esta estructura anatómica, además de lubricar el conducto (19)(24) La preparación químico-mecánica del conducto radicular se proporciona gracias a la instrumentación mecánica y a la irrigación química. Estos puntos son cruciales para disminuir la población bacteriana. La instrumentación mecánica por sí sola no es suficiente para lograr una desinfección eficaz, por lo tanto, hay que centrarse en la reducción de las bacterias intraconducto (19)

El hipoclorito de sodio (NaOCL) tiene actividad antimicrobiana de amplio espectro. Puede destruir rápidamente las bacterias, las endosporas, los hongos, los protozoos y algunos virus (como el VIH, el rotavirus, el VHS-1 y -2 y los virus de la hepatitis A y B) (26). Pueden ser necesarias concentraciones elevadas para eliminar los bacilos acidorresistentes y las esporas bacterianas. Lo ideal es que los irrigantes destruyan los microorganismos y neutralicen sus productos sin dañar los tejidos del huésped. Por lo tanto, la concentración deseable debe ser aquella que posea una baja toxicidad y efectos antibacterianos adecuados (26).

1.6.3.2. Mecanismo de acción del hipoclorito de sodio

El hipoclorito de sodio presenta un equilibrio dinámico, tal y como se muestra en la siguiente reacción (27):

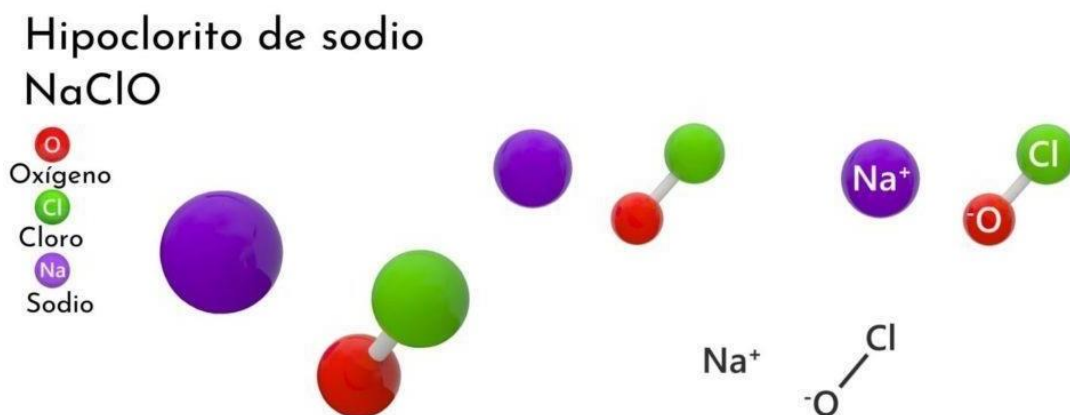
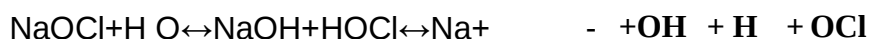


Figura 4. Formula química del Hipoclorito de Sodio, disponible en:

https://www.google.com/search?q=formula+del+hipoclorito+de+sodio&sxsrf=ALeKk036QoVU0AnDpcBnrJzIZqBEyYO03A:1623795750554&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=2ahUKEwjXv5jH1prxAhWOTDABHZ3TDJMQ_AUoAXoECAEQAw&biw=1366&bih=625#imgrc=V_a8YQMs-w4StM

El hipoclorito de sodio actúa como disolvente de los ácidos grasos orgánicos y degradantes de la grasa, transformándolos en sales de ácidos grasos (jabón) y

glicerol (alcohol) que reduce la tensión superficial de la solución restante (27). También neutraliza los aminoácidos formando agua y sal (reacción de neutralización). Con la salida de los iones hidroxilo, se produce una reducción del pH (27).

El ácido hipocloroso, sustancia presente en la solución de hipoclorito de sodio, al entrar en contacto con los tejidos orgánicos actúa como disolvente y libera cloro que, combinado con el grupo amino de las proteínas, forma cloraminas (reacción de cloraminación) que interfieren en el metabolismo celular (27). El ácido hipocloroso (HOCl) y los iones de hipoclorito (OCl^-) provocan la degradación e hidrólisis de los aminoácidos. El cloro (un fuerte oxidante) presenta una acción antimicrobiana que inhibe las enzimas bacterianas y provoca una oxidación irreversible de los grupos SH (grupo sulfhidrilo) de las enzimas bacterianas esenciales (27).

El hipoclorito de sodio es una base fuerte ($\text{pH} > 11$), que a una concentración del 1%, el presenta una tensión superficial igual a 75 dynes/cm, una adhesividad igual a 0,986cP, una conductividad de 65,5mS, una densidad de 1,04 g/cm³ y una capacidad de humectación igual a 1h y 27min. Su mecanismo de acción antimicrobiana puede ser observado verificando sus características físico-químicas y su reacción con el tejido orgánico (27). La eficacia antimicrobiana del hipoclorito de sodio está basada en su elevado pH (acción de los iones hidroxilo), que es similar al mecanismo de acción del hidróxido de calcio (27).

1.6.3.3. Actividad antifúngica

Los hongos hacen parte de la microbiota oral. Dado que los hongos pueden estar implicados en los casos de infecciones persistentes y secundarias asociadas a lesiones periradiculares recalcificantes, el espectro de actividad antimicrobiana de los medicamentos e irrigantes endodónticos debe incluir estos microorganismos (27). Por lo tanto, las estrategias con medicamentos que tienen eficacia antifúngica pueden ayudar a tratar con éxito las infecciones endodónticas persistentes o secundarias causadas por hongos (27).

1.6.3.4. Toxicidad del NaOCL

El hipoclorito de sodio tiene un pH de 11-12 aproximadamente y cuando entra en contacto con las proteínas de los tejidos anatómicos, se forma nitrógeno, formaldehído y acetaldehído en poco tiempo y se rompen los enlaces peptídicos, lo que provoca la disolución de las proteínas (27). Durante el proceso, el hidrógeno de los grupos amino ($-HN_2$) se sustituye por cloro ($-NCl_2$) formando así cloramina, que desempeña un papel importante en la eficacia antimicrobiana. El tejido necrótico y el pus se disuelven así y el agente antimicrobiano puede alcanzar y limpiar mejor las zonas infectadas (27). Un aumento de la temperatura de la solución, mejora significativamente los efectos antimicrobianos y de disolución de tejidos del hipoclorito de sodio. Como consecuencia de estas propiedades, el NaOCL es muy tóxico en concentraciones elevadas y tiende a inducir irritación tisular al contacto

(27).

1.6.3.5. NaOCL y biopelícula.

Se conoce como biofilm a las capas finas de microbios que pueden darse en diversas estructuras superficiales en la naturaleza. Las bacterias que flotan libremente en un entorno acuoso, los llamados microorganismos planctónicos, son un requisito previo para la formación de biofilm. Así pues, estas películas pueden establecerse en cualquier sustrato de superficie orgánica o inorgánica en el que predominen los microorganismos planctónicos en una solución acuosa (27)

En el contexto dental, las bacterias libres en la saliva (organismos planctónicos), son la fuente principal para la organización de esta biopelícula específica; sin embargo, en endodoncia, el concepto de biofilm ha recibido hasta ahora una atención limitada. Se ha discutido principalmente en el marco de las apariciones bacterianas en las puntas de las raíces de los dientes con pulpas no vitales, también se ha pensado que estas agregaciones bacterianas son la causa de la periodontitis apical resistente al tratamiento; no obstante, las comunidades microbianas que crecen en las biopelículas son notablemente difíciles de erradicar con agentes antimicrobianos y los microorganismos de las biopelículas de matriz pueden ser notoriamente resistentes por razones que aún no se han explicado adecuadamente (27). Existen informes que demuestran que los microorganismos cultivados en biofilm pueden ser 2-1.000 veces más resistentes que la forma planctónica correspondiente (27).

1.6.4. Nanopartículas (NP's)

La nanotecnología tuvo sus inicios en la década actual como un campo de rápido crecimiento con numerosas aplicaciones de las ciencias biomédicas, especialmente por sus características antibacterianas(28). Las nanopartículas son de gran valor, pues debido a su forma y su tamaño son capaces de alcanzar superficies intratubular mayores (2,4 y 2,9 μm), además de ello, posee gran interacción con las paredes bacterianas debido a su tamaño, generando daño tisular por medio de canalización de peróxido de hidrógeno por medio de radicales libres capaces de destruir la bacteria (29). Sin embargo, este proceso de destrucción y acción bactericida puede verse alterado por la presencia de un pH neutro fisiológico de 7.0, es decir, que esta acción bactericida específica actúa solamente a expensas de medio ácido(29).

Aunque, es comparado por su acción bactericida con el hipoclorito de sodio al 5.25% y es efectivo contra gran variedad de especies incluida la *Enterococcus Faecalis*, y es precisamente por poseer estas propiedades que se ha propuesto para ser un nuevo irrigante endodóntico con menos toxicidad que los ya utilizados para el tratamiento de conducto(29).

1.6.4.1. Clasificación de las nanopartículas.

Las nanopartículas actualmente se clasifican según su origen, su dimensión y su configuración estructural. Por su origen encontramos partículas naturales como plata, cobre y artificiales como quitosan y grafeno, por su dimensión: cero dimensionales o nano estructuras, uní dimensionales o nanorods y bidimensionales o de partículas finas y finalmente, por su configuración estructural, encontramos nanopartículas basadas en carbón grafeno y metálicas como óxido de hierro, plata y dendrímeros (8).

Las NP's poseen un tamaño de aproximadamente 100 nm y pueden ser de forma cúbica, esférica o de aguja y poseen una superficie activa con capacidad química y actividad biológica, lo que permite que las nano moléculas puedan interactuar con la membrana de los microorganismos de manera muy cercana (30). La forma de estas puede afectar de manera negativa su actividad contra algunos microorganismos como la *E. Coli*, donde las placas de forma triangular demostraron una mejor actividad biocida que las partículas con forma de espada o esférica (30).

Las nanopartículas ofrecen la posibilidad de alterar su carga superficial, dando lugar a características físicas y químicas como la hidrofobicidad (30). Adicionalmente, la susceptibilidad que las bacterias pueden presentar ante las NP's, depende de varios factores, como, por ejemplo, el tipo y tamaño de la nanopartícula, la concentración celular, el medio donde crecen los microorganismos y la cepa bacteriana (30). Por lo general, los

microorganismos de tipo Gram negativos, resultan ser más resistentes al efecto de las NP's que las Gram positivas (30).

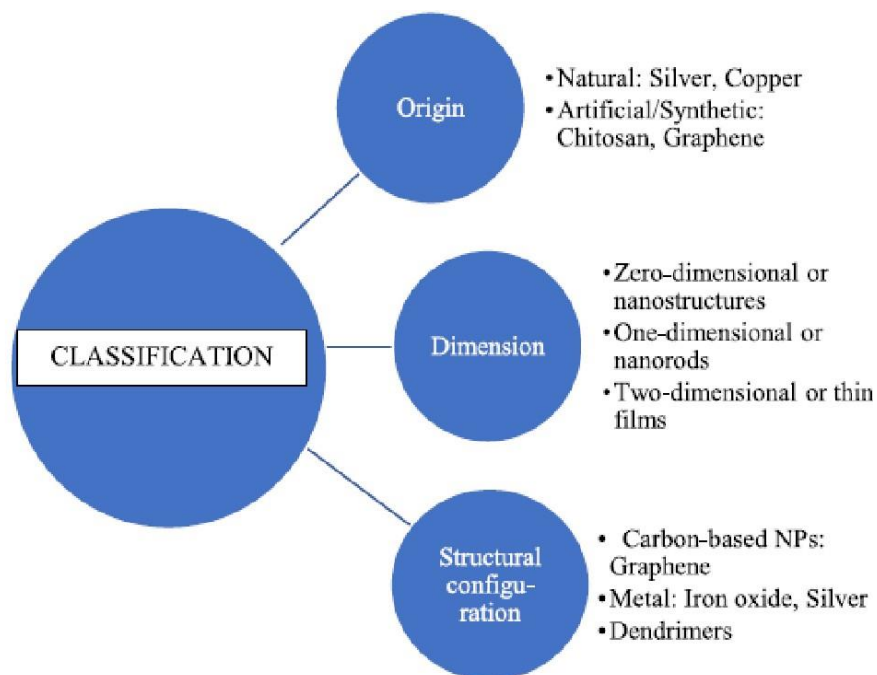


Fig. 1 Classification of Nanoparticles

Figura 5. Clasificación de las nanopartículas (28).

Cada nanopartícula en la actualidad posee las características adecuadas con acción bactericida, aunque algunas poseen potencial de acción reducido o inhibiciones por medios de acción estas se encuentran en estudio y varios tipos de nuevas tecnologías más con el fin de complementar a la ciencia un irrigante ideal que cumpla plenamente las exigencias (8).

1.6.4.2. Mecanismo De Acción.

Destrucción física

El mecanismo de acción de la NP's se basa en crear una capa superficial alineada sobre la superficie en la que se aplica, formando una barrera unificada enlazada con puntas activas punzantes, al aplicar la solución líquida y al dejar secar. Estas pequeñas nano espadas alineadas establecen una barrera la cual atrae a los microorganismos por acción iónica activa y punzando de forma física la pared celular generando su destrucción inmediata. Debido a esto, el microorganismo no tendría la oportunidad de generar inmunidad ante el agente el cual trabaja con un mecanismo de destrucción física (8).

1.6.4.3. Interacción electrostática

Como sabemos las cargas negativas y positivas se atraen, la carga positiva de las nanopartículas reacciona con la superficie de carga negativa de los microorganismos, lo que lleva a la acumulación de nanopartículas en la superficie de la célula bacteriana. Estas cargas positivas se adhieren eficazmente a la membrana celular, lo que provoca la alteración de la estructura de la pared celular lo que conduce a un aumento de la permeabilidad de la célula, lo que permite la entrada de más y más nanopartículas dentro de la bacteria, provocando la fuga del contenido celular y su destrucción (8).

Por otro lado, las sintetizadas con biopolímeros ofrecen un tiempo de liberación mucho mayor, lo que favorece la propiedad antimicrobiana, entre otras. El quitosano, es considerado el segundo biopolímero más abundante y se obtiene al eliminar el grupo acetilo de la quitina en la fórmula química, convirtiéndose en un polímero no tóxico, biodegradable, biocompatible con libertad de utilización en las áreas biomédicas y farmacéuticas (30). Este biopolímero es soluble en soluciones con un pH ácido-neutro, permitiéndole unirse a superficies mucosas y posee carga positiva (30).

1.6.4.4. Homeostasis de iones

La homeostasis de iones depende del equilibrio de los iones metálicos presentes en los microbios. Alterando la cantidad de los mismos provocando un daño irreversible de la mitosis; la muerte del microbio es causada por el exceso de NP's metálicas, que interrumpen esta importante función (8).

1.6.4.5. Producción de especies reactivas de oxígeno

Las NP's acceden a la membrana celular del microorganismo y provocan la liberación de oxígeno, se produce un estrés oxidativo en la célula que inicia un ataque al microbio. Debido a este ataque, la respiración y la producción de ATP disminuye, lo que provoca la ruptura de la membrana celular (8).

1.6.4.6. Disfunción de proteínas y enzimas

Las NP's causan una formación de carbonilos que están unidos a las proteínas ,catalizando o destruyendo el proceso oxidativo de la cadena de aminoácidos, lo que provoca la degradación de las proteínas, la inactivación de varias enzimas y la interrupción de la actividad catalítica se basa en la 'nano catálisis' mediada por óxido de hierro mediante la cual el H_2O_2 se une a la nanoestructura del óxido de hierro con la posterior activación del H_2O_2 por iones férricos y ferrosos in situ, generando radicales libres. Es importante destacar que se encontró que este mecanismo depende del pH, por lo que la catálisis se activa a un pH ácido, pero se inhibe a un pH fisiológico por encima de 7.0 (8).

1.6.4.7. Genotoxicidad e inhibición de la transducción de señales

Debido a sus propiedades eléctricas, las NP's interactúan con las partículas de ácido nucleico, lo que provoca una influencia negativa en el proceso de replicación del ADN cromosómico y plasmídico lo que da lugar a la inhibición de la transducción de señales esenciales para la bacteria (8).

1.6.5. Nanopartículas en el uso odontológico

Actualmente, existe un gran interés en la utilización de las NP's como un agente bactericida para el control de posibles infecciones a nivel de la cavidad oral, debido a sus diversas y favorables características (30). Existen diversas investigaciones sobre el uso de las nanopartículas antimicrobianas en tratamientos protésicos (recubrimiento) y como agente de uso, tópico; sin embargo, en lo relacionado a tratamiento de conducto, la información es muy limitada (30).

Los microorganismos propios de los conductos radiculares tienen la capacidad de generar un biofilm en los túbulos dentinarios, que oscilan entre 1 y 5 micrones de diámetro, aproximadamente, por ende, la capacidad de penetrar en estas zonas anatómicas que deben poseer los antimicrobianos resulta ser un factor clave en el éxito y longevidad terapéutica (30). La nanopartícula de uso odontológico cumple con 5 características fundamentales, que debe tener un agente irrigante ideal. Según el fabricante deben presentar; efectividad antimicrobiana, seguridad, duración o sustentividad, no crear resistencia en los microorganismos y ser responsable con el medio ambiente (31).

1.6.5.1 Nano robots

Durante los últimos 20 años, se ha venido efectuando un progreso de la investigación en nano robótica, la cual puede ser aplicado en varios campos como la medicina clínica. Los nano robots se definen como aditamentos mecánicos de un tamaño o escala micrométrica que se controlan por medio de programación para la realización de ciertas acciones específicas(32). El primero robot programable que ha sido reportado en el área industrial fue el 'Unimate' (Unimation, Inc., EE. UU.) que se usó en la industria automotriz en el año 1961. Posteriormente, en el año 1988 se utilizó la Máquina Universal Programable para Montaje 200 (PUMA 200, Westinghouse Electric, Pittsburg, PA, EE. UU.) en medicina cuyo propósito fue alinear una aguja durante el proceso de toma de biopsias neuroquirúrgicas(33).

En las áreas de la odontología general, implantología, rehabilitación oral e incluso en promoción de salud oral y prevención de la enfermedad se ha utilizado la nanorobótica. Por ejemplo, en la práctica de implantología dental se ha comercializado el uso de 'Yomi' (Neocis, Miami, Florida, EE. UU.). No obstante, para el gremio odontológico puede ser difícil acceder este tipo de iniciativas tecnológicas(33). El científico realizó una revisión mediante la cual se logró explicar con mayor detalle sobre las posibilidades de robótica en odontología, evidenciando la carencia de un enfoque sistemático claro (33)(34).

1.6.6. Biospada 60

La biospada 60 es una nanopartícula de cloruro de benzalconio modificada con (trimethoxysilyl) propyl dimethyl octadecyl ammonium chloride 0.75% es un desinfectante de revestimiento de superficies en áreas domésticas y áreas de baño (35) cuyo mecanismo de acción consiste en la atracción electrostática bacteriana y formación de estructuras físicas en forma de púas que ejercen presión sobre la membrana de las bacterias ocasionando la muerte de las misma por medio físico (36).

1.7. Marco Legal

Según lo establecido en el artículo 11 de la Resolución 8430 de 1993(37), creada por el Ministerio de Salud y Protección Social de la República de Colombia, la cual dicta los lineamientos científicos, técnicos y administrativos para la realización de investigación en salud dentro del territorio colombiano, el presente proyecto es considerado un estudio de riesgo bajo, pues para el estudio in vitro, se utilizarán premolares previamente extraídos bajo indicación médica.

1.8. Objetivos

1.8.1. Objetivo General

Establecer la efectividad antimicrobiana in vitro de la nanopartícula Biospada vs NaOCL al 5.25% como agente irrigante en el sistema de conductos radiculares utilizando la cepa de *Enterococcus Faecalis*.

1.8.2. Objetivos Específicos

Determinar la acción bactericida de la nanopartícula Biospada 60

Especificar la acción bactericida del NaOCL al 5.25% combinado con Biospada 60

Describir la acción bactericida de la nanopartícula Biospada 60 más NaOCL al 5.25% después de un periodo de tiempo de incubación de 20 días.

2. Aspectos Metodológicos

2.1. . Tipo de estudio

La presente investigación es un estudio experimental in vitro.

2.2. Objeto de estudio

Corresponde a conductos radiculares de dientes extraído bajo previa indicación por parte del profesional en salud, bajo indicaciones ortodónticas. Fueron decoronados y preparados al interior del conducto radicular, obedeciendo a 40 tubos de dentina de premolares humanos extraídos

2.3. Material objeto de estudio

Conductos radiculares instrumentados y barro dentinario (Smear layer) o detritos derivados del proceso de instrumentación endodóntica que permita identificar el recuento de *Enterococcus Faecalis*

2.4. Unidad de observación

UFC Unidades formadoras de colonias de la cepa *Enterococcus Faecalis*

2.5. Muestra y muestreo

La muestra de la presente investigación corresponde a n=40 (tubos de dentina), que según el estudio del Holand et al del 1999, Se estableció la caracterización de los tubos de dentina (38). Para este estudio, fueron obtenidos de premolares humanos

extraídos bajo indicación ortodóntica que cumplieron con los criterios de selección del estudio, establecidos por los investigadores, por lo que el muestreo efectuado es intencional o por conveniencia.

2.6. Criterios de selección del estudio

2.6.1. Criterios de inclusión

Premolares humanos extraídos por indicaciones ortodónticas

Dientes permanentes con ápices radiculares formados

Premolares de Individuos de entre 16 a 26 años hombres o mujeres.

2.6.2. Criterios de exclusión.

Dientes deciduos

Dientes permanentes con ápices abiertos

Dientes con tratamiento endodóntico previo

2.7. Procedimiento

Se realizó un estudio experimental in vitro en el centro de investigación odontológica de la Universidad Javeriana con el apoyo del profesional en bacteriología Jean Carlos Villamil Poveda.

La muestra obedeció a n=40 tubos de dentina obtenidos de premolares humanos extraídos por indicaciones ortodónticas con ápices radiculares completamente formados de individuos de entre 16 a 26 años con previo consentimiento por parte del especialista o IPS que los suministró (ver anexo 1.), los cuales fueron trasladados en un medio de transporte: Timol al 0,2% para luego ser irrigados con solución salina. Posteriormente fueron inmersos por un tiempo de 15 minutos en solución de hipoclorito de sodio al 5,25% con el fin de desinfectar la pieza dental y remover cualquier vestigio de restos de tejido orgánico para el posterior estudio. El personal que manipulo las muestras utilizo precauciones universales, es decir, uso de guantes de látex, gafas de protección y mascarillas antes de la instrumentación.

2.7.1. Preparación de espécimen (Tubos de dentina):

Se realizó la preparación de los especímenes (40 tubos de dentina), de la siguiente manera; se decoronaron los dientes y se eliminó ápice con disco de carburo conservando una longitud promedio de los tubos de dentina de 10 mm. Posteriormente, se permeabilizaron los conductos radiculares con lima tipo k preserie No. 10 y se preparó hasta lima No. 60, conicidad 0,02% utilizando

instrumentos manuales (Flexo Files, Dentsply Maillefer). Luego, se continuó con fresa pesso No 1 y No 2. Después de la instrumentación, todos los conductos radiculares se irrigaron con 1 ml de solución salina para inactivar la acción del NaOCL hipoclorito de sodio y se esterilizaron en auto clave a 30 psi, 121° C por 30 minutos.

2.7.2. Inoculación bacteriana:

Se realizó sellado en tercio apical con ionómero de vidrio. Posteriormente, se llevó a inoculación con 10^{-6} ml de la cepa *Enterococcus Faecalis* la cual fue proporcionada por el Centro de Investigaciones Odontológicas CIO, el vial congelado a -80, que contenía el microorganismo fue descongelado a temperatura ambiente y se transfirió el contenido a 5 ml de caldo BHI y se incubó a 37°C por 24 horas.

A partir del crecimiento bacteriano obtenido en el caldo, se tomaron aproximadamente 10 ul, se depositaron en una placa de agar sangre y se sembró por agotamiento, la placa se incubó a 37°C por 24 horas, transcurrido el tiempo de incubación se verificó pureza del cultivo por medio de morfología colonial y coloración de Gram.

Para la formación de Biofilm tubos de dentina. Se dio. a partir del crecimiento bacteriano de *Enterococcus Faecalis* en agar sangre, se tomaron UFC y depositaron

en 10 ml de caldo BHI, hasta llegar a una turbidez 0,5 de MacFarland, los tubos de dentina se depositaron en los 10 ml de BHI que contenía la suspensión bacteriana e incubaron a 37°C, cada tercer día se hizo recambio de medio, se retiraron 5 ml y pusieron 5ml de BHI nuevo hasta completar 21 días en incubadora L-C INCUBATOR/LAB-LINE (Ver Anexo 6.), llevando a cabo todo el procedimiento bajo la cabina de seguridad biológica clase II tipo 2-a, adecuadas para la manipulación de citostáticos de acuerdo a la norma NSF49 standard y también cumpliendo con las siguientes normativas internacionales: ISO9001 ISO14001 ISO13485 CE, generando protección al personal, al producto y al ambiente (ver Anexo 7).

Se realizó, la dilución del agente BIOSPADA 60 con el fin de bajar la concentración de la nanopartícula (trimethoxysilyl) propyl dimethyl octadecyl ammonium chloride 0.75% al 0,008% con la formula $V1. C1=V2.C2$. Después, se estabilizo cada tubo de dentina en gradillas para muestras de laboratorio y se realizaron los protocolos de irrigación. La muestra se dividió en cuatro grupos (A-D):

2.7.3. Protocolo de Irrigación:

Para **GRUPO A:** n=10 tubos de dentina inoculados se les realizó irrigación total con 40 ml de hipoclorito de sodio NaOCL al 5.25% con aguja gauge 27 apertura lateral (ENDO EZE Ultradent®), una por cada espécimen. Se realizó activación con equipo sónico por un minuto con puntas endoactivator No. 25 por cada 5 ml aplicados, succionando los excesos con pipeta.

Para **GRUPO B:** n=10 tubos de dentina inoculados se les realizó irrigación total con 40 ml de solución de Biospada (trimethoxysilyl) propyl dimethyl octadecyl ammonium chloride 0.008% con aguja gauge 27 apertura lateral (ENDO EZE Ultradent®) una por cada espécimen. Se realizó activación con equipo sónico por un minuto con puntas endoactivator No. 25 por cada 5 ml aplicados, succionando los excesos con pipeta.

Para **GRUPO C:** n=10 tubos de dentina a los que Se realizó irrigación total con 40 ml de hipoclorito de sodio NaOCL al 5.25%, alternado con BIOESPADA 60 de (trimethoxysilyl) propyl dimethyl octadecyl ammonium chloride 0.008% (20 ml por cada solución irrigante). Con aguja gauge 27 apertura lateral (ENDO EZE Ultradent®) una por cada espécimen. Se realizó activación con equipo sónico para cada solución irrigante, por un minuto con puntas endoactivator No. 25 por cada 5 ml aplicados de hipoclorito de sodio, luego se inactivo con 1 ml de PBS (solución salina) para continuar con 5 ml de la solución irrigante BIOESPADA 60 y activación con equipo sónico por un minuto. Hasta completar los 40 ml totales de soluciones irrigantes. succionando los excesos con pipeta

El **GRUPO D:** n=10 tubos de dentina que representó los controles positivos de estudio que fueron infectados con la cepa *Enterococcus Faecalis* durante dos semanas sumergidos en el caldo de cultivo.

2.7.4. Recopilación de la muestra

Finalmente, se extrajo cada muestra con limas tipo k No. 70 (Flexo Files, Dentsply Maillefer) y simultáneamente se evaluaron los tubos de dentina mediante agitación mecánica con vórtex (ver Anexo 8.) para posterior cultivo en agar sangre por 8 días, que permitió determinar crecimiento bacteriano a las 48 horas a una temperatura de 37° y obtener el recuento de unidad formadora de colonia (UFC).

Para el procedimiento, por medio de pinzas algodonerías se transfirió cada lima en un tubo eppendorf de 1,5 ml que contenía 1 ml de PBS y un tubo de dentina en un tubo eppendorf de 1,5 ml que contenía 1 ml de PBS. Cada tubo se homogenizó por un minuto en agitación mecánica con Vortex, con la finalidad de desprender las bacterias que estuviesen adheridas a la superficie de la lima y para favorecer la salida de los microorganismos que pudiesen estar presentes en la morfología interna del sistema del conducto radicular de cada tubo de dentina.

Se tomaron 0.1 ml (100µl) y se depositaron en una placa de agar sangre. Con ayuda de un rastrillo el volumen depositado fue esparcido homogéneamente sobre la superficie del agar. A continuación, las placas se incubaron a 37°C por 48 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, las placas de agar se retiraron de la incubadora y se observó si hubo o no crecimiento microbiano; en caso de crecimiento positivo se realizó el recuento de UFC. Para el grupo control se realizaron diluciones seriadas en base 10 (10-1, 10-2, 10-3, 10-4).

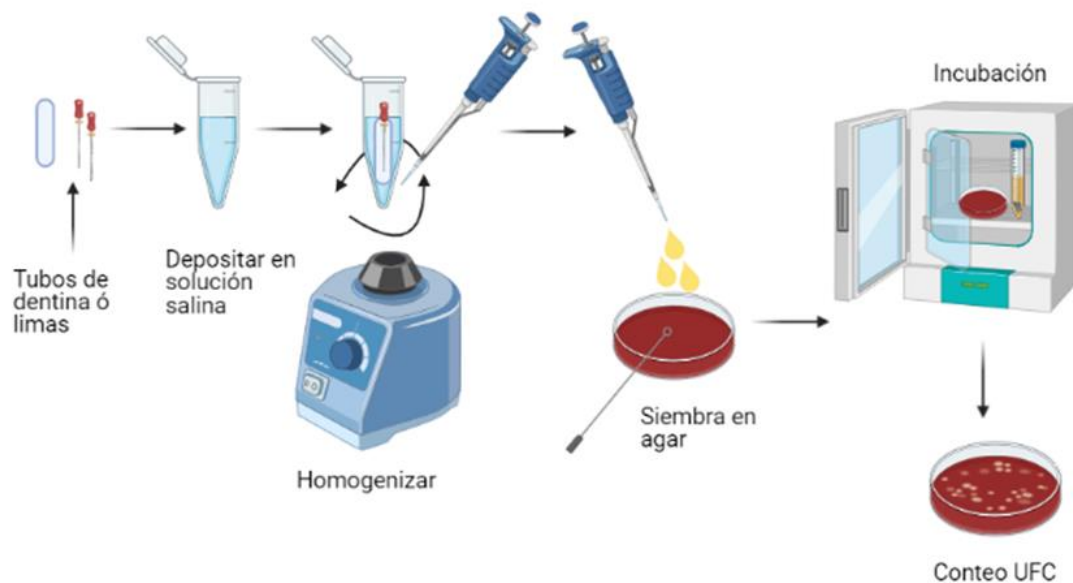


Figura 6: Esquema protocolo recopilación de muestras. Creada en el programa Biorender.com

2.7.5. Protocolo de Visualización en la microscopia electrónica de barrido:

Para el grupo control, se realizó división de un tubo de dentina de manera vertical, luego se inoculo con la cepa de *Enterococcus Faecalis*, y cada segmento paso por un protocolo de fijación, deshidratación y Metalizado (Au-SP), el cual consiste en un Proceso de Recubrimiento con Oro empleada para mejorar la conductividad de las muestras, denominado también *Sputtering*:

2.7.5.1. Fijación:

- a)** Se sumergió la muestra en una solución de glutaraldehído 2,5% de 1 a 48 horas. Se utilizó tubo con (Viales) de 2 ml.

Si realizo dilución de glutaraldehído con PBS. Al ser una muestra aglomerada o precipitada, fue importante resuspender en la solución de glutaraldehído para que todas las células tengan buen contacto con la solución. Después de completar el tiempo requerido, como la muestra se encuentra resuspendida, se centrifugo para poder retirar la solución de glutaraldehído sin perder muestra.

- b)** Se realizó un mínimo de 3 lavados con agua destilada para eliminar las sales.

2.7.5.2. Deshidratación:

- c)** Se sumergió la muestra en etanol al 70% durante 30 minutos
- d)** Se sumergió la muestra en etanol al 90% durante 30 minutos
- e)** Se sumergió la muestra en etanol al 100 % durante 30 minutos
- f)** Se cambió nuevamente la muestra a etanol al 100% y se dejó en etanol.
Se dejó en esta solución para entregarla al centro de microscopia.

2.7.5.3. Metalizado:

Uno de los requisitos para observar muestras en el MEB (SEM) (en alto vacío) es que sean conductoras de corriente eléctrica, para que no se carguen causando la

desviación del haz de electrones. Entonces, si la muestra no es conductora se le debe aplicar un recubrimiento con un material conductor, como el carbono o el oro. El metalizador Desk® IV proporciona un recubrimiento de grano fino (100Å) uniforme y conductor, en un solo ciclo de revestimiento (ver Anexo 9).

Técnica de recubrimiento con oro:

Consiste en el depósito de una película fina de oro u oro-paladio sobre la muestra, en condiciones de baja presión (10^{-4} Torr). Esta técnica se emplea para la obtención de imágenes de electrones secundarios, ya que el oro es uno de los materiales que origina mayor emisión, conduciendo a mejores resultados.

El anterior protocolo fue suministrado por Centro de Microscopía Micro Core de la Universidad de los Andes y finalmente, se ejecutó la visualización mediante Microscopio de haz de iones focalizado – Tescan (modelo Lyra 3), (ver Anexo10).

2.7.6. . Instrumento de recolección de datos

Para la presente investigación se diseñó un instrumento de recolección de datos (ver anexo B) que permitió recopilar la información sobre la cantidad de microorganismos encontrados en cada uno de los cuatro grupos a evaluar después de haberse realizado el proceso de irrigación con las sustancias a estudiar

2.7.7. Variables

Dentro de las variables de la presente investigación se encuentran:

Tabla 1. Operacionalización de variables

Operacionalización de variables					
Variable	Definición	Tipo	Naturaleza	Escala de medición	Valor que asume
Tipo de Irrigante	El irrigante ideal debe poseer ciertas propiedades dentro de las cuales cabe resaltar las relacionadas a continuación: - Amplio espectro y eficacia antimicrobiana - Inactivación de endotoxinas. - No tóxico, no caustico para el periodonto. - Eliminación de restos de tejido pulpar necrótico. - Baja posibilidad de causar respuesta anafiláctica	Independiente	Cualitativa	Nominal politémica	• HIPOCLORI TOAL 5,25% • BIOSEPA DA 125 • BIOSEPA DA 125 + HIPOCLORI TOAL 5,25%

Efectividad antibacteriana	capacidad que posee un compuesto para eliminar la proliferación y supervivencia de las bacterias en determinado lugar	Dependiente	Cuantitativa	discreta	Media y desviación estándar
Presencia de E faecalis	microorganismo más aislado que se presenta con mayor frecuencia en los casos de fracaso de la terapia endodóntica, pues tiene la capacidad de penetrar y sobrevivir dentro de los túbulos dentinarios y formar una biopelícula en las paredes del conducto radicular, penetrando en el túbulo dentinal cerca de la pulpa y de la unión esmalte/cemento, aproximadamente 0.95 y 2,5 milímetros, respectivamente (4).	Dependiente	Cuantitativa	discreta	Media y desviación estándar

2.8. Consideraciones éticas

De acuerdo con la clasificación planteada en el Artículo 11 de la Resolución N° 008430 de 1993 (expedida por el Ministerio de Salud de Colombia), y a la Resolución 2378 de 2008” (expedida por el Ministerio de la Protección Social) (37) o Investigación con riesgo mínimo: Son estudios prospectivos que emplean el registro de datos a través de procedimientos comunes consistentes en: exámenes físicos o psicológicos de diagnóstico o tratamientos rutinarios, entre los que se consideran: pesar al sujeto, electrocardiogramas, pruebas de agudeza auditiva, termografías, colección de excretas y secreciones externas, obtención de placenta durante el parto, recolección de líquido amniótico al romperse las membranas, obtención de saliva, dientes deciduales y dientes permanentes extraídos por indicación terapéutica, placa dental y cálculos removidos por procedimientos profilácticos no invasores, corte de pelo y uñas sin causar desfiguración, extracción de sangre por punción venosa en adultos en buen estado de salud, con frecuencia máxima de dos veces a la semana y volumen máximo de 450 ml en dos meses excepto durante el embarazo, ejercicio moderado en voluntarios sanos, pruebas psicológicas a grupos o individuos en los que no se manipulará la conducta del sujeto, investigación con medicamentos de uso común, amplio margen terapéutico y registrados en este Ministerio o su autoridad delegada, empleando las indicaciones, dosis y vías de administraciones establecidas y que no sean los medicamentos que se definen en el artículo 55 de esta resolución (37).

2.9. Análisis estadístico.

2.9.1. Análisis univariado

El análisis univariado de la presente investigación se efectuó mediante en análisis de medidas de tendencia central para aquellas variables de naturaleza cuantitativa, es decir, la efectividad antibacteriana y la presencia del *Enterococcus Faecalis*; mientras tanto, la variable de naturaleza cualitativa denominada tipo de irrigante se analizó a partir de frecuencia absoluta y porcentaje.

2.9.2. Análisis bivariado

El análisis bivariado permitirá analizar la relación o el cruce de las variables dependientes (efectividad antibacteriana y la presencia del *Enterococcus Faecalis*) con la variable independiente llamada tipo de irrigante, por lo que, al tratarse de variables de naturaleza cuantitativa- cualitativa, se utilizó el T de student como prueba estadística mediante los programas The jamovi Project y R Core Team en la versión 2021, arrojando resultados con un 95% Confidence Interval

2.9.3. Prueba piloto

Se realizó una prueba piloto con un total de 8 premolares humanos extraídos tras previa indicación por parte del especialista en ortodoncia. Mediante la realización

del procedimiento y la realización del recuento de unidades formadoras de colonia de las muestras tomadas de los detritos o Smear layer tomado de la lima y posterior cultivo, infortunadamente no se observó proliferación o crecimiento bacteriano.

Por ende, se decidió modificar el método de recolección de muestra recopilando no solo los residuos que se obtuvieron de la lima, sino también los de los tubos de dentina por medio del proceso mecánica con ayuda de un agitador vórtex o mezclador de vórtice por un minuto con previa disolución de los restos del conducto con solución salina para favorecer la salida de los microorganismos.

3. Resultados

Se analizó la efectividad antibacteriana del *Enterococcus Faecalis* en una muestra de 40 tubos de dentina los cuales fueron divididos en 4 grupos (cada uno de 10 tubos) para analizar la acción bactericida de cada irrigante (Grupos A, B y C), y ser comparado con el recuento de unidades formadoras de colonia (UFC) del grupo control o grupo D. Es preciso mencionar que del mismo diente se tomaron dos muestras, una de la lima y otra del tubo de dentina, con el propósito de obtener resultados de UFC más precisos.

Conteo UFC							
Muestra	Control	Hipoclorito (Lima)	Hipoclorito (tubo)	Bioespada (Lima)	Bioespada (Tubo)	Hipo+Bio (Lima)	Hipo+Bio (tubo)
R1	6900000	0	0	0	67	0	0
R2	3800000	0	0	0	4	0	0
R3	2200000	0	0	0	1	0	0
R4	7200000	0	0	0	2	0	1
R5	5400000	0	0	0	4	0	0
R6	2300000	0	0	1	0	0	0
R7	3300000	0	0	132	128	0	34
R8	4100000	0	0	91	420	0	4
R9	3600000	0	0	676	505	0	116
R10	4500000	0	0	1652	807	0	328
TOTAL	43300000	0	0	2552	1938	0	483
Recuento de unidades formadora de colonia de E.faecalis tras al uso del hipoclorito de sodio al 5,25%, la Biospada y la combinación de ambos como irrigante endodónticos.							

Tabla 1. Conteo de UFC por irrigante

Fue posible observar mediante la tabla que antecede que la totalidad de unidades formadoras de colonias del *Enterococcus Faecalis* fue erradicada por el hipoclorito de sodio al 5,25% tanto en la muestra de detrito obtenida de la lima como en el tubo de dentina, seguidamente, el irrigante que menor recuento presentó fue la combinación de hipoclorito de sodio al 5,25% + Biospada con un recuento de 483 UFC recolectada del tubo de dentina, lo que obedece al 0,001% al ser comparado con el UFC total del grupo control (n=43.300.000) (ver tabla 2).

Finalmente, el uso de biospada utilizado como irrigante endodóntico de manera individual, aunque demostró la capacidad de eliminar el *Enterococcus Faecalis*, fue el que mayor conteo de UFC obtuvo después del proceso de irrigación, encontrando un total de 1938 UFC en el tubo de dentina (0,004%) y 2552 UFC en la muestra de lima (0,005%) (ver tabla 2). Adicionalmente, en el grupo control se evidencia la cantidad de UFC identificadas en cada tubo de dentina (Ver figura 7).

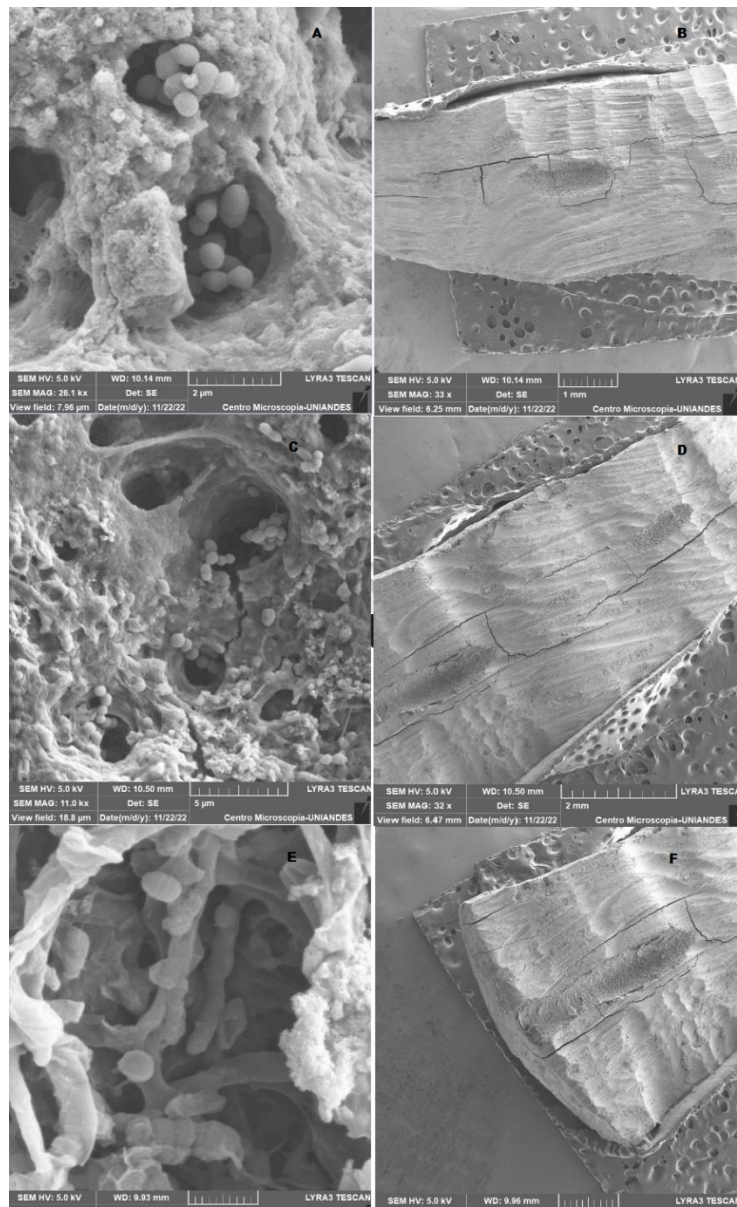


Figura 7. Tubo de dentina correspondiente al grupo control en el cual no fue aplicado ningún irrigate donde se puede apreciar el crecimiento bacteriano del *Enterococcus Faecalis*. (A) Tercio apical del tubo de dentina ampliada al 26,1 kx. (B) Tercio apical de tubo de dentina ampliada al 33 x. (C) Tercio medio de tubo de dentina ampliado al 11,0 kx (D) Tercio medio de tubo de dentina ampliado al 32 x (E) Tercio cervical de tubo de dentina apmpliado al 39,2 kx (F) Tercio cervical de

tubo de dentina ampliado al 34x. Scanning Electron Microscope (SEM) obtenidas del Microscopio de haz de iones focalizado – Tescan (modelo Lyra 3)

Tabla 2. Análisis descriptivo de los irrigantes

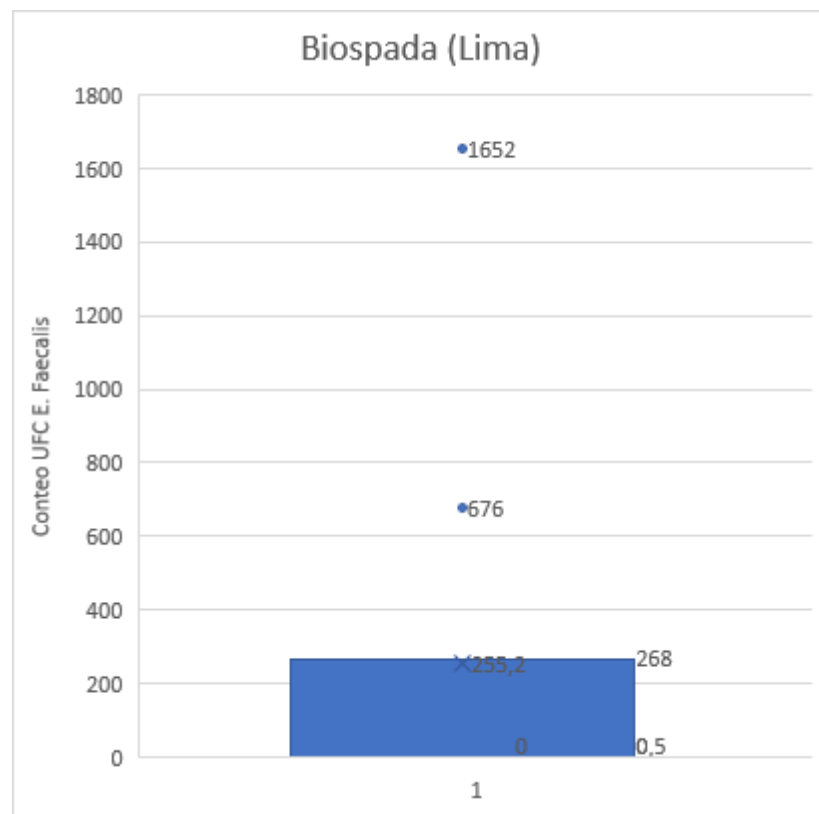
De acuerdo al análisis descriptivo de los irrigantes utilizados, es posible mencionar que el conteo de UFC de *Enterococcus Faecalis* hallado después de la irrigación con Hipoclorito de sodio al 5,25% + Biospada 60 de la muestra de tubo de dentina arrojó una media de 0,50 con desviación estándar de ± 105 , arrojando los resultados más óptimos en cuanto a la capacidad bactericida con un 95% de intervalo de confianza (ver tabla 3).

Análisis descriptivo									
Irrigante*	N	Missing	Mean	Lower	Upper	Median**	SD***	Minimum	Maximum
Hipoclorito (Lima)	10	3	0.0	0.0	0	0.000	0	0	0
Hipoclorito (tubo)	10	3	0.0	0.0	0	0.000	0	0	0
Bioespada (Lima)	10	3	255.2	-75.4	586	0.500	533	0	1652
Bioespada (Tubo)	10	3	193.8	17.5	370	35.500	284	0	807
Hipo+Bio (Lima)	10	3	0.0	0.0	0	0.000	0	0	0
Hipo+Bio (tubo)	10	3	48.3	-16.7	113	0.500	105	0	328
Análisis descriptivo de las variables mediante medidas de tendencia central con un 95% de intervalo de confianza. (*) Irrigante: sustancia utilizada como complemento en el tratamiento de conducto por su capacidad bactericida. (**) Media: medida de tendencia central. (***) SD: desviación estándar de la media.									

AI

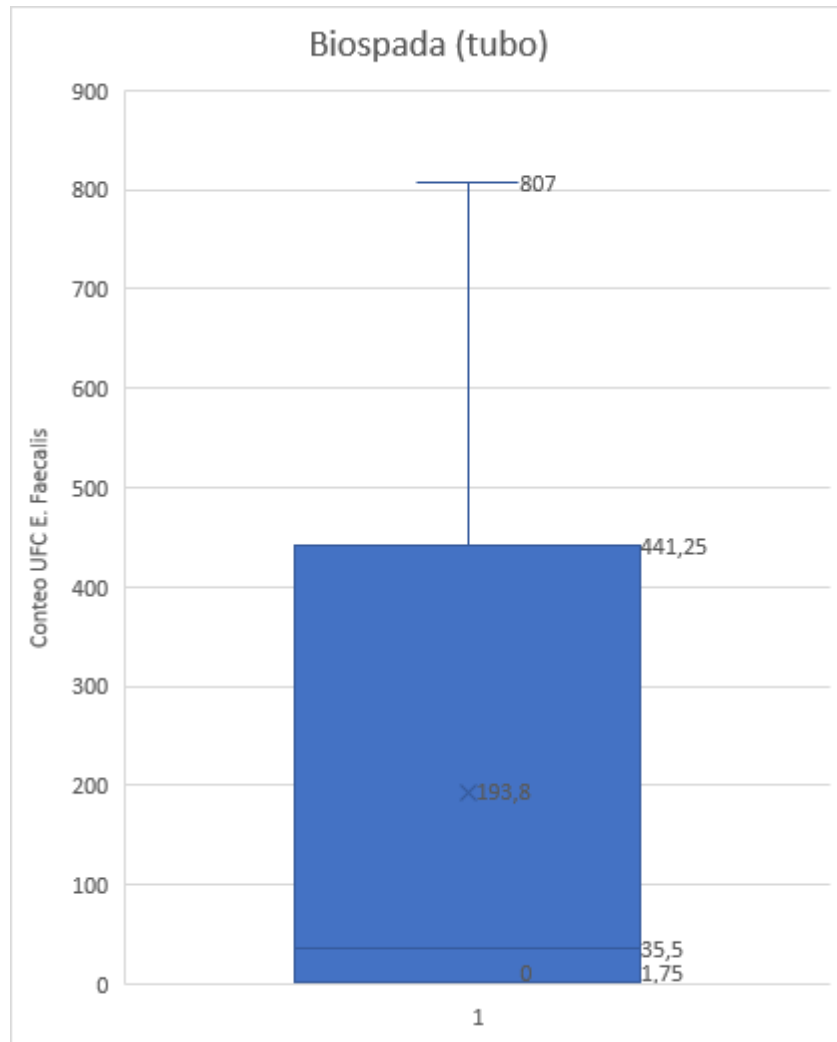
realizar el análisis de los irritantes que presentaron conteo UFC de *Enterococcus Faecalis* en las muestras tomadas por el laboratorio se observó, para la muestra obtenida de la lima de los conductos irrigados con Biospada 60, que el 50% de la cantidad de microorganismos hallados oscilan entre una cantidad comprendida entre 0,5 y 268 UFC con una media de 255.2 UFC y dos outliers que se encuentra representados por fuera de la gráfica (ver gráfica 1).

Gráfica 1. Plot de Biospada (lima)



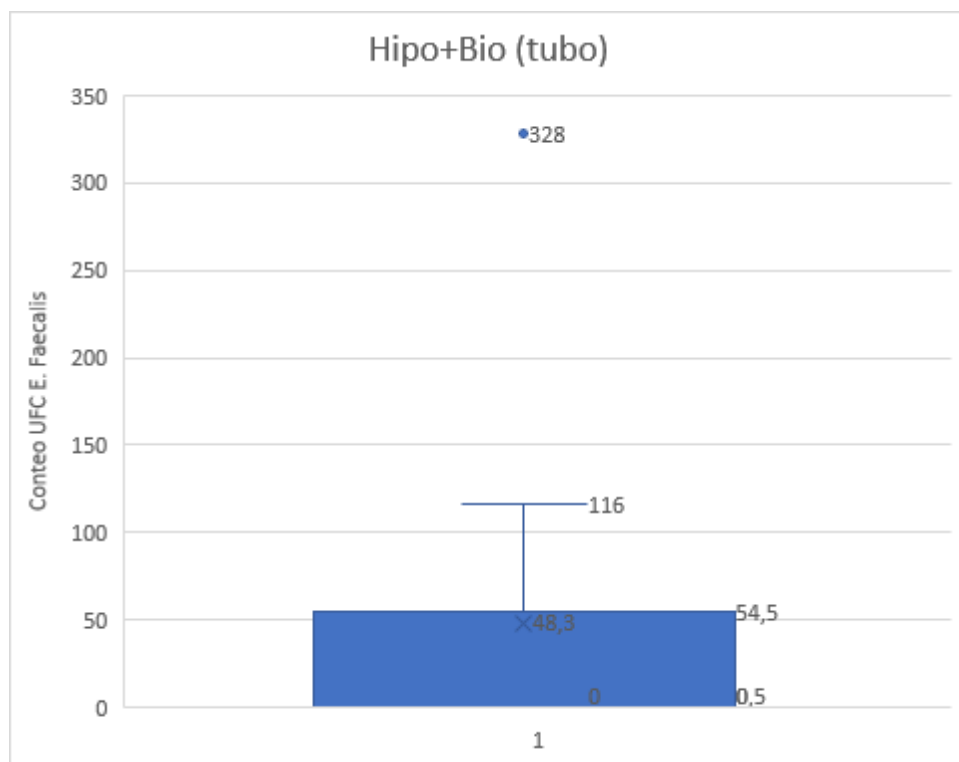
Ahora bien, al analizar el comportamiento de la muestra obtenida del tubo de dentina tras se irrigado el conducto con Biospada de manera individual se observó que el 75% de la cantidad de UFC de *Enterococcus Faecalis* se encuentran entre un rango de 0 y 441,25 UFC con una media de 193,8 (ver gráfica 2).

Gráfica 2. Plot Biospada (tubo)



Finalmente, la muestra de tubo de dentina observada tras la irrigación con hipoclorito de sodio al 5,25 + Biospada 60, arrojó que el 25% de la cantidad total de microorganismos encontrados oscila entre los 54,5 y 116 UFC de *Enterococcus Faecalis* con una media de 48,3 UFC. También es posible evidenciar un outlier de 328 UFC que se aleja del comportamiento normal de la gráfica (ver gráfica 3).

Gráfica 3. Plot Hipoclorito de Sodio 5,25% + Biospada (tubo)



Por otro lado, se realizó la comparación de la efectividad antibacteriana de los irrigantes utilizados en el proceso de desinfección de conductos contra el

Enterococcus Faecalis mediante el conteo de UFC presente después de la irrigación para cada uno de los grupos.

Tabla 3. Comparación entre irrigantes

Comparación de irrigantes							
Irrigantes		Tipo de prueba	statistic	DF	P	Mean difference	SE difference
Hipoclorito (Lima)	Bioespada (Lima)	Student's t	-1.51	9.00	0.165	-255.2	168.7
Hipoclorito (tubo)	Bioespada (Tubo)	Student's t	-2.15	9.00	0.060	-193.8	89.9
Hipoclorito (Lima)	Hipo+Bio (Lima)	Student's t	NaN	9.00	NaN	0.0	0.0
Hipoclorito (tubo)	Hipo+Bio (tubo)	Student's t	-1.46	9.00	0.179	-48.3	33.1
Comparación de irrigantes mediante la prueba de T-student de muestras pareadas							

Se evidenció, que al ser comparados el hipoclorito de sodio al 5,25% frente a la Biospada 60 tanto en la muestra recolectada de la lima como la de los tubos de dentina (con agitación mecánica, a través del Vortex), el Hipoclorito de sodio logro eliminar la totalidad de microorganismos, al igual que al ser comparado el hipoclorito de sodio frente a la combinación de Hipoclorito + Biospada, no obstante; estos resultados no mostraron significancia estadística, arrojando valores de p superiores a 0,05.

4. Discusión

La presente investigación in vitro utilizó 4 grupo de n=10 tubos de dentina para analizar la efectividad antibacteriana contra el *Enterococcus Faecalis* de la Biospada 60, Hipoclorito de sodio al 5,25% y la combinación de Hipoclorito de sodio al 5,25% más la aplicación de biospada 60 como coadyuvante en el proceso de irrigación endodóntica con previa activación con equipo sónico por un minuto.

Inicialmente, el protocolo planteado indicaba realizar la recolección de la muestra solo del Smear layer obtenido de la lima introducida previamente dentro del canal radicular para instrumentar el conducto girando de 3 a 4 veces en sentido de las manecillas del reloj después de cada irrigación, para ser cultivado en agar sangre durante 20 días, no obstante, al realizar la prueba piloto se evidencia que dicha metodología no arrojó recuento de unidades formadores de colonia de *Enterococcus Faecalis*, por lo que basado en el estudio publicado por Guijarro en el 2017 (39), se decidió cambiar el protocolo de recolección de muestra.

Se tomó la muestra de la lima y adicionalmente la de los tubos de dentina teniendo la precaución de pipetear con solución salina dentro del conducto para obtener una mayor presencia de bacterias, para esto, con ayuda de unas pinzas algodonerías se transfirió cada lima y tubo de dentina a un tubo eppendorf de 1,5 ml que contenía 1 ml de PBS. Cada tubo se homogenizó por un minuto en vórtex, con la finalidad de desprender las bacterias que estuviesen adheridas a la superficie por medio del

proceso de agitación mecánica (39), para finalmente tomar 0.1 ml (100µl) de la muestra y depositarla en una placa de agar sangre, para que, con ayuda de un rastrillo, el volumen depositado fuese esparcido homogéneamente sobre la superficie del agar para proceder con la incubación durante un periodo de tiempo comprendido por 48 horas a una temperatura de 37°C.

Una vez culminado el tiempo de incubación, las placas de agar se retiraron de la incubadora y se observó si hubo o no crecimiento microbiano mediante el método de recuento en placa; en caso de evidenciarse un crecimiento, se realizó el recuento de UFC correspondiente y para el caso del grupo control, el cual no se irrigó, se realizaron diluciones seriadas en base 10 (10-1, 10-2, 10-3, 10-4). La utilización de la agitación mecánica por medio del vórtex (39), permitió obtener recuentos positivos de *Enterococcus Faecalis* posterior a la irrigación, en especial la de la muestra derivada de los tubos de dentina, donde las bacterias posicionadas dentro de los conductos laterales y accesorios fueron desalojadas e identificadas con el propósito de determinar la efectividad antibacteriana de cada irrigante.

Es necesario aclarar que, aunque la técnica de agitación permitió identificar UFC de *Enterococcus Faecalis* posterior a la irrigación, no es posible asegurar que esas cifras obedezcan a la totalidad de las bacterias alojadas en el conducto después de la desinfección mecánica y química del mismo. La literatura ha informado que la técnica que permite establecer el recuento bacteriano en su totalidad se denomina pulverización y consiste en introducir el diente en nitrógeno líquido para proceder

con su trituración hasta la obtención de un polvo fino, pero en el territorio nacional, dicha técnica no es utilizada, lo que representó una evidente limitación para la investigación in vitro (14). Por otro lado, con relación al recuento de bacterias, estudios han demostrado que el conteo realizado por microscopía electrónica de barrido (SEM) permite obtener un recuento preciso para verificar la presencia de bacterias en la dentina e incluso, se menciona el uso de la microscopía de barrido láser focal (CLSM) y de la tinción de viabilidad, como métodos que permiten constituir un análisis cuantitativo de bacterias muertas y vivas dentro de la dentina (40), lo cual se puede tener en cuenta para futuras investigaciones bajo esta misma línea de estudio.

El hipoclorito de sodio se ha usado como parte esencial del tratamiento de endodoncia desde los años 30, lo que ha hecho que se considere el irrigante de elección para la realización de los procedimientos de conducto debido a su eficacia antimicrobiana y excelente capacidad para disolver el tejido orgánico(41) Ahora bien, en el presente estudio in vitro, los hallazgos demostraron que el hipoclorito de sodio con una concentración del 5,25% logró eliminar la totalidad de microorganismos previamente incubados bajo condiciones óptimas cultivados en agar sangre durante 20 días, por lo que se le atribuye una presunta efectividad del 100%, la cual se debe a la concentración del irrigante, de acuerdo al reporte dado por varias investigaciones (42)(43)(44)(45). No obstante, el uso de altas concentraciones puede generar efectos no deseados durante el uso del irrigante, cuando se utiliza el hipoclorito de sodio a concentraciones de 5,25%, como lo es en

este caso, ocasiona hemolisis de los tejidos orgánicos debido a su pH entre 11 y 12,5 provocando oxidación a nivel de las proteínas, hidrolisis y un efecto osmóticamente activo. También aumenta la permeabilidad de los vasos sanguíneos por el daño en sus paredes generando edema y sangrado profuso a través del canal radicular. Otras complicaciones reportadas es el daño al ligamento periodontal con soluciones a altas concentraciones (entre 3 y 5.25%)(7) .

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, es preciso mencionar que el hipoclorito de sodio sigue siendo el Gold estándar dentro del grupo de irrigantes endodónticos y que independientemente de la concentración que este maneje, la efectividad antibacteriana es similar e incluso alcanzan un porcentaje del 100%.

Aunque en la actualidad, los bactericidas utilizados en para irrigar los conductos radiculares tiene la posibilidad de eliminar al *Enterococcus Faecalis*, con frecuencia se evidencian fallas en el tratamiento. Un ejemplo de esto es el estudio realizado por Kishen et al, que en el año 2008 lograron demostrar que las paredes del conducto radicular tratada con nanopartículas antimicrobianas, minimizaron la adhesión del *Enterococcus Faecalis* al tejido dentinal, lo que lleva a concluir que, tratar la superficie radicular previene la recolonización bacteriana y la aparición del biofilm (30).

En este estudio in vitro se quiso analizar un irrigante diferente a los convencionales en el proceso de desinfección de conductos radiculares, el cual se denomina Biospada 60, cuya acción evidenció una reducción en el recuento de UFC, lo que a

su vez le aportó una efectividad antibacteriana contra la cepa del *Enterococcus Faecalis* del 99,99%, gracias al mecanismo de acción de dicho componente que se caracteriza por la formación de estructuras en forma de púas que ejercen presión sobre la membrana de las bacterias ocasionando la muerte de las mismas por medio de su acción física. Sin embargo, este es un componente utilizado principalmente en los procesos de desinfección de instrumental o superficies, pero no como irrigante endodóntico y esto se debe a la citotoxicidad (46)(47).

Estudios realizados en modelo animal manifestaron la presencia de irritación dérmica severa en conejos y toxicidad a nivel ocular de ratas tras la administración de (trimethoxysilyl) propyl dimethyl octadecyl ammonium chloride 0.75% (46). Por otro lado, el mismo compuesto fue evaluado en un estudio humano in vivo con el fin de analizar la actividad antimicrobiana inhibiendo la formación de placa dental sin observar toxicidad significativa (48), gracias a la acción de la cadena de octadecilo que inhibía la adherencia inicial, y la sal de amonio que destruye las células adherentes iniciales y retrasa el crecimiento bacteriano, sin embargo, en este estudio no se mencionó la concentración del compuesto (48) .

Sin embargo, en el estudio de Bukiet et al, en el año 2012, concluyó que la concentración micelar crítica de cloruro de benzalconio fue del 0,008%. A esta concentración, no tuvo ningún efecto sobre el contenido de cloro libre, la citotoxicidad o la eficacia antibacteriana de la mezcla (49). Por lo tanto, en este estudio se utilizó la concentración sugerida.

De acuerdo a lo descrito anteriormente, se decidió diluir la biospada que se utilizó como irrigante endodóntico en la presente investigación con el fin de minimizar la posibilidad de generar toxicidad y otros efectos como la pérdida de dientes y el daño a los nervios sensoriales (anestesia y parestesia)(50) y a su vez poder determinar la capacidad bactericida una vez diluida .

Finalmente, la presente investigación quiso analizar la efectividad bacteriana de la combinación de hipoclorito de sodio al 5,25% más el uso de Biospada 60 como coadyuvante en el proceso de desinfección del conducto radicular con cepa de *Enterococcus Faecalis*, demostrando la capacidad bactericida en el 99,99% , superando la capacidad de la Biospada como irrigante individual pero sin alcanzar la eliminación total de las bacterias que logró el hipoclorito de sodio al 5,25%, dejando en evidencia que la biospada como complemento de la irrigación con hipoclorito disminuye la capacidad bactericida de este Jaramillo en el 2012 realizó un estudio en el cual investigó el uso de del cloruro de benzalconio como bactericida encontrando resultados positivos que al ser comparados con la desinfección que aporta el Hipoclorito de sodio al 1%, obtuvo resultados similares sin superar la acción bactericida del mismo (13). Estos resultados son comparables a lo estudiados en la presente investigación. Pues, aunque tanto el Hipoclorito de sodio como la biospada 60, demostraron efectividad antibacteriana contra el *Enterococcus Faecalis*, la acción del hipoclorito de sodio no fue superada por el Biospada 60.

Antes de finalizar, es importante consignar el análisis del comportamiento de la proliferación bacteriana de las 10 muestras pertenecientes al grupo control, mismo que no fue sometido a ningún agente irrigante, sin embargo, es imposible dejar pasar que aunque todas las muestras se cultivaron bajo un ambiente controlado y bajo las mismas condiciones, algunos cultivos arrojaron mayor recuento de UFC que otros y esto se puede explicar debido a la morfología interna de los conductos radiculares, que a pesar de ser del mismo tamaño, la cantidad, diámetro, forma y longitud de los conductos accesorios, laterales y ramificaciones permitió que en algunas muestras se presentara un mayor conteo de UFC(51).

Finalmente, dentro de las limitaciones de la presente investigación se destaca el tamaño de la muestra lo que no permitió arrojar resultados estadísticamente significativos. Por otro lado, el método utilizado para la obtención de la muestra se debió cambiar tras la realización de la prueba piloto por el método de agitación mediante el vórtex, mismo que arrojó resultados positivos para el conteo de UFC, no obstante; no fue posible implementar el de pulverización, dado que a nivel nacional no se maneja dicha técnica, sobre la cual existen reportes de una mayor y más precisa obtención de recuento bacteriano de microorganismos alojados dentro del conducto radicular, conductos accesorios y túbulos. Sin embargo, como fortaleza es posible mencionar que la presente investigación es el primer paso dado a nivel nacional para analizar, describir y verificar tanto el uso, como la efectividad antibacteriana de la Biospada en el tratamiento de conductos radiculares.

5. Conclusiones

Los resultados demostraron que la Biospada 60 utilizada en el proceso de irrigación endodóntica presentó efectividad bactericida contra el *Enterococcus Faecalis*, no obstante, su acción bactericida no superó el uso del hipoclorito de sodio al 5,25%, que sigue siendo considerado el Gold estándar dada su capacidad bactericida y capacidad de remover tejido orgánico derivado de la instrumentación.

Puntualmente, el hipoclorito de sodio al 5,25% logró eliminar la totalidad de microorganismos incubados en los conductos radiculares durante 20 días de cultivo, por lo que se le atribuye una efectividad antibacteriana del 100%, por otro lado, aunque la combinación del Hipoclorito de sodio al 5,25% más la biospada 60 y la Biospada utilizada como irrigante individual arrojaron un porcentaje de efectividad antibacteriana del 99,99%, hubo menor número de Unidades formadoras de Colonia del *Enterococcus Faecalis* en los conductos en los cuales se irrigó con la combinación de Hipoclorito + biospada 60. Sin embargo, estos resultados no arrojaron significancia estadística, siendo necesario la realización de estudios complementarios que refuercen los hallazgos presentados en este estudio in vitro.

También podemos concluir que mediante técnica de visualización SEM se observa caracterización morfológica bacteriana de *coccus*. Pero es necesario la confirmación de la cepa con PCR.

6. Recomendaciones

Se recomienda dar continuidad a la línea de investigación con muestras más grandes que permitan realizar un análisis estadístico más precisos y sólidos.

También resulta interesante que para la recolección de la muestra de tejido infectado se pueda recurrir a la técnica de pulverización por medio de nitrógeno líquido lo que a su vez permitirá corroborar su gran capacidad para recolectar la totalidad de microorganismos.

Adicionalmente se sugiere implementar técnicas como el SEM para el recuento de UFC presentes en los tejidos radiculares posterior a la irrigación con los diferentes agentes. Así como implementación de pruebas PCR para confirmación de crecimiento específico en cajas petry de la bacteria *Enterococcus Faecalis*.

Finalmente se sugiere que, en futuras investigaciones, para determinar la efectividad antibacteriana, sea tomada la muestra de UFC en el mismo conducto antes y después de la instrumentación e irrigación para que los datos no se obtengan a partir de un grupo control sino del mismo diente tratado.

7. Referencias Bibliográficas

1. Silva EJNL, Prado MC, Soares DN, Hecksher F, Martins JNR, Fidalgo TKS. The effect of ozone therapy in root canal disinfection: a systematic review. *Int Endod J*. 2020;53(3):317–32.
2. Bhandi S, Mehta D, Mashyakh M, Chohan H, Testarelli L, Thomas J, et al. Antimicrobial Efficacy of Silver Nanoparticles as Root Canal Irrigant's: A Systematic Review. *J Clin Med*. 2021;10(6):1152.
3. Brook I. Microbiology and management of endodontic infections in children. *J Clin Pediatr Dent*. 2003;28(1):13–7.
4. Nagendrababu V, Meiyazhagan G, Beaula WS, Kalaiselvam R, Subramanian B, Chandrasekar A, et al. Comparison of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* biofilm - An in vitro study. *J Nanosci Nanotechnol*. 2017;17(7):4613–7.
5. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod*. 2006;32(2):93–8.
6. van der Sluis LWM, Vogels MPJM, Verhaagen B, Macedo R, Wesselink PR. Study on the Influence of Refreshment/Activation Cycles and Irrigants on Mechanical Cleaning Efficiency During Ultraactive Activation of the Irrigant. *J Endod* [Internet]. 2010;36(4):737–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2009.12.004>
7. Marin Botero M, Gómez B, Cruz Lopez S. Sodium hypochlorite used as duct

irrigation. Clinical case, and literature review. *Av Odontoestomatol.* 2019;35(1):33–42.

8. Raura N, Garg A, Arora A, Roma M. Nanoparticle technology and its implications in endodontics: a review. *Biomater Res.* 2020;24(1):1–8.

9. Jaramillo DE, Aguilar E, Arias A, Ordinola-Zapata R, Aprecio RM, Ibarrola JL. Root canal disinfection comparing conventional irrigation vs photon-induced photoacoustic streaming (PIPS) using a buffered 0.5 % sodium hypochlorite solution. *Evidence-Based Endod [Internet].* 2016;1(1):4–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s41121-016-0006-6>

10. Samiei M, Farjami A, Dizaj SM, Lotfipour F. Nanoparticles for antimicrobial purposes in Endodontics: A systematic review of in vitro studies. *Mater Sci Eng C.* 2016;58:1269–78.

11. Barros J, Silva MG, Rodrigues MA, Alves FRF, Lopes MA, Pina-Vaz I, et al. Antibacterial, physicochemical and mechanical properties of endodontic sealers containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles. *Int Endod J.* 2014;47(8):725–34.

12. Titato PCG, Zancan RF, Pedrinha VF, Andrade FB de, Vivan RR, Duarte MAH. Influence of EDTA and its Association with Benzalkonium Chloride on *Enterococcus faecalis* Adhesion to Dentin. *Int J Odontostomatol.* 2020;14(4):632–8.

13. Jaramillo DE, Arriola A, Safavi K, Chávez De Paz LE. Decreased bacterial adherence and biofilm growth on surfaces coated with a solution of benzalkonium chloride. *J Endod.* 2012;38(6):821–5.

14. Baron A, Lindsey K, Sidow SJ, Dickinson D, Chuang A, McPherson JC. Effect

- of a Benzalkonium Chloride Surfactant-Sodium Hypochlorite Combination on Elimination of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* [Internet]. 2016;42(1):145–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2015.08.035>
15. Moraes LC, Só MVR, Da Silva Dal Pizzol T, Ferreira MBC, Montagner F. Distribution of genes related to antimicrobial resistance in different oral environments: A systematic review. *J Endod*. 2015;41(4):434–41.
 16. Lang PM, Jacinto RC, Dal Pizzol TS, Ferreira MBC, Montagner F. Resistance profiles to antimicrobial agents in bacteria isolated from acute endodontic infections: systematic review and meta-analysis. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2016;48(5):467–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.08.018>
 17. Shin JM, Luo T, Lee KH, Guerreiro D, Botero TM, McDonald NJ, et al. Deciphering Endodontic Microbial Communities by Next-generation Sequencing. *J Endod* [Internet]. 2018;44(7):1080–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2018.04.003>
 18. Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gade ã-Neto CR, Sousa ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, et al. Knowledge of the nature of the endodontic microbiota depends upon the recognition of those microorganisms present in the root canal system of teeth with necrotic pulp Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* *Oral Microbiol Immunol* 71±76 ß Blackwell Munksgaard. 2004;19(19).
 19. Ruksakiet K, Hanák L, Farkas N, Hegyi P, Sadaeng W, Czumbel LM, et al. Antimicrobial Efficacy of Chlorhexidine and Sodium Hypochlorite in Root Canal

Disinfection: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *J Endod*. 2020;46(8):1032-1041.e7.

20. García-Rubio A, Bujaldón-Daza AL, Rodríguez-Archilla A. Periapical lesions. Diagnosis and treatment. *Av Odontoestomatol*. 2015;31(1):31–42.

21. Zhang C, Du J, Peng Z. Correlation between *Enterococcus faecalis* and Persistent Intraradicular Infection Compared with Primary Intraradicular Infection: A Systematic Review. *J Endod* [Internet]. 2015;41(8):1207–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2015.04.008>

22. Siddiqui SH, Awan KH, Javed F. Bactericidal efficacy of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis* in infected root canals: A systematic literature review. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2013;10(4):632–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2013.07.006>

23. Alghamdi F, Shakir M. The Influence of *Enterococcus faecalis* as a Dental Root Canal Pathogen on Endodontic Treatment: A Systematic Review. *Cureus*. 2020;12(3):1–10.

24. Rodríguez-Niklitschek C, Oporto V GH. Clinical implications of *Enterococcus faecalis* microbial contamination in root canals of devitalized teeth: Literature review. *Rev Odontológica Mex*. 2015;19(3):e177–82.

25. Varela P. Eficacia de diferentes sistemas de irrigación en conductos radiculares instrumentados con una lima reciprocante. 2016;170.

26. Siqueira JF, Rqas N, Favieri A. Chemomechanical Reduction of the Bacterial Population in the Root Canal after Instrumentation and Irrigation with 1 %, Hypochlorite. 2000;26(6).

27. Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. 2008;329–41.
28. Jowkar Z, Hamidi SA, Shafiei F, Ghahramani Y. The effect of silver, zinc oxide, and titanium dioxide nanoparticles used as final irrigation solutions on the fracture resistance of root-filled teeth. *Clin Cosmet Investig Dent*. 2020;12:141–8.
29. Bukhari S, Kim D, Liu Y, Karabucak B, Koo H. Novel Endodontic Disinfection Approach Using Catalytic Nanoparticles. *J Endod* [Internet]. 2018;44(5):806–12. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.12.003>
30. Sánchez-Sanhueza G, Fuentes-Rodríguez D, Bello-Toledo H. Copper Nanoparticles as Potential Antimicrobial Agent in Disinfecting Root Canals: A Systematic Review. *Int J Odontostomatol*. 2016;10(3):547–54.
31. Campos Ibarra P, De la Fuente Hernández J, Tenorio Rocha F, Acosta Torres L. Irrigantes y selladores-nanopartículas biocompatibles antimicrobianos para uso en Endodoncia. *Entreciencias Diálogos en la Soc del Conoc*. 2013;1(1):7.
32. Zhao S, Sun D, Zhang J, Lu H, Wang Y, Xiong R, et al. Actuation and biomedical development of micro-/nanorobots – A review. *Mater Today Nano*. 2022;18(September).
33. van Riet TCT, Chin Jen Sem KTH, Ho JPTF, Spijker R, Kober J, de Lange J. Robot technology in dentistry, part one of a systematic review: literature characteristics. *Dent Mater* [Internet]. 2021;37(8):1217–26. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.dental.2021.06.001>
34. Yang J, Zhang C, Wang XD, Wang WX, Xi N, Liu LQ. Development of micro- and nanorobotics: A review. *Sci China Technol Sci*. 2019;62(1):1–20.

35. Molina M. Ficha de datos de seguridad Ficha de datos de seguridad. Carl Roth [Internet]. 2017;2(1907):2–7. Available from: https://hybris-static-assets-production.s3-eu-west-1.amazonaws.com/sys-master/pdfs/h96/hc3/9673630253086/EN_ST-WB-MSDS-2601489-1-1-1.PDF
36. Kim Y, Youn H, Kim J, Lee D, Go S, Park JE, et al. Potential use of 3-(Trimethoxysilyl)propyldimethyl octadecyl ammonium chloride as an antimicrobial and antiviral agent for the disinfection of personal protective equipment. *Clin Exp Vaccine Res.* 2020;9(2):174–8.
37. MINISTERIO DE SALUD. RESOLUCION NUMERO 8430 DE 1993 (Octubre 4). *Biomedica.* 2012;32(4):471–3.
38. Holland R, De Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PFE, Dezan E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod.* 1999;25(3):161–6.
39. Guijarro Góngora Shirley Yessenia. UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR CARRERA DE ODONTOLOGÍA del hipoclorito de sodio a diferentes temperaturas , sólo y combinado con agitación. *Univ Cent Del Ecuador Carrera Odontol.* 2017;28–78.
40. Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *J Endod* [Internet]. 2011;37(10):1380–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2011.06.018>
41. Rico-Romano C, Zubizarreta-Macho Á, Baquero-Artigao MR, Mena-Álvarez J. An analysis in vivo of intracanal bacterial load before and after chemo-mechanical

preparation: A comparative analysis of two irrigants and two activation techniques. J Clin Exp Dent. 2016;8(1):e9–13.

42. Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative Evaluation of Endodontic Irrigants against *Enterococcus faecalis* Biofilms. J Endod. 2006;32(6):527–31.

43. Del Carpio-Perochena AE, Bramante CM, Duarte MAH, Cavenago BC, Villas-Boas MH, Graeff MS, et al. Biofilm dissolution and cleaning ability of different irrigant solutions on intraorally infected dentin. J Endod [Internet]. 2011;37(8):1134–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2011.04.013>

44. Vianna ME, Gomes BPFA, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, De Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004;97(1):79–84.

45. De Almeida AP, Souza MA, Miyagaki DC, Dal Bello Y, Cecchin D, Farina AP. Comparative evaluation of calcium hypochlorite and sodium hypochlorite associated with passive ultrasonic irrigation on antimicrobial activity of a root canal system infected with *Enterococcus faecalis*: An in vitro study. J Endod [Internet]. 2014;40(12):1953–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2014.08.025>

46. Kim S, Thiessen PA, Bolton EE, Chen J, Fu G, Gindulyte A, et al. PubChem substance and compound databases. Nucleic Acids Res. 2016;44(D1):D1202–13.

47. Świercz R, Hałatek T, Wąsowicz W, Kur B, Grzelińska Z, Majcherek W. Pulmonary irritation after inhalation exposure to benzalkonium chloride in rats. Int J Occup Med Environ Health. 2008;21(2):157–63.

48. Nikawa H, Ishida K, Hamada T, Satoda T, Murayama T, Takemoto T, et al.

Immobilization of octadecyl ammonium chloride on the surface of titanium and its effect on microbial colonization in vitro. Dent Mater J. 2005;24(4):570–82.

49. Bukiet F, Couderc G, Camps J, Tassery H, Cuisinier F, About I, et al. Wetting properties and critical micellar concentration of benzalkonium chloride mixed in sodium hypochlorite. J Endod. 2012;38(11):1525–9.

50. Verma P, Tordik P, Nosrat A. Hazards of Improper Dispensary: Literature Review and Report of an Accidental Chloroform Injection. J Endod [Internet]. 2018;44(6):1042–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2018.02.024>

51. Carlos Enrique Flores Hidalgo. Joel Omar Reyes Velásquez. Conductos laterales y accesorios. Una realidad en la cavidad endodóntica. J Endod [Internet]. 2000;VOL II(4):127–34. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0099239908011655%5Cnhttp://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009923990700564X%5Cnhttp://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0099239911014683%5Cnhttp://www.fodonto.uncu.edu.ar/upload/articul>

ANEXO 1. Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACION DE DIENTES NATURALES PARA ESTUDIO

La Facultad de Odontología de INSTITUCION UNIVERSITARIA COLEGIOS DE COLOMBIA (UNICOC), da la educación necesaria para diagnosticar y tratar enfermedades de la boca y los dientes. Realiza investigaciones que se publican en revistas científicas, se presenta en congresos y cursos a los alumnos de la Facultad. Parte de las investigaciones que se realizan, utilizan los dientes que se extraen por indicación del odontólogo y/o especialista porque el diente no se puede mantener en boca.

A través de este documento, queremos solicitar la donación de su o sus dientes extraídos para utilizarlos en educación e investigación.

Con el o los diente que usted dona realizaremos:

1. **Estudios Histopatológicos:** Se refiere a los estudios que detallan las características del diente cuando es visto con un microscopio. Se puede investigar sobre la parte dura del diente (esmalte, dentina y cemento), como también sobre el nervio (pulpa dental) del diente.
2. **Estudios de Biomateriales:** Se refiere al estudio de los materiales utilizados para realizar las obturaciones o restauración y rehabilitación de los dientes.
3. **Estudios de caries:** Estudios acerca del avance y efectos de la caries en la estructura del diente.
4. **Estudios de Biología celular:** Son estudios que investigan las células que componen el diente y la pulpa dental.

Si usted **NO** desea que se utilice su diente o dientes para algún tipo de estudio en especial o para ningún tipo de estudio, lo puede indicar y su decisión será respetada.

Si usted **SI** desea donar su o sus dientes para investigación, se pueden almacenar por un tiempo indefinido.

La donación del diente o los dientes será anónima, es decir, no se podrá identificar de quien es el o los dientes. A sí mismo, no se pagará ni se darán incentivos por el o los dientes que sean donados para investigación.

Toda investigación que se realice contará con la revisión del **Comité de Ética de Investigación Odontológica de UNICOC Facultad de Odontología**, que se encarga de revisar todos los protocolos de investigación que se realizan con tejidos de seres humanos o animales y se preocupa por que se protejan los derechos de quienes participan en las investigaciones.

Marque con **X** el cuadro que corresponda

☐	NO deseo donar mi(s) diente(s) y quiero que sea(n) descartado(s)
☐	SI deseo donar mi(s) diente(s) para educación e investigación

He leído la información o se me ha leído. He tenido la oportunidad de hacer preguntas las cuales han sido contestadas satisfactoriamente. Consiento de manera voluntaria donar mi diente o mis dientes de la manera y para los propósitos indicados anteriormente.

Nombre del paciente:

Firma del paciente o acudiente y documento:

Numero de dientes donados:

Firma y sello profesional que realiza la extracción:

Fecha y lugar:

Anexo 2. Instrumento de recolección de datos

INSTRUMENTO DE RECOLECCION DE INFORMACION



EFFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA CONTRA *ENTEROCOCCUS Faecalis* DE LA NANOPARTÍCULABIOSPADA 60. VS NAOCL AL 5.25%. ESTUDIO IN VITRO

Parámetros control de irrigante y crecimiento bacteriano

Muestra número: _____

CONTROL CRECIMIENTO POSITIVO CEPA *E. faecalis* _____

CONTROL NEGATIVO CRECIMIENTO CEPA *E. faecalis* _____

EFFECTIVIDAD PROTOCOLO DE IRRIGACION CON NAOCL AL 5.25% CONTRA
CEPA *E. faecalis* _____

EFFECTIVIDAD PROTOCOLO IRRIGACION CON NANOPARTICULA
BIOSPADA 60 CONTRA *E. Faecalis* _____

EFFECTIVIDAD DE PROTOCOLO DE IRRIGACION CON NAOCL Y BIOSPADA
60 CONTRA CEPA *E. Faecalis* _____

Anexo 3. Fotografías de los cultivos y Laboratorio



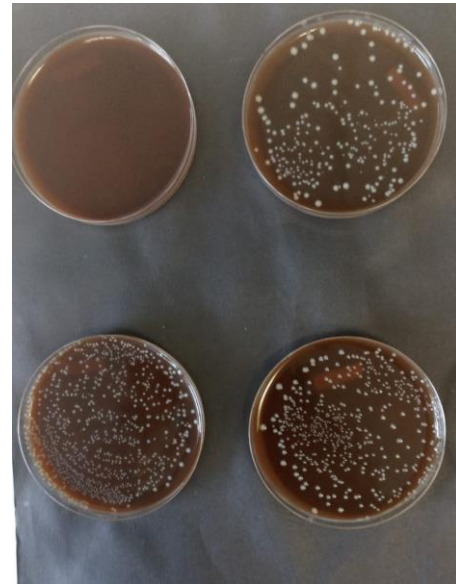
*Fotografía 1. Fotografía grupo control
hipoclorito*



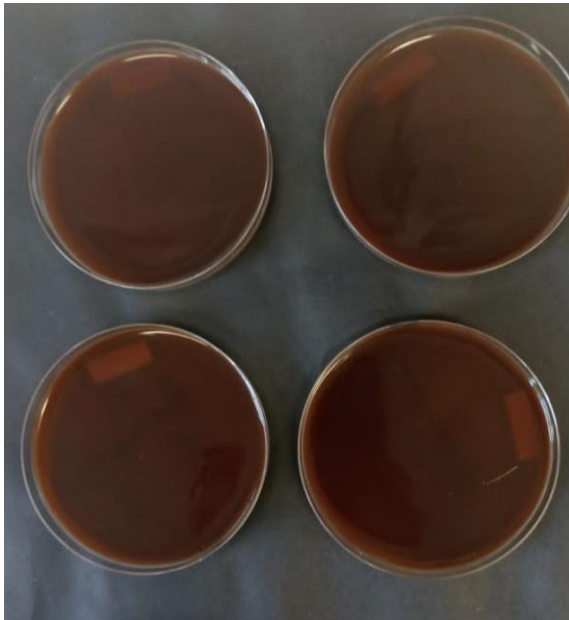
Fotografía 2. Fotografía grupo



Fotografía 3. Fotografía Biospada Lima Tubo



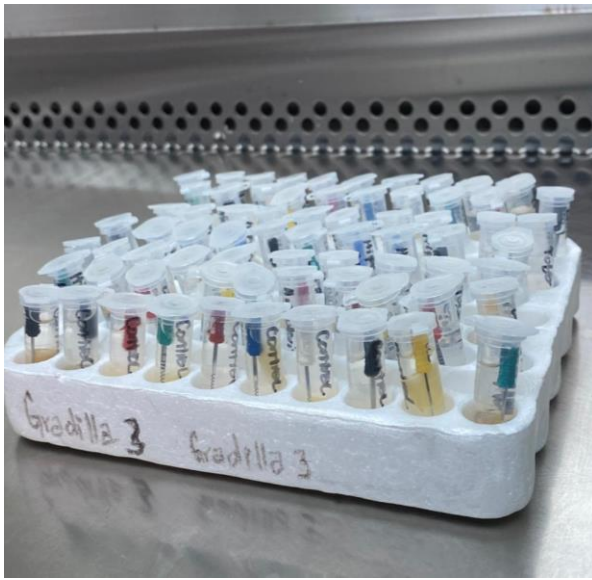
Fotografía 4. Fotografía Biospada



Fotografía 5. Hipoclorito+ Biospada lima



Fotografía 6. Recolección de muestra



Anexo 4. ficha técnica del BIOSPADA 60



Technical Data Sheet

Name: BIOSPADA PLUS 60
Producer and supplier of active ingredient: Katan Technologies.
Emergency phone: (USA) 1-800-535-5053 INFOTRAC.
Street Address: 999 Vanderbilt Beach Road, #200.
City, State, Zip: Naples, FL 34108, USA.
Phone: (USA) 1 800 236 7785.

Specifications:

INGREDIENTS	PERCENTAGE
3-(Trihydroxysilyl)propyl dimethyl octadecyl ammonium chloride	<0,61%
Alkyl (C60%C14, 25%C12, 15%C16) dimethylbenzyl ammonium chloride/ Didecyl dimethyl ammonium chloride	<0,38%
Octyl decyl dimethyl ammonium chloride/ Dioctyl dimethyl ammonium chloride	<0,25%
Other Ingredient	<98,76%
TOTAL	100,0%

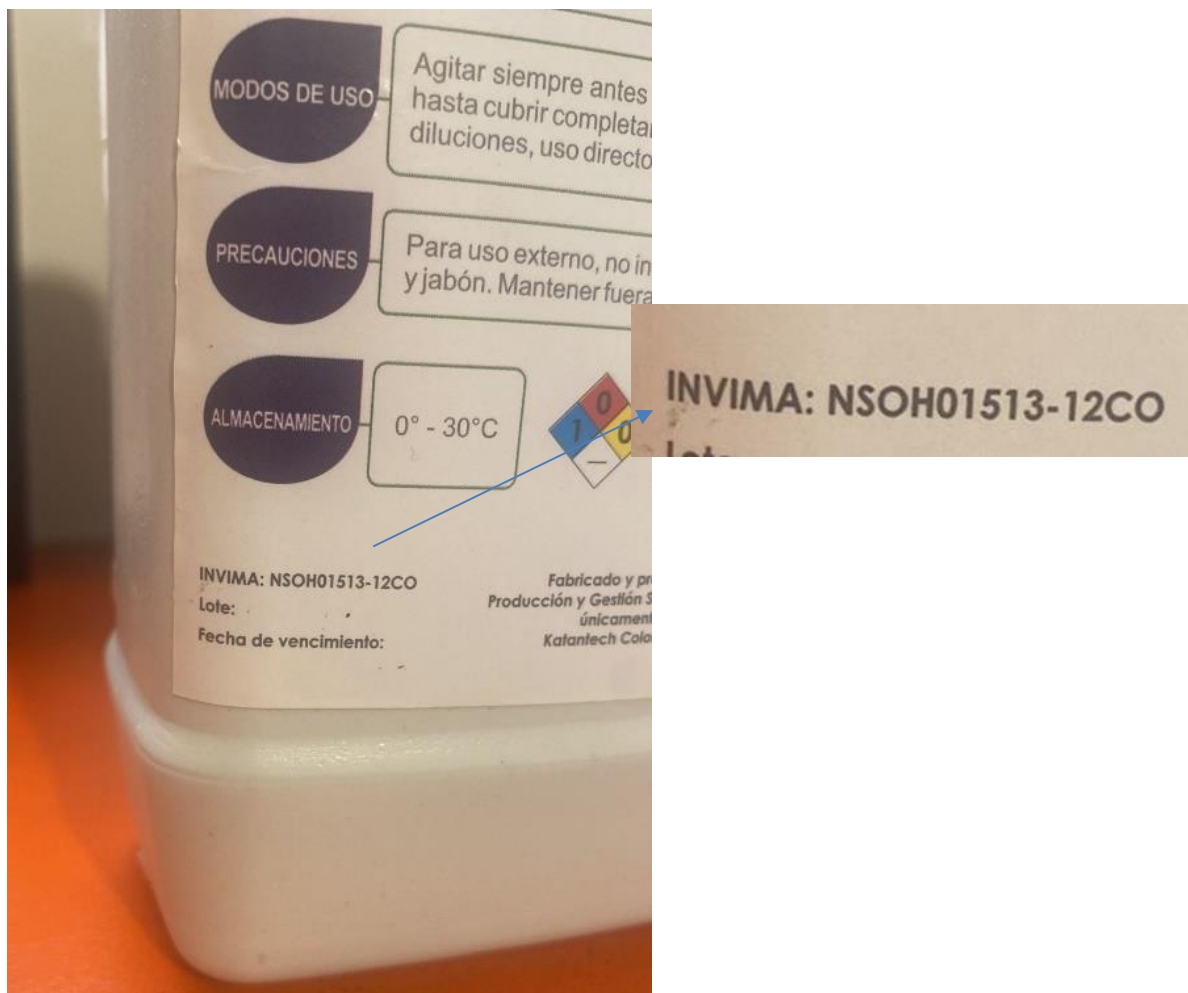
Note: These are approximate descriptions for general information only.

Appearance: Clear liquid to clear-milky
Color: Clear
Odor: None
Solubility in Water: Soluble
pH: 6-10

Katan Technologies
6 Raffles Quay, #24-04, Singapore 048580

1 800 236 7785
info@katantech.com

Anexo 5. INVIMA DEL BIOSPADA 60



Anexo 6. Incubadora Lab-Line 403



ESPECIFICACIONES:

Energía	240 V, 50/60 Hz, 1,7 A, 400 W
Volumen	5,1 pies cúbicos pie
Temperatura	Ambiente +5°C a 65°C
Estabilidad de temperatura	±1,2 °C a 37 °C
Uniformidad de temperatura	±1,3 °C a 37 °C
Peso	90 libras (40,82 kg.)

Anexo 7. Cabina de seguridad biológica clase II de tipo 2-a



Anexo 8. Vortex V-1 Plus



Anexo 9. METALIZADOR DESK® IV



Anexo 10 . Microscopio de barrido de electrones y de haz de iones focalizado FE-MEB LYRA3 de TESCAN. El MEB tiene integrado un sistema de microanálisis por espectroscopía de dispersión de energía de rayos X, EDS (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy). el cual nos permite obtener un espectro con los diferentes elementos químicos que pueda contener el área analizada y un porcentaje relativo de cada uno de ellos

