



**Universidad de Granada  
Facultad de Odontología  
Departamento de Estomatología**

**Susceptibilidad de *Enterococcus faecalis* a  
soluciones irrigadoras de uso endodóntico**

**M<sup>a</sup> Teresa Arias Moliz  
Granada 2009**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: María Teresa Arias Moliz  
D.L.: GR. 2080-2009  
ISBN: 978-84-692-2733-6



Departamento de Estomatología  
Facultad de Odontología  
Universidad de Granada

## Susceptibilidad de *Enterococcus faecalis* a soluciones irrigadoras de uso endodóntico

Memoria presentada por la Licenciada en Odontología Doña M<sup>a</sup> Teresa Arias Moliz  
para aspirar al Grado de Doctor



Dra. D<sup>a</sup> Pilar Baca García  
Catedrática de Odontología Preventiva y Comunitaria  
Departamento de Estomatología  
Universidad de Granada



Dra. D<sup>a</sup> Carmen M<sup>a</sup> Ferrer Luque  
Profesora Titular de Patología y Terapéutica Dental  
Departamento de Estomatología  
Universidad de Granada



Dr. D. Miguel Espigares García  
Catedrático de Medicina Preventiva y Salud Pública  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Granada



La Doctoranda  
M<sup>a</sup> Teresa Arias Moliz

Granada a 9 de marzo de 2009



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Estomatología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada durante los años 2005-2009, dentro del Grupo de Investigación "Microbiología, Inmunología, Epidemiología y Prevención de las Enfermedades Bucodentales", CTS 167.

La Doctoranda ha disfrutado de una beca de Formación de Personal Docente e Investigador de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía dentro del Plan Andaluz de Investigación.



## **AGRADECIMIENTOS**

Al finalizar esta Tesis Doctoral, quiero expresar mi agradecimiento a las personas que, de un modo u otro, han contribuido a su realización.

A los directores de este trabajo, la Dra. Pilar Baca García, Dra. Carmen M<sup>a</sup> Ferrer Luque y Dr. Miguel Espigares García, por su incalculable ayuda, disponibilidad y orientación. Ha sido un privilegio trabajar con vosotros durante esta etapa formativa de mi vida.

Al Dr. José Liébana Ureña, por iniciarme en los conocimientos de Microbiología y brindarme la oportunidad de introducirme en esta Ciencia.

A la Dra. Paloma González Rodríguez, Dra. Elena Espigares Rodríguez y Dra. Concepción Jiménez López, por sus comentarios científicos, disponibilidad y colaboración técnica.

Al personal técnico, César Criado Sánchez, Yudi Gómez Villaescusa y, muy especialmente, a Francisca Castillo Pérez, sin cuya ayuda, amistad y ánimo no hubiera sido posible llevar a cabo esta Tesis.

A todos los compañeros y profesores del Departamento de Estomatología, Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública y Departamento de Microbiología que, en algún momento, me ayudaron.

Al personal de microscopía electrónica del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Especialmente a Alicia, Conchi y David.

Dedico todo mi esfuerzo y trabajo a Raúl, por estar siempre ahí apoyándome, y a mi familia. A mi padre por su ejemplo de vida, a mi madre por el ánimo y comprensión y a mis hermanos por su paciencia.



# **INDICE**



<b>1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	1
<b>2. REVISIÓN DOCTRINAL</b>	7
2.1. <i>E. faecalis</i> como patógeno del sistema de conductos radiculares	9
2.1.1. <i>Enterococcus faecalis</i>	9
2.1.2. Prevalencia de <i>E. faecalis</i> en infecciones del conducto radicular	11
2.1.3. Formas de crecimiento	12
2.2. Soluciones irrigadoras en la terapia endodóntica	15
2.2.1. Hipoclorito sódico	19
2.2.2. Clorhexidina	17
2.2.3. EDTA	18
2.2.4. Ácido cítrico	18
2.2.5. Ácido fosfórico	19
2.2.6. Otras soluciones	20
2.3. Actividad antimicrobiana de las soluciones irrigadoras frente a <i>E. faecalis</i> en suspensión	21
2.4. Actividad antimicrobiana de las soluciones irrigadoras frente a biopelículas de <i>E. faecalis</i>	27
2.5. Agentes surfactantes	30
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	33
3.1. Cepa bacteriana	35
3.2. Medios de cultivo	35
3.3. Conservación de la bacteria	36
3.4. Soluciones irrigadoras	36
3.5. Neutralizantes	38
3.6. Determinación de la concentración mínima bactericida de las soluciones irrigadoras frente <i>E. faecalis</i> en suspensión	41
3.6.1. Preparación de la suspensión bacteriana	42
3.6.2. Ensayo del neutralizante	44
3.6.3. CMB de las soluciones	45
3.7. Determinación de la concentración mínima bactericida de las soluciones irrigadoras frente <i>E. faecalis</i> en suspensión, en función del tiempo	46
3.7.1. Control de esterilidad	47
3.8. Determinación de la concentración mínima para erradicar biopelículas de <i>E. faecalis</i> de las soluciones irrigadoras: hipoclorito sódico, clorhexidina, edta y ácidos cítrico y fosfórico	48
3.8.1. Formación de las biopelículas de <i>E. faecalis</i>	50
3.8.2. Determinación de curva de crecimiento	52
3.8.3. Equivalencia de las biopelículas	52

3.8.4. Test de susceptibilidad a las soluciones irrigadoras	52
3.9. Determinación de la concentración mínima para erradicar biopelículas de <i>E. faecalis</i> de clorhexidina, cetrimida y las combinaciones de ambos.	55
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>57</b>
4.1. Eficacia de los neutralizantes frente a las diferentes soluciones irrigadoras	59
4.2. Concentración mínima bactericida de las soluciones irrigadoras frente <i>E. faecalis</i> en suspensión	59
4.3. Concentración mínima bactericida de las soluciones irrigadoras frente <i>E. faecalis</i> en suspensión en función del tiempo de exposición	60
4.4. Caracterización de las biopelículas por microscopía electrónica	63
4.5. Curva de crecimiento de la biopelícula de <i>E. faecalis</i>	65
4.6. Equivalencia de las biopelículas	66
4.7. Concentración mínima para erradicar biopelículas de <i>E. faecalis</i> de las soluciones irrigadoras: hipoclorito sódico, clorhexidina, edta y ácidos cítrico y fosfórico	67
4.7.1. Evolución de las densidades ópticas	69
4.8. Concentración mínima para erradicar biopelículas de <i>E. faecalis</i> de clorhexidina, cetrimida y las combinaciones de ambos	73
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>77</b>
5.1. <i>Enterococcus faecalis</i>	79
5.2. Soluciones irrigadoras	79
5.3. Estudio de la cmb	80
5.3.1. Validez interna del estudio	80
5.3.2. Capacidad bactericida de las soluciones irrigadoras frente a <i>E. faecalis</i> en suspensión	81
5.2. Estudio de la mceb	88
5.2.1. Validez interna del estudio	88
5.2.3. Capacidad bactericida de las soluciones frente a biopelículas de <i>E. faecalis</i>	90
<b>6. CONCLUSIÓN</b>	<b>99</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>103</b>
<b>8. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA</b>	<b>115</b>
ANEXO I	119
ANEXO II	125





# **1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**



Los microorganismos constituyen un factor etiológico fundamental en el desarrollo y progresión de la enfermedad pulpar y periapical<sup>1</sup>. Las infecciones endodónticas primarias tienen un carácter mixto y están constituidas principalmente por cocos anaerobios gramnegativos, a diferencia de las infecciones secundarias de las que se aíslan pocas especies, siendo *Enterococcus faecalis* la más importante<sup>2</sup>. Su habilidad para crecer formando biopelículas es una de las características más importantes que le permite resistir a la terapia endodóntica<sup>3,4,5,6</sup>.

El éxito del tratamiento endodóntico implica una adecuada limpieza y desinfección del complejo sistema de conductos radiculares y, por lo tanto, la eliminación de los microorganismos. Esto se lleva a cabo mediante la instrumentación e irrigación. La instrumentación de los conductos radiculares tiene dos objetivos fundamentales, la limpieza y la conformación de las paredes del sistema de conductos. Sin embargo, con independencia de la técnica empleada, la instrumentación sólo elimina parte de su contenido ya que los instrumentos no pueden alcanzar las múltiples irregularidades de la anatomía interna radicular. Por tanto, para la limpieza y desinfección de las paredes de los conductos principales y de todos los laterales y accesorios es necesaria la irrigación. Los objetivos de la irrigación son: disolver el tejido pulpar vital o necrótico; limpiar las paredes de los conductos para eliminar los residuos que las cubren y taponan la entrada de los túbulos dentinarios; eliminar las bacterias y neutralizar sus productos tóxicos; lubricar los instrumentos para facilitar su paso y capacidad de corte.

Las propiedades de las soluciones irrigadoras son importantes a la hora de conseguir el éxito en el tratamiento de la patología endodóntica. Se ha demostrado ampliamente que utilizar soluciones irrigadoras con propiedades antimicrobianas es determinante para reducir los microorganismos del conducto radicular infectado<sup>7,8,9</sup>.

Han sido muchas las soluciones irrigadoras propuestas para su uso en endodoncia, y la gran mayoría han sido testadas *in vitro* para conocer su actividad frente a bacterias en suspensión o

---

<sup>1</sup> Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;20:340-9.

<sup>2</sup> Haapasalo M, Ranta H, Ranta KT. Facultative gram-negative enteric rods in persistent periapical infections. *Acta Odontol Scand* 1983;41:19-22.

<sup>3</sup> George S, Kisben A, Song KP. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2005;31:867-72.

<sup>4</sup> Distel J, Hatton J, Gillespie J. Biofilm Formation in Medicated Root Canals. *J Endod*, 2002;28:689-93.

<sup>5</sup> Hubble T, Hatton J, Nallapareddy S, Gillespie M. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding proein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:121-6.

<sup>6</sup> Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, Moles DR, Spratt DA. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *J Endod* 2005;31:30-6.

<sup>7</sup> Siqueira JF Jr, Rôças IN, Santos SR, Lima KC, Magalhães FA, de Uzeda M. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. *J Endod* 2002;28:181-4.

<sup>8</sup> El Karim I, Kennedy J, Hussey D. The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:560-9.

<sup>9</sup> Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod* 2006;32:389-98.

planctónicas<sup>10</sup>. Sin embargo, esta forma de crecimiento no representa las condiciones reales ya que las bacterias se organizan formando biopelículas en las paredes de los conductos radiculares<sup>11</sup>. Esto podría tener una repercusión clínica importante ya que se ha demostrado que las bacterias que crecen en biopelículas pueden ser hasta mil veces más resistentes a los antimicrobianos que cuando lo hacen en suspensión<sup>12</sup>. Por este motivo, los estudios más recientes se han dirigido a evaluar la eficacia de las soluciones irrigadoras frente a biopelículas microbianas<sup>13,14,15,16,17,18,19</sup> de modo que estos resultados se acercarán más a una realidad clínica de comportamiento.

Actualmente, la solución irrigadora de elección es el hipoclorito de sodio (NaOCl) debido, por una parte, a su capacidad bactericida frente a microorganismos planctónicos y en biopelículas<sup>20</sup> y, por otra parte, a su capacidad para disolver el tejido orgánico, tanto vital como necrótico<sup>21,22</sup>. No obstante, la posible toxicidad de este agente, en casos de extrusión periapical accidental<sup>23,24</sup>, ha llevado a algunos autores como White y cols.<sup>25</sup> a proponer la clorhexidina (CLX) como alternativa por varios motivos: propiedades antibacterianas frente a microorganismos en suspensión<sup>26,27,28</sup> y en biopelículas<sup>29,30</sup>, elevada substantividad<sup>31,32</sup>, y poca o nula toxicidad<sup>33</sup>.

---

<sup>10</sup> El Karim I, Kennedy J, Hussey D. The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:560-9.

<sup>11</sup> Ramachandran Nair PN. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod* 1987;13:29-39.

<sup>12</sup> Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284:1318-22.

<sup>13</sup> Giardino L, Ambu E, Savoldi E, Rimondini R, Cassanelli C, Debbia EA. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of sodium hypochlorite, MTAD, and Tetraclean against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod* 2007;33:852-5.

<sup>14</sup> Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod* 2006;32:527-31.

<sup>15</sup> Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms *in vitro*. *J Endod* 2006;32:434-7.

<sup>16</sup> Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. *In vitro* antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J* 2006;39:878-85.

<sup>17</sup> Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, Moles DR, Spratt DA. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *J Endod* 2005;31:30-6.

<sup>18</sup> Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K. An *in vitro* evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *Int Endod J* 2001;34:300-7.

<sup>19</sup> Lima KC, Fava LR, Siqueira JF Jr. Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* biofilms to some antimicrobial medications. *J Endod* 2001;27:616-9.

<sup>20</sup> Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, Moles DR, Spratt DA. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *J Endod* 2005;31:30-6.

<sup>21</sup> Byström A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J* 1985;18:35-40.

<sup>22</sup> Gomes BPPA, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2001;34:424-8.

<sup>23</sup> Hülsmann M, Hahn W. Complications during root canal irrigation: literature review and case reports. *Int Endod J* 2000;33:186-93.

<sup>24</sup> Hales JJ, Jackson CR, Everett AP, Moore SH. Treatment protocol for the management of a sodium hypochlorite accident during endodontic therapy. *Gen Dent*. 2001;49:278-81.

<sup>25</sup> White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod* 1997;23:229-31.

<sup>26</sup> Siqueira JF Jr, Batista MM, Fraga RC, de Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod* 1998;24:414-6.

Igualmente, el proceso de irrigación del sistema de conductos radiculares requiere el uso de forma conjunta y alternada de soluciones ácidas y quelantes tales como, la sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), el ácido cítrico y el ácido fosfórico. La actividad principal de estas soluciones es eliminar los restos de materia inorgánica de los conductos radiculares instrumentados<sup>34</sup> y facilitar la adhesión de selladores endodónticos basados en resina<sup>35,36</sup>. Sin embargo, se conoce poco sobre su posible actividad frente a los microorganismos del sistema de conductos en cualquier forma de crecimiento. Centrándose en la bacteria *E. faecalis*, la solución más estudiada ha sido EDTA, la cual ejerce mínima actividad frente a cultivos de *E. faecalis* en suspensión<sup>37,38</sup> o en biopelículas<sup>39</sup>. La actividad antimicrobiana del ácido cítrico ha sido demostrada sólo frente a suspensiones de *E. faecalis*<sup>40,41</sup> desconociéndose su eficacia frente a biopelículas. La capacidad del ácido fosfórico para eliminar los microorganismos del conducto radicular no ha sido estudiada.

Recientemente, se han desarrollado soluciones irrigadoras que contienen, además de antimicrobianos, agentes surfactantes que modifican la tensión superficial del compuesto. Es el caso de BioPure MTAD<sup>®</sup> (Dentstply Tulsa Dental, Tulsa, OK, USA), Smear Clear<sup>®</sup> (SybronEndo, Orange, CA, USA), Cetrexidin<sup>®</sup> (GABA Vebas, San Giuliano Milanese, Italia), Chlor-XTRa<sup>®</sup> y CHX-Plus<sup>®</sup> (Vista Dental Products, Racine, WI, USA), entre otros. El bromuro de cetil-trimetil

---

<sup>27</sup> Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K. An *in vitro* evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *Int Endod J* 2001;34:300-7.

<sup>28</sup> Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, 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;97:79-84.

<sup>29</sup> Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. *In vitro* antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J* 2006;39:878-85.

<sup>30</sup> Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod* 2006;32:527-31.

<sup>31</sup> Parsons GJ, Patterson SS, Miller CH, Katz S, Kafrawy AH, Newton CW. Uptake and release of chlorhexidine by bovine pulp and dentin specimens and their subsequent acquisition of antibacterial properties. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1980;49:455-9.

<sup>32</sup> Dametto FR, Ferraz CC, de Almeida Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. *In vitro* assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99:768-72.

<sup>33</sup> Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod* 1994;20:276-8.

<sup>34</sup> Pérez-Heredia M, Ferrer-Luque CM, González-Rodríguez MP. The effectiveness of different acid irrigating solutions in root canal cleaning after hand and rotary instrumentation. *J Endod* 2006;32:993-7.

<sup>35</sup> Saleh IM, Ruyter IE, Haapasalo M, Ørstavik D. The effects of dentine pretreatment on the adhesion of root-canal sealers. *Int Endod J* 2002;35:859-66.

<sup>36</sup> Hayashi M, Takahashi Y, Hirai M, Iwami Y, Imazato S, Ebisu S. Effect of endodontic irrigation on bonding of resin cement to radicular dentin. *Eur J Oral Sci* 2005;113:70-6.

<sup>37</sup> Torabinejad M, Shabahang S, Aprecio RM, Kettering JD. The antimicrobial effect of MTAD: an *in vitro* investigation. *J Endod* 2003;29:400-3.

<sup>38</sup> Helling I, Chandler NP. Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. *Int Endod J* 1998;31:8-14.

<sup>39</sup> Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, Moles DR, Spratt DA. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *J Endod* 2005;31:30-6.

<sup>40</sup> Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T. Chelation in root canal therapy reconsidered. *J Endod* 2005;31:817-20.

<sup>41</sup> Siqueira JF Jr, Batista MM, Fraga RC, de Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod* 1998;24:414-6.

amonio o cetrimida es un surfactante catiónico que posee propiedades bactericidas<sup>42</sup> y fungicidas<sup>43</sup>. Además, ha demostrado sinergismo con la clorhexidina en el caso del Cetrexidin<sup>®</sup> (clorhexidina 0,2% y cetrimida 0,2%)<sup>44</sup> ya que ambos actúan sobre la pared celular, lo cual nos ha llevado a plantearnos su acción sobre biopelículas de *E. faecalis* utilizando distintas combinaciones de ambos.

El gran interés existente en hallar soluciones irrigadoras que permitan la limpieza y desinfección del sistema de conductos radiculares, mejorando así su posterior sellado y disminuyendo las posibilidades de reinfección radicular, nos ha llevado a plantearnos los siguientes objetivos en el presente trabajo de Tesis Doctoral:

1. Determinar la concentración mínima bactericida del hipoclorito sódico, clorhexidina, EDTA, ácido cítrico y ácido fosfórico frente a *E. faecalis* ATCC 29212 en suspensión tras 5 minutos de exposición.
2. Evaluar el tiempo necesario para ejercer actividad bactericida frente a una suspensión de *E. faecalis*, de las siguientes soluciones:
  - Hipoclorito sódico 0,5%, 1%, 2,5% y 5,25%
  - Clorhexidina 0,12%, 0,2% y 2%
  - EDTA 17%
  - Ácido cítrico 10% y 25%
  - Ácido fosfórico 2,5% y 5%.
3. Determinar la concentración mínima para erradicar biopelículas de *E. faecalis* de hipoclorito sódico, clorhexidina y tres soluciones quelantes: EDTA, ácido cítrico y ácido fosfórico, tras 1, 5 y 10 minutos de exposición.
4. Establecer la concentración mínima para erradicar biopelículas de *E. faecalis* de soluciones de clorhexidina y de cetrimida, solas o combinadas a distintas concentraciones, tras 30 segundos, 1 y 2 minutos de exposición.

---

<sup>42</sup> Cloete TE, Jacobs L, Brözel VS. The chemical control of biofouling in industrial water systems. *Biodegradation* 1998;9:23-37.

<sup>43</sup> Vieira DB, Carmona-Ribeiro AM. Cationic lipids and surfactants as antifungal agents: mode of action. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:760-7.

<sup>44</sup> Onçağ O, Hoşgör M, Hilmioğlu S, Zekioğlu O, Eronat C, Burhanoglu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *Int Endod J* 2003;36:423-32.

## **2. REVISIÓN DOCTRINAL**



## 2.1. *E. faecalis* como patógeno del sistema de conductos radiculares

### 2.1.1. *Enterococcus faecalis*

El término "enterococo" fue utilizado por primera vez en 1899 por Thiercelin, para referirse a un diplococo grampositivo encontrado en el intestino humano. En el mismo año, MacCallun y Hastings describieron un caso de endocarditis atribuido a un microorganismo que ellos llamaron *Micrococcus zymogenes*, y que posteriormente se identificó como un enterococo hemolítico<sup>45</sup>.

La denominación de *Streptococcus faecalis* fue acuñada por Andrewes y Horder<sup>46</sup> en 1906, para designar a un microorganismo aislado de un paciente con endocarditis, aludiendo el nombre específico a su hábitat, el intestino. Desde entonces, se han mantenido diferentes opiniones sobre la clasificación de esta bacteria que han estado relacionadas con la polémica en torno a la clasificación del género *Streptococcus*. Hasta comienzos de los 80, parte de los microorganismos del grupo D de Lancefield fueron designados como enterococos, término que englobaba a las especies de *S. faecalis*, *S. faecium*, *S. avium*, *S. gallinarum* y algunas otras menos aceptadas. En 1984, Schleifer y Kilpper-Bälz<sup>47</sup> propusieron la inclusión de las especies *S. faecalis* y *S. faecium* en un nuevo grupo, el género *Enterococcus*. Estudios quimiotaxonómicos llevados a cabo con posterioridad permitieron asignar a dicho género otras especies pertenecientes al grupo D: *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum* y *E. malodoratus*<sup>48</sup>, así como otras descritas más tarde (*E. hirae*, *E. mundtii*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus* y *E. solitarius*).

Actualmente se reconocen formalmente 32 especies de *Enterococcus*, estableciéndose cinco grupos en función a la interacción con el manitol, sorbitol y arginina.

Los enterococos son cocos grampositivos que se visualizan como células aisladas, en parejas o bien en cadenas cortas. Son anaerobios facultativos, ya que, aunque carecen de catalasa, poseen superóxido dismutasa y peroxidasa que eliminan el O<sub>2</sub> y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente, que se generan en condiciones de aerobiosis<sup>49</sup>. Catabolizan una gran variedad de fuentes energéticas incluyendo carbohidratos, glicerol, lactato, malato, citrato, arginina, agmatina, y α-ceto ácidos<sup>50</sup>. Los enterococos sobreviven en condiciones ambientales muy adversas, de modo

<sup>45</sup> Sherman JM. The streptococci. *Bacteriol Rev* 1937;1:3-97.

<sup>46</sup> Andrewes EW, Horder TJ. A study of the streptococci pathogenic for man. *Lancet* 1906;11:708-13,775-82.

<sup>47</sup> Schleifer KH, Kilpper-Bälz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1984;34:31-4.

<sup>48</sup> Collins MD, Jones D, Farrow JAE, Kilpper-Balz R, Schleifer KH. *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1984 34: 220-3.

<sup>49</sup> Piard JC, Desmazeaud M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. I. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait* 1992;71:525-41.

<sup>50</sup> 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;32:93-8.

que soportan niveles de pH de 9,6 así como elevadas concentraciones de cloruro sódico (NaCl)<sup>51</sup>. Son resistentes a sales biliares, detergentes, metales pesados, etanol, azida y a la desecación<sup>52</sup>. Crecen entre 10 y 45 °C y sobreviven a 60 °C durante 30 minutos<sup>53</sup>.

*E. faecalis* es la especie más representativa y significativa del género *Enterococcus*. Constituye un patógeno oportunista implicado en la persistencia de la infección, influyendo en el pronóstico del tratamiento de conductos. Se aísla frecuentemente en infecciones endodónticas refractarias<sup>54</sup> gracias a una amplia variedad de factores de virulencia, entre los que se incluyen: enzimas líticos, citolisina, sustancia de agregación, feromonas y ácidos lipoteicoicos<sup>55</sup>. Puede adherirse a las células del hospedador y expresar proteínas que compiten con otras células alterando la respuesta del mismo<sup>56,57</sup>. Además, *E. faecalis* es capaz de suprimir la acción de los linfocitos lo cual contribuye potencialmente al fracaso del tratamiento de conductos<sup>58</sup>. Sin embargo, la resistencia de esta bacteria no depende tanto de sus factores de virulencia como de su capacidad para sobrevivir y persistir como patógeno en el interior de los conductos radiculares<sup>59</sup>, lo que consigue por diversos motivos:

- Presenta una amplia variedad de polimorfismos genéticos<sup>60</sup>.
- Produce gelatinasa y proteína de unión al colágeno (Ace) que le ayuda a unirse a la dentina<sup>61</sup>.
- Su tamaño es lo suficientemente pequeño como para invadir así como vivir en los túbulos dentinarios<sup>62</sup>.
- Puede subsistir largas temporadas de escasez de nutrientes y utilizar el suero como fuente de alimento<sup>63</sup>. Además, el suero procedente del hueso alveolar y del ligamento periodontal le sirve de ayuda para unirse al colágeno tipo I<sup>64</sup>.

---

<sup>51</sup> Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:2622-36.

<sup>52</sup> 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;32:93-8.

<sup>53</sup> Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:2622-36.

<sup>54</sup> Haapasalo M, Ranta H, Ranta KT. Facultative gram-negative enteric rods in persistent periapical infections. *Acta Odontol Scand* 1983;41:19-22.

<sup>55</sup> Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004;30:315-20.

<sup>56</sup> Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004;30:315-20.

<sup>57</sup> Love RM. *Enterococcus faecalis*: a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001;34:399-405.

<sup>58</sup> Lee W, Lim S, Son HH, Bae KS. Sonicated extract of *Enterococcus faecalis* induces irreversible cell cycle arrest in phytohemagglutinin-activated human lymphocytes. *J Endod* 2004;30:209-12.

<sup>59</sup> Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004;30:315-20.

<sup>60</sup> Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB. Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:95-101.

<sup>61</sup> Hubble TS, Hatton JF, Nallapareddy SR, Murray BE, Gillespie MJ. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:121-6.

<sup>62</sup> Love RM. *Enterococcus faecalis*: a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001;34:399-405.

<sup>63</sup> Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:234-9.

<sup>64</sup> Love RM. *Enterococcus faecalis*: a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001;34:399-405.

- Resiste a la medicación intraconducto con hidróxido de calcio durante más de 10 días en el interior de los túbulos<sup>65,66</sup>.
- Por último, crece formando biopelículas siendo hasta 1000 veces más resistentes a la fagocitosis, anticuerpos y antimicrobianos que cuando crece en forma planctónica<sup>67</sup>.

### 2.1.2. Prevalencia de *E. faecalis* en infecciones del conducto radicular

*E. faecalis* es un microorganismo que forma parte de la microbiota del hombre y se encuentra comúnmente en la cavidad oral. La prevalencia de *E. faecalis* es mayor en pacientes que están recibiendo un tratamiento o retratamiento endodóntico, en comparación con aquellos que no están siendo tratados<sup>68</sup>. Se aísla tanto en infecciones endodónticas primarias como en secundarias o persistentes<sup>69</sup>. En las infecciones primarias se encuentra entre un 4 y 40% y su presencia se asocia más a periodontitis apicales crónicas asintomáticas que a periodontitis apicales agudas y abscesos periapicales. La presencia de *E. faecalis* en infecciones endodónticas secundarias es 9 veces mayor que en las primarias, y la prevalencia oscila entre 24 - 77%<sup>70,71,72,73,74,75,76,77,78</sup>. Este amplio rango se debe, entre otros, a las diferentes pruebas de identificación y al tamaño de la muestra. En la mayoría de estos estudios, la identificación se ha llevado a cabo mediante técnicas de cultivo y la prevalencia con estos medios ha sido entre un 24 - 70%. Otros autores han usado técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) siendo la prevalencia del enterococo mayor (67 - 77%) debido a que son técnicas más sensibles, más rápidas y seguras que los cultivos. La mayor prevalencia en dientes con fracasos endodónticos pone de manifiesto su habilidad para sobrevivir en condiciones

<sup>65</sup> Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 1990;6:142-9.

<sup>66</sup> Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987;66:1375-9.

<sup>67</sup> Distel J, Hattori J, Gillespie J. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod*, 2002;28:689-93.

<sup>68</sup> Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB. Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:95-101.

<sup>69</sup> Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004;30:315-20.

<sup>70</sup> Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998;31:1-7.

<sup>71</sup> Sundqvist G, Fidor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:86-93.

<sup>72</sup> Peculiene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *J Endod* 2000;26:593-5.

<sup>73</sup> Peculiene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeast and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J* 2001;34:429-34.

<sup>74</sup> Hancock HH, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91:579-86.

<sup>75</sup> Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003;36:1-11.

<sup>76</sup> Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:100-3.

<sup>77</sup> Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:71-6.

<sup>78</sup> Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004;30:315-20.

ambientales duras como las existentes en dichas situaciones. Además, *E. faecalis* ha sido encontrado con frecuencia como el único microorganismo presente en conductos obturados con lesiones periapicales<sup>79</sup>.

### 2.1.3. Formas de crecimiento

Dependiendo de las condiciones ambientales, una misma bacteria puede crecer sésil, adherida a una superficie o de forma planctónica. Durante décadas, el estudio de la actividad antimicrobiana de las soluciones irrigadoras frente a los microorganismos implicados en la infección endodóntica se ha llevado a cabo utilizando cultivos planctónicos o en suspensión. Este cultivo tradicional se basa en la inoculación de una bacteria en un caldo, en el que las bacterias disponen de oxígeno y alimento de manera uniforme. En estas condiciones óptimas de crecimiento, las bacterias se encuentran nadando libremente en el medio líquido. Sin embargo, estas condiciones no reflejan las circunstancias reales en que las bacterias crecen, ya que se organizan formando biopelículas en las paredes de los conductos radiculares<sup>80</sup>. Posiblemente, la primera identificación de biopelículas en conductos infectados se deba a Nair<sup>81</sup> quien examinó el contenido de los conductos radiculares de 31 dientes, que tenían caries coronales y procesos inflamatorios periapicales, mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). En ellos observó poca homogeneidad junto a la presencia de agregados densos de microorganismos pegados a las paredes del conducto, formando delgadas capas. Los espacios entre los microorganismos estaban rellenos de un material amorfo que fue interpretado como una matriz extracelular de origen bacteriano. Cuando esto ocurría, las condensaciones bacterianas mostraban una estructura en empalizada similar a la placa dental.

En la actualidad está bien establecido que el estilo de vida bacteriano más común en los ambientes naturales es aquel en que las bacterias se adhieren a una superficie formando una estructura conocida como biopelícula, donde encuentran las necesidades fundamentales para su desarrollo<sup>82,83</sup>. De hecho, se considera que las bacterias que no se encuentren formando parte de una biopelícula constituyen la fase inicial de la formación de otra en una nueva superficie<sup>84</sup>. Por lo tanto, podemos hablar de biopelícula o *biofilm*, en su término anglosajón, como una estructura compleja formada por agregados celulares y huecos intersticiales, adherida a un material o interfase que puede ser de naturaleza abiótica o biótica. Los microorganismos que

---

<sup>79</sup> Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003;36:1-11.

<sup>80</sup> Ramachandran Nair PN. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod* 1987;13:29-39.

<sup>81</sup> Ramachandran Nair PN. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod* 1987;13:29-39.

<sup>82</sup> Decho, A. Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research* 2000;20:1257-73.

<sup>83</sup> Danese P, Pratt L, Kolter R. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol* 2000;182:3593-6.

<sup>84</sup> Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* 2000;182:2675-9.

componen la biopelícula están unidos por una matriz de polímeros extracelulares (EPS, *Exo-Polymeric Substance*) que son producidos y excretados por ellos mismos<sup>85</sup>.

En la biopelícula, la comunicación célula a célula es esencial en el desarrollo y mantenimiento de la misma. La adherencia de una bacteria a una superficie es una señal para la expresión de genes específicos de la biopelícula. Estos genes codifican proteínas que sintetizan moléculas que actúan como señales para la unión célula a célula y, el inicio de la formación de polisacáridos. A medida que se van acumulando, estas moléculas actúan como agentes quimiotácticos e inductores de un mecanismo denominado “percepción del quórum” (*quórum sensing*) dando lugar a la biopelícula.

Las funciones que ejercen los EPS son:

1. Permitir, establecer y mantener asociaciones entre microorganismos y entre éstos y su medio ambiente<sup>86</sup>.
2. Constituyen una fuente de reserva de energía y carbono<sup>87,88</sup>.
3. Protegen a las exoenzimas, enzimas secretadas por la bacteria que no están en contacto directo con la membrana celular, y cuya función es la de hidrolizar moléculas orgánicas de alto peso molecular<sup>89</sup>.
4. Actúan como protector ya que los exopolisacáridos confieren a la célula bacteriana una protección frente a la desecación, dada la capacidad de estos polímeros de retener agua<sup>90,91</sup>.
5. Se comportan como una esponja donde quedan atrapadas y concentradas moléculas orgánicas e iones del medio acuoso. Este proceso favorece la concentración de nutrientes bacterianos en el interior de la biopelícula<sup>92,93</sup>.
6. Confieren a la célula protección frente a agentes antimicrobianos.

En este sentido, las bacterias que forman parte de las biopelículas son considerablemente más resistentes a agentes tóxicos que como célula individual, principalmente por diversos factores:

---

<sup>85</sup> Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284:1318-22.

<sup>86</sup> Decho, A. Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research* 2000;20:1257-73.

<sup>87</sup> Decho, A. Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research* 2000;20:1257-73.

<sup>88</sup> Liu H, Herbert HP, Fang HP Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *J. Biotechnol* 2002;95:249-56.

<sup>89</sup> Hoppe HG. Microbial extracellular enzyme activity: a new key parameter in aquatic ecology. En: *Microbial Enzymes in Aquatic Environments*. Springer. Berlin;1991:60-83.

<sup>90</sup> Whitfield C, Valvano MA. Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in gram-negative bacteria. *Adv Microb Physiol* 1993;35:135-246.

<sup>91</sup> Potts M. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol Rev* 1994;58:755-805.

<sup>92</sup> Decho, A. Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research* 2000;20:1257-73.

<sup>93</sup> Guibaud G, Tixier N, Bouju A, Baudu M. Relation between extracellular polymers' composition and its ability to complex Cd, Cu and Pb. *Chemosphere* 2003;52:1701-10.

1. La biopelícula como tal, es una barrera física que impide la difusión de agentes tóxicos. El mecanismo propuesto de resistencia es que la matriz crea un impedimento para que el agente antimicrobiano difunda hasta las bacterias<sup>94</sup>.
2. El número de bacterias concentradas en una biopelícula es muy superior y ofrece la posibilidad de liberar enzimas en concentraciones mayores a las que podrían ser liberadas en medio libre; estas enzimas serían las responsables de modificar los agentes microbianos y transformarlos a formas no tóxicas.
3. Desde el punto de vista químico, la biopelícula posee grupos químicos que por sí solos neutralizan al agente antimicrobiano.
4. El bajo nivel metabólico en una biopelícula aumenta la resistencia contra agentes biocidas debido a que la principal función no es multiplicarse, sino asegurar la persistencia de la biopelícula, lo que supone aunar esfuerzos para contrarrestar aquello que le es tóxico<sup>95</sup>.
5. Los microorganismos que coexisten en un mismo hábitat ponen en marcha la maquinaria genética capaz de neutralizar el agente microbiano, de forma que incluso se puede llegar a decir que se produce un cambio en el fenotipo de la biopelícula<sup>96</sup>.

La capacidad de *E. faecalis* para crecer formando biopelículas en las paredes del conducto radicular ha sido demostrada *in vitro*, lo que le confiere mayor resistencia a la terapia endodóntica<sup>97,98,99,100</sup>. De este modo, tiene la habilidad de sobrevivir a los procedimientos de desinfección químico-mecánica, resistir a las medicaciones intraconducto y/o adaptarse a un ambiente en el cual la disponibilidad de nutrientes es limitada o escasa<sup>101</sup>, pudiendo permanecer remanente en un conducto adecuadamente obturado. No obstante, bajo estas condiciones, los microorganismos residuales que habitan los túbulos dentinarios son frecuentemente confinados a un espacio reducido por los materiales de obturación y, están expuestos a unas condiciones de crecimiento adversas. Sin embargo, si el conducto radicular está pobremente obturado o el cemento sellador se disuelve, se formarán intersticios y llegarán nutrientes necesarios para el crecimiento microbiano, favoreciendo la formación de biopelículas. En dientes sobreobturados, el

---

<sup>94</sup> Stewart PS, Grab L, Diemer JA. Analysis of biocide transport limitation in an artificial biofilm system. *J Appl Microbiol* 1998;85:495-500.

<sup>95</sup> Huang CT, Yu FP, McFeters GA, Stewart PS. Nonuniform spatial patterns of respiratory activity within biofilms during disinfection. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:2252-6.

<sup>96</sup> Cloete TE. Resistance mechanism of bacteria to antimicrobial compounds. *Int Biodeterioration Biodegradation* 2003;51:277-82.

<sup>97</sup> George S, Kisben A, Song KP. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2005;31:867-72.

<sup>98</sup> Distel J, Hatton J, Gillespie J. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod*, 2002;28:689-93..

<sup>99</sup> Hubble TS, Hatton JF, Nallapareddy SR, Murray BE, Gillespie MJ. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:121-6.

<sup>100</sup> Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, Moles DR, Spratt DA. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *J Endod* 2005;31:30-6.

<sup>101</sup> Siqueira JF Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J* 2001;34:1-10.

sellador alrededor del foramen apical podría no solidificar y disolverse por el contacto con el fluido periapical. Los microorganismos remanentes, entre ellos *E. faecalis*, pueden colonizar el espacio dejado por el sellador y consecuentemente formar biopelículas extrarradiculares a través de la extrusión de gutapercha<sup>102</sup>. La filtración bacteriana no sólo ocurre por vía apical, sino también por vía coronal como sucede cuando existen defectos en el sellado marginal de las restauraciones, infección periodontal así como traumatismos dentales que conllevan una fractura del diente.

## 2.2. Soluciones irrigadoras en la terapia endodóntica

Los microorganismos constituyen el factor etiológico principal para el desarrollo de la enfermedad pulpar y periapical<sup>103,104</sup>. Kakehashi y cols.<sup>105</sup> afirmaron que tras la exposición pulpar en molares de ratas, la aparición de patología pulpar y periapical se producía sólo ante la presencia de bacterias en la cavidad oral. Por ello, el objetivo máximo del tratamiento endodóntico es eliminar la infección del sistema de conductos radiculares y prevenir la reinfección<sup>106,107</sup>.

Existen factores locales y sistémicos que contribuyen al fracaso del tratamiento endodóntico<sup>108</sup>. Sin embargo, el factor decisivo que influye en el resultado de dicho tratamiento a largo plazo es la persistencia de microorganismos dentro del sistema de conductos<sup>109,110,111,112</sup>, ya que representan un riesgo latente para que el tratamiento fracase y se perpetúe la inflamación perirradicular<sup>113,114</sup>. Los microorganismos remanentes pueden encontrarse en las complejidades

<sup>102</sup> Takemura N, Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Noguchi N, Ebisu S. Single species biofilm-forming ability of root canal isolates on gutta-percha points. *Eur J Oral Sci* 2004;112:523-9.

<sup>103</sup> Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Takemura N, Ebisu S. Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis. *J Endod* 2002;28:679-83.

<sup>104</sup> Nair PN, Sjögren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod* 1990;16:580-8.

<sup>105</sup> Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;20:340-9.

<sup>106</sup> Nair PN, Sjögren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod* 1990;16:580-8.

<sup>107</sup> Haapasalo M, Endal U, Zandi H, Coil J. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. *Endod Topics* 2005;10:77-102.

<sup>108</sup> Nair PN, Sjögren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod* 1990;16:580-8.

<sup>109</sup> Siqueira JF Jr, Lopes HP. Bacteria on the apical root surfaces of untreated teeth with periradicular lesions: a scanning electron microscopy study. *Int Endod J* 2001;34:216-20.

<sup>110</sup> Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Takemura N, Ebisu S. Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis. *J Endod* 2002;28:679-83.

<sup>111</sup> Sjogren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod* 1990;16:498-504.

<sup>112</sup> Nair PN, Sjögren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod* 1990;16:580-8.

<sup>113</sup> Siqueira JF Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J* 2001;34:1-10.

<sup>114</sup> Sjogren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod* 1990;16:498-504.

anatómicas del sistema de conductos como las ramificaciones apicales, istmos, túbulos dentinarios y otras irregularidades, que son inaccesibles a la instrumentación mecánica.

La importancia de usar una solución irrigadora con actividad antimicrobiana durante el tratamiento de conductos radiculares es conocida<sup>115</sup>. El hipoclorito sódico y la clorhexidina son las soluciones irrigadoras con acción antimicrobiana más usadas en endodoncia; sin embargo, estas no eliminan el componente inorgánico del barrillo dentinario que se crea con la instrumentación mecánica. Por ello se utilizan junto a soluciones ácidas y quelantes como el EDTA y los ácidos cítrico y fosfórico, entre otros. Las propiedades principales de estas soluciones irrigadoras están resumidas en la Tabla 1.

Tabla 1. Resumen de las soluciones irrigadoras frecuentemente usadas en endodoncia.

Compuesto (concentraciones recomendadas)	Tipo	Actividad antimicrobiana sobre suspensión	Actividad antimicrobiana sobre biopelículas	Disolución de tejido	Eliminación del barrillo dentinario	Biocompatibilidad
NaOCl (0,5% - 6%)	Compuesto halogenado	+++	+++	+++	++ sobre compuestos orgánicos	d.d.c.
CLX (0,2% - 2%)	Bisguanida catiónica	++	++	-	-	++
EDTA (10% - 17%)	Quelante	+	+	-	++ sobre compuestos inorgánicos	++
Ácido cítrico (10% - 50%)	Ácido orgánico	+	i.n.d.	-	+++ sobre compuestos inorgánicos	++
Ácido fosfórico (5% - 37%)	Ácido inorgánico	i.n.d.	i.n.d.	-	++ sobre compuestos inorgánicos	i.n.d.

-. ausente o mínima; +: baja; ++: media; +++: elevada; d.d.c.: depende de la concentración; i.n.d.: información no disponible.

Tabla de elaboración propia adaptada de Zehnder y cols.<sup>116</sup>

### 2.2.1. Hipoclorito sódico

Es la solución irrigadora más empleada para la irrigación del conducto radicular. Se trata de un compuesto halogenado cuyas funciones primordiales son disolver los restos de tejido pulpar, siendo efectivo sobre tejido vital y necrosado, así como destruir bacterias neutralizando sus metabolitos y productos antigénicos<sup>117</sup>. Además de poseer un amplio espectro antibacteriano es

<sup>115</sup> Siqueira JF Jr, Rôças IN, Santos SR, Lima KC, Magalhães FA, de Uzeda M. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. J Endod 2002;28:181-4.

<sup>116</sup> Zehnder M. Root canal irrigants. J Endod 2006;32:389-98.

<sup>117</sup> Byström A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. Int Endod J 1985;18:35-40.

esporicida y viricida<sup>118</sup>, barato y altamente disponible. Estas características llevaron a Cunningham y cols.<sup>119</sup> en 1980, a proponerlo como el irrigante más eficaz.

Una de sus mayores desventajas es que no elimina la capa de barrillo dentinario<sup>120,121</sup>.

Se ha utilizado a concentraciones variables, desde 0,5% a 6%. El aumento de concentración incrementa sus propiedades solventes y antibacterianas, pero también aumenta el efecto tóxico si alcanza el periápice<sup>122</sup>.

Existen numerosas investigaciones acerca de la actividad antimicrobiana del hipoclorito de sodio frente a microorganismos en suspensión y en biopelículas. Algunas defienden su uso a concentraciones elevadas<sup>123</sup>, a pesar de su toxicidad, mientras que otras demuestran su eficacia a concentraciones más bajas<sup>124</sup>.

### 2.2.2. Clorhexidina

La clorhexidina es una molécula bicatiónica que actúa adsorbiéndose a la pared celular del microorganismo, destruye la integridad de la membrana citoplásmica y origina la pérdida de los componentes intracelulares. Es efectiva frente a gran número de bacterias orales, principalmente frente a las grampositivas y en menor medida frente a las gramnegativas<sup>125</sup>. No es viricida ni esporicida, y su actividad frente a los hongos es relativa. Es activa entre pH 5 y 8. Su acción es rápida y duradera debido a la substantividad<sup>126</sup>, siendo inferior en presencia de materia orgánica. Es menos tóxica para el tejido periapical que otras soluciones irrigadoras empleadas en endodoncia, como el hipoclorito sódico<sup>127</sup>. Estas propiedades hacen que sea uno de los irrigantes propuestos en la terapia de conductos radiculares.

<sup>118</sup> McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:147-79.

<sup>119</sup> Cunningham WT, Balekjian AY. Effect of temperature on collagen-dissolving ability of sodium hypochlorite endodontic irrigant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1980;49:175-7.

<sup>120</sup> Baumgartner JC, Cuenin PR. Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. *J Endod* 1992;18:605-12.

<sup>121</sup> Garberoglio R, Becce C. Smear layer removal by root canal irrigants. A comparative scanning electron microscopic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;78:359-67.

<sup>122</sup> Jiménez-Rubio A, Segura JJ, Llamas R, Jiménez-Planas A, Guerrero JM, Calvo JR. In vitro study of the effect of sodium hypochlorite and glutaraldehyde on substrate adherence capacity of macrophages. *J Endod* 1997;23:562-4.

<sup>123</sup> Carson KR, Goodell GG, McClanahan SB. Comparison of the antimicrobial activity of six irrigants on primary endodontic pathogens. *J Endod* 2005;31:471-3.

<sup>124</sup> Zehnder M, Kosicki D, Luder H, Sener B, Waltimo T. Tissue-dissolving capacity and antibacterial effect of buffered and unbuffered hypochlorite solutions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94:756-62.

<sup>125</sup> Emilson CG. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. *Scand J Dent Res* 1977;85:255-65.

<sup>126</sup> White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod* 1997;23:229-31.

<sup>127</sup> Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod* 1994;20:276-8.

Sin embargo, la clorhexidina es incapaz de disolver restos de tejido necrótico<sup>128</sup>, tratándose ésta de una propiedad esencial para una solución irrigadora.

Para la irrigación del conducto radicular se han probado concentraciones de 0,12%, 0,2%, y 2%, entre otras.

### 2.2.3. EDTA

El EDTA es un agente quelante, introducido por su capacidad de reblandecer la dentina y favorecer el tratamiento de conductos estrechos y calcificados gracias a su propiedad de sustraer iones calcio de la misma<sup>129</sup>. Sin embargo, se ha comprobado que su mejor acción consiste en favorecer la eliminación de la capa residual<sup>130</sup> permitiendo que otras soluciones irrigadoras accedan al interior de los túbulos dentinarios<sup>131</sup>. Las concentraciones de EDTA más usadas son del 10 - 17%, con un pH de 5 - 7.

Su actividad antibacteriana es controvertida pudiéndose afirmar que es limitada sobre bacterias en suspensión<sup>132,133,134</sup> y en biopelículas<sup>135</sup>. Además, se ha descrito que posee actividad antifúngica<sup>136,137,138</sup>, que se atribuye a su capacidad de quelación ya que los iones calcio juegan un papel importante en la morfogénesis y patogénesis de *Candida albicans*.

### 2.2.4. Ácido cítrico

El ácido cítrico, ácido orgánico tricarboxílico, es una solución irrigadora que pertenece al grupo de los quelantes, ya que extrae iones calcio de la dentina reblandeciéndola, y favorece la instrumentación de conductos estrechos y calcificados. Tiene la capacidad de eliminar la capa de

---

<sup>128</sup> Naenni N, Thoma K, Zehnder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. J Endod 2004;30:785-7.

<sup>129</sup> Nygaard-Østby B. Chelation in root canal therapy. Odontol Tidskr 1957;65:3-11.

<sup>130</sup> Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T. Chelation in root canal therapy reconsidered. J Endod 2005;31:817-20.

<sup>131</sup> Byström A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. Int Endod J 1985;18:35-40.

<sup>132</sup> Ørstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. Endod Dent Traumatol 1990;6:142-9.

<sup>133</sup> Helling I, Chandler NP. Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. Int Endod J 1998;31:8-14.

<sup>134</sup> Torabinejad M, Shabahang S, Apicco RM, Kettering JD. The antimicrobial effect of MTAD: an *in vitro* investigation. J Endod 2003;29:400-3.

<sup>135</sup> Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, Moles DR, Spratt DA. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. J Endod 2005;31:30-6.

<sup>136</sup> Sen BH, Akdeniz BG, Denizci AA. The effect of ethylenediamine-tetraacetic acid on *Candida albicans*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2000;90:651-5.

<sup>137</sup> Grawehr M, Sener B, Waltimo T, Zehnder M. Interactions of ethylenediamine tetraacetic acid with sodium hypochlorite in aqueous solutions. Int Endod J 2003;36:411-7.

<sup>138</sup> Ates M, Akdeniz BG, Sen BH. The effect of calcium chelating or binding agents on *Candida albicans*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2005;100:626-30.

barrillo dentinario. Para este fin son efectivas concentraciones de ácido cítrico del 10, 25 y 50%<sup>139,140,141</sup>. Es un compuesto biológicamente más aceptable que otros ácidos<sup>142</sup> por lo que es menos tóxico para el tejido periapical.

Se ha demostrado que posee actividad antimicrobiana frente a bacterias del conducto radicular<sup>143,144,145,146,147</sup>, pero su actividad sobre biopelículas es desconocida.

### 2.2.5. Ácido fosfórico

El ácido fosfórico fue introducido por Buonocore<sup>148</sup> en 1955 para el pretratamiento del esmalte y la dentina con el objetivo de favorecer la adhesión de las resinas acrílicas a la estructura dental. Es un acondicionador dentinario ampliamente utilizado en operatoria dental en la práctica clínica diaria. Se ha demostrado que elimina la capa de barrillo dentinario originada tras la instrumentación de los conductos radiculares<sup>149,150,151</sup> y, al igual que el EDTA y el ácido cítrico, el pretratamiento de la dentina con este ácido aumenta la adhesión de los selladores endodónticos basados en resina<sup>152,153</sup>. Además es efectivo en la descalcificación de la dentina del conducto radicular<sup>154</sup>. Sin embargo, la capacidad antibacteriana frente a bacterias implicadas en la infección endodóntica no ha sido probada.

<sup>139</sup> Ferrer-Luque CM, González López S, Navajas Rodríguez de Mondelo JM. Mechanical instrumentation of the root canals. A study using SEM and computerized image analysis. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol* 1996;39:111-7.

<sup>140</sup> Siqueira JF Jr, Batista MM, Fraga RC, de Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod* 1998;24:414-6.

<sup>141</sup> Haznedaroglu F. Efficacy of various concentrations of citric acid at different pH values for smear layer removal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;96:340-4.

<sup>142</sup> Georgopoulou M, Kontakiotis E, Nakou M. Evaluation of the antimicrobial effectiveness of citric acid and sodium hypochlorite on the anaerobic flora of the infected root canal. *Int Endod J* 1994;27:139-43.

<sup>143</sup> Smith JJ, Wayman BE. An evaluation of the antimicrobial effectiveness of citric acid as a root canal irrigant. *J Endod* 1986;12:54-8.

<sup>144</sup> Georgopoulou M, Kontakiotis E, Nakou M. Evaluation of the antimicrobial effectiveness of citric acid and sodium hypochlorite on the anaerobic flora of the infected root canal. *Int Endod J* 1994;27:139-43.

<sup>145</sup> Yamaguchi M, Yoshida K, Suzuki R, Nakamura H. Root canal irrigation with citric acid solution. *J Endod* 1996;22:27-9.

<sup>146</sup> Siqueira JF Jr, Batista MM, Fraga RC, de Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod* 1998;24:414-6.

<sup>147</sup> Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T. Chelation in root canal therapy reconsidered. *J Endod* 2005;31:817-20.

<sup>148</sup> Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J Dent Res* 1955;34:849-53.

<sup>149</sup> Garberoglio R, Becce C. Smear layer removal by root canal irrigants. A comparative scanning electron microscopic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;78:359-67.

<sup>150</sup> Ayad MF. Effects of rotary instrumentation and different etchants on removal of smear layer on human dentin. *J Prosthet Dent* 2001;85:67-72.

<sup>151</sup> Pérez-Heredia M, Ferrer-Luque CM, González Rodríguez MP. The effectiveness of different acid irrigating solutions in root canal cleaning after hand and rotary instrumentation. *J Endod* 2006;32:993-7.

<sup>152</sup> Saleh IM, Ruyter IE, Haapasalo M, Ørstavik D. The effects of dentine pretreatment on the adhesion of root-canal sealers. *Int Endod J* 2002;35:859-66.

<sup>153</sup> Hayashi M, Takahashi Y, Hirai M, Iwami Y, Imazato S, Ebisu S. Effect of endodontic irrigation on bonding of resin cement to radicular dentin. *Eur J Oral Sci* 2005;113:70-6.

<sup>154</sup> Pérez-Heredia M, Ferrer-Luque CM, González Rodríguez MP, Martín-Peinado FJ, González-López S. Decalcifying effect of 15% EDTA, 15% citric acid, 5% phosphoric acid, and 2.5% sodium hypochlorite on root canal dentine. *Int Endod J* 2008;41:418-23.

## 2.2.6. Otras soluciones

Existe una nueva generación de compuestos que incorporan detergentes, ácidos y/o antibióticos, que han sido introducidos como soluciones irrigadoras. Algunos de ellos son:

- BioPure MTAD<sup>®</sup> (Dentsply, Tulsa, OK, USA) formado por una mezcla de doxiciclina (isómero de tetraciclina), ácido cítrico y Tween 80. Entre sus propiedades destacan la capacidad de eliminar el barrillo dentinario<sup>155</sup> y actividad antimicrobiana mayor que la del hipoclorito sódico<sup>156</sup>; su acción sobre biopelículas ha sido cuestionada<sup>157</sup>. Además, ha demostrado ser menos citotóxico que el hipoclorito sódico al 5,25%, EDTA y peróxido de hidrógeno al 3%, y más que concentraciones menores de hipoclorito<sup>158</sup>.

- Tetraclean<sup>®</sup> (Ogna Laboratori Farmaceutici, Milán, Italia) es otra solución cuya composición es similar a BioPure MTAD<sup>®</sup> ya que contiene doxiciclina, ácido cítrico y polipropilenglicol. Es efectivo en la remoción del barrillo dentinario, así como en la eliminación de biopelículas de *E. faecalis*<sup>159</sup>; posee baja tensión superficial, lo que le permite penetrar más fácilmente en el interior de los túbulos dentinarios<sup>160</sup>.

- SmearClear<sup>®</sup> (SybronEndo, Orange, CA, USA) y REDTA<sup>®</sup> contienen una mezcla de EDTA y cetrimida. Ambos poseen propiedades quelantes y antimicrobianas frente a biopelículas de *E. faecalis*<sup>161</sup>.

- Composición parecida es la de EDTAC<sup>®</sup> que posee EDTA y cetavlon (compuesto comercial de cetrimida). Goldberg y cols.<sup>162</sup> sostienen que EDTAC aumenta la permeabilidad dentinaria permitiendo la eliminación de microorganismos y restos orgánicos, así como la penetración de medicamentos en áreas donde la instrumentación mecánica ha sido deficiente, como son los túbulos dentinarios, conductos accesorios y foramen apical.

---

<sup>155</sup>Torabinejad M, Cho Y, Khademi AA, Bakland LK, Shabahang S. The effect of various concentrations of sodium hypochlorite on the ability of MTAD to remove the smear layer. J Endod. 2003;29:233-9.

<sup>156</sup>Torabinejad M, Shabahang S, Aprecio RM, Kettering JD. The antimicrobial effect of MTAD: an *in vitro* investigation. J Endod 2003;29:400-3.

<sup>157</sup>Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms *in vitro*. J Endod 2006;32:434-7.

<sup>158</sup>Zhang W, Torabinejad M, Li Y. Evaluation of cytotoxicity of MTAD using the MTT-tetrazolium method. J Endod 2003;29:654-7.

<sup>159</sup>Giardino L, Ambu E, Savoldi E, Rimondini R, Cassanelli C, Debbia EA. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of sodium hypochlorite, MTAD, and Tetraclean against *Enterococcus faecalis* biofilm. J Endod 2007;33:852-5.

<sup>160</sup>Giardino L, Ambu E, Becce C, Rimondini L, Morra M. Surface tension comparison of four common root canal irrigants and two new irrigants containing antibiotic. J Endod 2006;32:1091-3.

<sup>161</sup>Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. J Endod 2006;32:527-31.

<sup>162</sup>Goldberg F, Abramovich A. Analysis of the effect of EDTAC on the dentinal walls of the root canal. J Endod 1977;3:101-5.

- Cetrexidin<sup>®</sup> (GABA Vebas, San Giuliano Milanese, Italia) que incluye clorhexidina 0,2% y ceftrimida 0,2%, demostró mayor actividad antibacteriana y menor toxicidad que el hipoclorito sódico al 5,25%<sup>163</sup>.

- Recientemente se han introducido Chlor-XTRa<sup>®</sup> y CHX-Plus<sup>®</sup> (Vista Dental Products, Racine, WI)<sup>164</sup>. De acuerdo con el fabricante, Chlor-XTRa contiene hipoclorito sódico, un agente humectante y modificadores de superficie; CHX-Plus incluye clorhexidina y modificadores de superficie para disminuir su viscosidad. La actividad antimicrobiana frente a biopelículas de *E. faecalis* de Chlor-XTRa ha resultado ser similar a la del hipoclorito sódico al 6% y significativamente mejor que la de CHX-Plus.

### 2.3. Actividad antimicrobiana de las soluciones irrigadoras frente a *E. faecalis* en suspensión

La mayor parte de los estudios *in vitro* sobre la capacidad antimicrobiana de las soluciones irrigadoras se han llevado a cabo utilizando suspensiones bacterianas o cultivos planctónicos. En este tipo de trabajos, la efectividad de dichas soluciones ha resultado ser mayor que cuando se han probado frente a biopelículas, debido a la mayor resistencia que éstas ofrecen.

Para la revisión doctrinal, se realizó una búsqueda en *PubMed* (1975 - 2009) con la estrategia *irrigants AND Enterococcus faecalis*. De esta búsqueda se obtuvieron 164 artículos de los se escogieron sólo aquellos que se llevaron a cabo *in vitro* y que estudiaban las soluciones irrigadoras utilizadas en este trabajo de investigación: hipoclorito sódico, clorhexidina, EDTA y ácidos cítrico y fosfórico. A partir de los artículos seleccionados se revisó la bibliografía para completar la revisión. Finalmente, resultaron 20 artículos que se resumen en la Tabla 2, incluyendo las soluciones irrigadoras estudiadas, el material y método empleado y los resultados y conclusiones principales. De los artículos que utilizaron tanto técnicas *in vitro* como *ex vivo* (modelo sobre diente infectado), sólo se detalla el método *in vitro*.

Como se observa en la Tabla 2, existen pocos estudios *in vitro* que evalúen la actividad antibacteriana de las soluciones ácidas frente a *E. faecalis*. En cuanto a los trabajos *ex vivo*, destaca el de Heling y Chandler<sup>165</sup> quienes investigaron la eficacia de distintas soluciones irrigadoras para eliminar *E. faecalis* de conductos radiculares infectados. En sus resultados obtuvieron que la solución de EDTA al 17% no fue efectiva frente a *E. faecalis* ya que no hubo

<sup>163</sup> Onçağ O, Hoşgör M, Hilmioglu S, Zekioglu O, Eronat C, Burhanoglu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *Int Endod J* 2003;36:423-32.

<sup>164</sup> Williamson AE, Cardon JW, Drake DR. Antimicrobial susceptibility of monoculture biofilms of a clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2009;35:95-7.

<sup>165</sup> Heling I, Chandler NP. Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. *Int Endod J* 1998;31:8-14.

diferencias significativas entre ésta y la solución salina. Por otro lado, la actividad de las soluciones ácidas ha sido estudiada frente a microorganismos distintos a *E. faecalis*. Yoshida y cols.<sup>166</sup>, en un estudio clínico, demostraron la actividad antimicrobiana de la solución de EDTA al 15% frente a microorganismos de conductos radiculares infectados. Yamaguchi y cols.<sup>167</sup> mostraron que soluciones de ácido cítrico al 0,5, 1 y 2 M ejercían una mayor acción antibacteriana frente a las bacterias anaerobias facultativas y estrictas probadas que una solución de EDTA 0,5 M. La eficacia del ácido cítrico fue demostrada también a una concentración del 50% en el trabajo *in vitro* de Nikolaus y cols.<sup>168</sup>, encontrando recuentos negativos tras 15 minutos de contacto con microorganismos anaerobios. En lo que respecta al ácido fosfórico, no se encontraron en la literatura científica artículos sobre su actividad antimicrobiana frente a bacterias del conducto radicular. Tan sólo Settembrini y cols.<sup>169</sup> demostraron que el ácido ortofosfórico tenía actividad antimicrobiana frente a microorganismos que habitan comúnmente en la cavidad oral.

---

<sup>166</sup> Yoshida T, Shibata T, Shinohara T, Gomyo S, Sekine I. Clinical evaluation of the efficacy of EDTA solution as an endodontic irrigant. J Endod 1995;21:592-3.

<sup>167</sup> Yamaguchi M, Yoshida K, Suzuki R, Nakamura H. Root canal irrigation with citric acid solution. J Endod 1996;22:27-9.

<sup>168</sup> Nikolaus BE, Wayman BE, Encinas E. The bactericidal effect of citric acid and sodium hypochlorite on anaerobic bacteria. J Endod 1988;14:31-4.

<sup>169</sup> Settembrini L, Boylan R, Strassler H, Scherer W. A comparison of antimicrobial activity of etchants used for a total etch technique. Oper Dent 1997;22:84-8.

Tabla 2. Estudios que evalúan *in vitro* la actividad antimicrobiana de las soluciones irrigadoras NaOCl, CLX, EDTA, ácido cítrico y ácido fosfórico frente a cultivos planctónicos de *E. faecalis*.

Referencia	Soluciones	Material y Métodos	Resultados y Conclusiones
Sassone LM, y cols., 2008 <sup>170</sup> .	NaOCl 1 y 5% CLX 0,12, 0,5 y 1% Ambas con o sin la adición de BSA	Evalúan la actividad antimicrobiana frente a microorganismos, entre ellos <i>Ef</i> ATCC 29212. TCD: las soluciones se expusieron al pellet de <i>Ef</i> durante 5, 15 y 30 min. Se sembraron y, tras incubar, se hicieron recuentos.  TDA: Colocaron discos impregnados con las soluciones en placas inoculadas con <i>Ef</i> . Tras 1 min de exposición, se incubaron y se midieron halos de inhibición. X10.	En TDC, CLX 0,12% no fue efectiva, CLX 0,5% necesitó más de 5 min y CLX 1% y NaOCl 1 y 5% eliminaron <i>Ef</i> a cualquier tiempo.  En TDA, todas las soluciones exhibieron halos de inhibición. En presencia de BSA, CLX 1% fue la solución más efectiva. En ausencia de BSA, NaOCl 5% fue la mejor.
Krause TA, y cols., 2007 <sup>171</sup> .	BioPure MTAD <sup>®</sup> NaOCl 5,25% Doxiciclina 100 mg/ml Ácido cítrico 10%	Comparan el efecto antimicrobiano frente a <i>Ef</i> ATCC 29212 mediante estudio <i>in vitro</i> y <i>ex vivo</i> . En el <i>in vitro</i> utilizaron TDA: colocaron discos de papel impregnados en las soluciones y sus diluciones (1:1, 1:5, 1:10), en placas de TSA sembradas con <i>Ef</i> . Tras 24 h de incubación a 37 °C en anaerobiosis, se midieron los halos de inhibición.	En las tres diluciones, doxiciclina produjo las mayores zonas de inhibición, seguido de BioPure MTAD <sup>®</sup> , que fue significativamente mejor que el NaOCl 5,25%. El ácido cítrico originó los halos de inhibición más pequeños.
Bulacio M de L, y cols., 2006 <sup>172</sup> .	NaOCl 2,5% CLX 0,2% EDTA 17%	Evalúan la CMI y el efecto antibacteriano frente a <i>Ef</i> , <i>in vitro</i> y <i>ex vivo</i> . Para la CMI expusieron suspensión de <i>Ef</i> (0,5 MF) a diluciones seriadas de las soluciones. Para el estudio del efecto antimicrobiano, <i>in vitro</i> , utilizaron el TDA. Las soluciones se inocularon en cilindros excavados en placas de MH con <i>Ef</i> . Se incubaron 24 h a 37 °C y se midieron halos de inhibición.	La CMI de NaOCl y CLX fue del 0,2% y la del EDTA menos del 5%.  Los halos de inhibición fueron: NaOCl 2,5%, 21 mm; CLX 0,2%, 14 mm y EDTA 17%, 20 mm.
Shurrab MY, y cols., 2006 <sup>173</sup> .	CLX 0,05, 0,1, 0,5, 1 y 2% Povidona yodada 0,1, 0,5, 1, 2 y 3%	Evalúan la CMI frente a distintas especies microbianas, entre ellas <i>Ef</i> ATCC 29212. Utilizaron TDA: prepararon suspensión de <i>Ef</i> (0,5 MF) que sembraron en placa con medio MH. Una vez secas, se colocaron gotas de las soluciones y se incubaron 24 h a 30 °C. Los halos de inhibición se clasificaron en zona de inhibición sustancial, débil o nula. X3.	La CMI de CLX fue 0,05% y de povidona yodada del 1%.

<sup>170</sup> Sassone LM, Fidel RA, Murad CF, Fidel SR, Hirata R Jr. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine by two different tests. *Aust Endod J* 2008;34:19-24.

<sup>171</sup> Krause TA, Liewehr FR, Hahn CL. The antimicrobial effect of MTAD, sodium hypochlorite, doxycycline, and citric acid on *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2007;33:28-30.

<sup>172</sup> Bulacio M de L, Cangemi R, Cecilia M, Raiden G. In vitro antibacterial effect of different irrigating solutions on *Enterococcus faecalis*. *Acta Odontol Latinoam* 2006;19:75-80.

<sup>173</sup> Shurrab MY. Antimicrobial efficiency of some antiseptic products on endodontic microflora isolated from gangrenous pulp tissue. *J Contemp Dent Pract* 2006;7:53-62.

Portenier I, y cols., 2006 <sup>174</sup> .	BioPure MTAD® 100, 10 y 1% CLX 0,2, 0,02, y 0,01% CLX/CTR 0,1/0,1 y 0,01/0,01%	Estudian la actividad antimicrobiana frente a <i>Ef</i> A197A y VP3-80, y evalúan el efecto inhibitorio de dentina y BSA. Utilizaron TCD: expusieron el antiséptico a la suspensión bacteriana ( $2 \times 10^8$ ufc/ml) durante 10 sg, 5, 20 y 60 min. Se sembraron y tras 24 h de incubación se hicieron los recuentos. Resultados en porcentaje de supervivencia. X3.	Tras 5 min de exposición a BioPure MTAD® 100% y CLX 0,2% no había bacterias viables. BioPure MTAD® 10% necesitó 20 - 60 min, mientras que BioPure MTAD® 1% y CLX 0,02 y 0,01% no eliminaron la bacteria incluso tras 60 min. La combinación de CLX/CTR mató <i>Ef</i> tras 10 sg.
Zehnder M, y cols., 2005 <sup>175</sup> .	NaOCl 1% EDTA 17% Ácido cítrico 10% Trifosfato sódico 9% ATMA 15% HEBP 7%	Estudian la capacidad quelante y antibacteriana frente a <i>Ef</i> ATCC 29212. Utilizaron el TCD: expusieron las soluciones, solas o combinadas con NaOCl 1% (a una proporción 1:1, 1:10 y 1:100), a suspensión de <i>Ef</i> ( $DO_{600} = 0,778$ ) durante 15 min. Posteriormente se añadieron 10 µl de cada mezcla a TSB. Tras 48 h de incubación a 37 °C se midió la DO en espectrofotómetro.	NaOCl eliminó > 99,9% a dilución 1:100; EDTA inhibió el crecimiento a partir de dilución 1:10 y ácido cítrico a 1:1. Cuando se mezcló EDTA 17% o ácido cítrico 10% con NaOCl 1% se perdió el efecto antibacteriano a la mayor dilución de la mezcla (1:100).
do Amorim CV, y cols., 2004 <sup>176</sup> .	CLX PMC	Determinan la CMI frente a microorganismos, entre ellos un aislamiento clínico de <i>Ef</i> . Crearon suspensión de <i>Ef</i> en solución salina ( $DO_{560} = 0,5$ ). Placas de MH que contenían diluciones de CLX (1,67 µg/ml a 200 µg/ml) o PMC (6,67 µg/ml a 244 µg/ml), se inocularon con la suspensión de <i>Ef</i> . Tras incubar 24 h a 37 °C se midieron los halos de inhibición. X6.	CMI de CLX fue 3,33 µg/ml. CMI de PMC fue 213,33 µg/ml. La mayor CMI de PMC fue frente a <i>Ef</i> .
Radcliffe CE, y cols., 2004 <sup>177</sup> .	NaOCl 0,5, 1, 2,5, 5,25%	Evalúan la actividad antibacteriana frente a distintos microorganismos, entre ellos <i>Ef</i> NCTC 775 y E10e. Utilizaron TCD: crearon suspensión de <i>Ef</i> en FAB que se expuso a las soluciones durante 30 sg, 1, 2, 5, 10 y 30 min. Tras neutralizar se sembraron y se hicieron recuentos. Resultados en logaritmos y porcentaje de supervivencia. X4.	Las soluciones de NaOCl 0,5, 1, 2,5, 5,25% fueron efectivas frente a <i>Ef</i> a niveles inferiores al límite de detección después de 30, 10, 5 y 2 min, respectivamente. Hay relación entre el tiempo de contacto y la concentración usada.
Vianna ME, y cols., 2004 <sup>178</sup> .	CLX 0,2, 1, 2% (gel y líquido) NaOCl 0,5, 1, 2,5, 4, 5,25%	Investigan la actividad antibacteriana frente a microorganismos, entre ellos <i>Ef</i> ATCC 29212. Utilizaron TCD: generaron suspensión de <i>Ef</i> en BHI (0,5 MF) que se expuso a los antimicrobianos 15, 30 y 45 sg, 1, 3, 5, 10, 15, 20 y 30 min, 1 y 2h. Tras neutralizar, se incubaron 7 días a 37 °C, se sembraron y se hicieron recuentos. Resultados en porcentaje de inhibición.	NaOCl 5,25% y CLX 1 y 2% en líquido eliminaron <i>Ef</i> tras 15 sg; CLX 0,2% líquida necesitó 30 sg y CLX 2% gel 1 min. CLX 0,2% gel fue el menos efectivo, requirió 2 h para eliminar los microorganismos; el gel podría prevenir el contacto directo entre éstos y la CLX.

<sup>174</sup> Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. J Endod 2006;32:138-41.

<sup>175</sup> Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T. Chelation in root canal therapy reconsidered. J Endod 2005;31:817-20.

<sup>176</sup> do Amorim CV, Aun CE, Mayer MP. Susceptibility of some oral microorganisms to chlorhexidine and paramonochlorophenol. Braz Oral Res 2004;18:242-6.

<sup>177</sup> Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, Hababah N, Qualtrough A, Worthington H, Drucker DB. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. Int Endod J 2004;37:438-46.

Sassone LM, y cols., 2003 <sup>179</sup> .	NaOCl 1 y 5%, CLX 0,12, 0,5 y 1%  Ambas con o sin la adición de BSA	Evalúan la actividad antimicrobiana frente a <i>Ef</i> ATCC 29212. Utilizaron TCD: crearon suspensión de <i>Ef</i> (10 <sup>9</sup> ufc/ml) en HBSS con BSA. La suspensión se centrifugó y el pellet se expuso a las soluciones. Después de homogeneizar la mezcla, se dejaron en contacto 0, 5, 15 y 30 min. Se sembraron y se hicieron recuentos. X10.	CLX 0,12% no eliminó <i>Ef</i> a ningún intervalo de tiempo. Las soluciones de CLX 1% y de NaOCl 1 y 5% eliminaron todos los microorganismos, independientemente del tiempo y de la presencia o no de BSA.
Grawehr M, y cols., 2003 <sup>180</sup> .	NaOCl 0,5% EDTA 8,5% EDTA 17%+NaOCl 1%	Evalúan, entre otros aspectos, la actividad antimicrobiana frente a <i>Ef</i> ATCC 29212. Utilizaron TDA: crearon cultivo de <i>Ef</i> (DO <sub>550</sub> = 1) en medio fluido universal que sembraron en placas de agar. Las soluciones se inocularon en cilindros excavados en las placas. Se incubaron 24 h a 37 °C y se midieron halos de inhibición. X3	Los halos de inhibición de EDTA solo y mezclado con NaOCl fueron similares y mejores que los del NaOCl 0,5%. La solución de EDTA mantiene sus propiedades antimicrobianas cuando se combina con NaOCl.
Sassone LM, y cols., 2003 <sup>181</sup> .	NaOCl 1, 5% CLX 0,12, 0,5, 1%	Evalúan la actividad antimicrobiana frente a bacterias, entre ellas <i>Ef</i> ATCC 29212. Utilizaron TCD: generaron suspensión de <i>Ef</i> (10 <sup>9</sup> ufc/ml) en HBSS con BSA. La suspensión se centrifugó y el pellet se expuso a las soluciones. Después de homogeneizar la mezcla, se dejaron en contacto 0, 5, 15 y 30 min. Se sembraron y se hicieron recuentos. X10.	CLX 0,12% no eliminó <i>Ef</i> a ningún intervalo de tiempo. CLX 0,5, 1% y NaOCl 1 y 5% eliminaron todos los microorganismos sin incluir el tiempo. La CLX debe ser utilizada en concentraciones superiores a 0,12% para obtener un espectro antimicrobiano mayor.
Lin YH, y cols., 2003 <sup>182</sup> .	CLX 0,12% (Peridex <sup>®</sup> )  Ca (OH) <sub>2</sub> en polvo y pasta (Pulpdent <sup>®</sup> )	Estudian el efecto individual y combinado frente a <i>Ef</i> ATCC 29212. Utilizaron TDA: puntas de papel impregnadas en los antisépticos (solos o combinados en ratio 1:1), se colocaron en placas de MH inoculadas con suspensión <i>Ef</i> (0,5 MF). Tras 24 y 72 h de incubación a 37 °C se midieron los halos de inhibición.	No hubo diferencias significativas entre la actividad antibacteriana de Ca(OH) <sub>2</sub> en polvo y pasta. CLX 0,12% sola y combinada mostró significativamente mejor efecto que Ca(OH) <sub>2</sub> . No hubo diferencias entre Peridex <sup>®</sup> y Peridex <sup>®</sup> con Ca(OH) <sub>2</sub> .
Torabinejad M, y cols., 2003 <sup>183</sup> .	NaOCl 5,25% BioPure MTAD <sup>®</sup> EDTA 17%	Evalúan la capacidad de las soluciones (diluciones 1:1, 1:5 y 1:10) para eliminar <i>Ef</i> ATCC 4082. Utilizaron TDA: discos de papel impregnados con las soluciones se colocaron en placas de TSA inoculadas con <i>Ef</i> . Tras incubar 24 h, 37 °C se midieron los halos de inhibición. Determinaron la CMI: expusieron suspensión de <i>Ef</i> (DO <sub>570</sub> = 0,11) a diluciones seriadas de las soluciones (1:2 a 1:2048). Tras incubar 18 h, 37 °C, observaron la turbidez.	BioPure MTAD es igual de efectivo que NaOCl 5,25% y significativamente más que EDTA 17%. BioPure MTAD <sup>®</sup> (1:5 y 1:10) produjo halos de inhibición mayores que NaOCl 5,25%. EDTA 17% mostró una escasa actividad y su dilución eliminó su eficacia. CMI de BioPure MTAD <sup>®</sup> , dilución 1:200; CMI de NaOCl, dilución 1:32.

<sup>178</sup> Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, 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;97:79-84.

<sup>179</sup> Sassone LM, Fidel R, Fidel S, Vieira M, Hirata R Jr. The influence of organic load on the antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine *in vitro*. Int Endod J 2003;36:848-52.

<sup>180</sup> Grawehr M, Sener B, Waltimo T, Zehnder M. Interactions of ethylenediamine tetraacetic acid with sodium hypochlorite in aqueous solutions. Int Endod J 2003;36:411-7.

<sup>181</sup> Sassone LM, Fidel RA, Fidel SR, Dias M, Hirata RJ. Antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine using a contact test. Braz Dent J 2003;14:99-102.

<sup>182</sup> Lin YH, Mickel AK, Chogle S. Effectiveness of selected materials against *Enterococcus faecalis*: part 3. The antibacterial effect of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. J Endod 2003;29:565-6.

Estrela C, y cols., 2003 <sup>184</sup> .	NaOCl 2% CLX 2%	Estudian la actividad antibacteriana frente a microorganismos, entre ellos <i>Ef</i> ATCC 29212. TDA: discos de papel impregnados en las soluciones se colocaron en placas sembradas con suspensión de <i>Ef</i> en BHI (1 MF). Tras incubar 24 h, 37 °C se midieron halos de inhibición.  TCD: puntas de papel impregnadas en suspensión se colocaron en placas y se expusieron a las soluciones 5, 10, 30 min. Tras neutralizar, se transfirieron a BHI y se analizó turbidez. X3.	Los mejores resultados del NaOCl 2% se observaron en el TCD y los de CLX 2% en el TDA. En el TDA, el tamaño de los halos depende de la solubilidad y capacidad de difusión de la sustancia probada y no expresa su potencial efectivo total. El TCD directo relaciona la efectividad de la sustancia con el contacto directo con el microorganismo y no depende de las otras variables.
Leonardo MR, y cols., 2001 <sup>185</sup> .	Endoquil CLX 2% NaOCl 0,5%	Evalúan la actividad antibacteriana frente a microorganismos, entre ellos <i>Ef</i> ATCC 10541. Utilizaron TDA: discos de papel impregnados en las soluciones se colocaron en placas de BHI inoculadas con suspensión de <i>Ef</i> (10 <sup>6</sup> ufc/ml). Tras 24 h de incubación, 37 °C, se midieron halos de inhibición. X2.	La CLX 2% mostró actividad antimicrobiana frente a todos los microorganismos y fue mejor que endoquil, que solo fue efectivo frente a los gram positivos. La solución de NaOCl 0,5% no fue efectiva frente a <i>Ef</i> .
Gomes BP, y cols., 2001 <sup>186</sup> .	NaOCl 0,5, 1, 2,5, 4, 5,25 %  CLX 0,2, 1 y 2% en gel y líquido	Calculan la efectividad de los agentes frente a <i>Ef</i> ATCC 29212. Utilizaron TCD: mezclaron los antimicrobianos y la suspensión de <i>Ef</i> en solución salina (0,5 MF), en pocillos de placa de 24 pocillos durante 10, 30 y 45 sg, 1, 3, 5, 10, 20 y 30 min y 1 y 2 h. Tras neutralizar, se incubaron 7 días a 37 °C y se midió la turbidez. X6.	CLX líquida 1 y 2% y NaOCl 5,25% necesitaron menos de 30 sg, para eliminar <i>Ef</i> . CLX líquida 0,2% y gel 2% requirieron 30 sg y 1 min, respectivamente. NaOCl 0,5, 1, 2,5 y 4% eliminaron <i>Ef</i> tras 30, 20, 10 y 5 min, respectivamente. CLX gel 0,2 y 1% tras 2 h y 15 min.
Ayhan H, y cols., 1999 <sup>187</sup> .	NaOCl 0,5, 5,25%  CLX 2%  Alcohol 21%  Cresophene	Evalúan el efecto antibacteriano frente a microorganismos, entre ellos <i>Ef</i> . Utilizaron el TDA: discos de papel impregnados con las soluciones se colocaron en placas de BHI agar inoculadas con suspensión de <i>Ef</i> en solución salina (0,5 MF). Tras incubar 24 h, 37 °C se midieron los halos de inhibición. X5.	NaOCl 5,25% fue la más efectiva. Cresophene mostró mejor actividad que el resto. Alcohol mostró halos de inhibición menores que la CLX sin diferencias significativas. NaOCl 0,5% fue el menos efectivo.
Siqueira JF Jr, y cols., 1998 <sup>188</sup> .	NaOCl 0,5, 2,5, 4%  CLX 0,2, 2%  Ácido cítrico 10%  EDTA 17%	Evalúan el efecto antibacteriano frente a microorganismos, entre ellos <i>Ef</i> ATCC 29212. Utilizaron el TDA: discos de papel impregnados en las soluciones se colocaron en placas de BHI inoculadas con <i>Ef</i> . Tras 2 días de incubación se midieron los halos de inhibición. X3.	NaOCl 4% fue significativamente mejor que el resto excepto NaOCl 2,5%. De mayor a menor, la efectividad de las soluciones fue: NaOCl 4%, NaOCl 2,5%, CLX 2%, CLX 0,2%, EDTA, ácido cítrico y NaOCl 0,5%.

<sup>183</sup> Torabinejad M, Shabahang S, Aprecio RM, Kettering JD. The antimicrobial effect of MTAD: an *in vitro* investigation. J Endod 2003;29:400-3.

<sup>184</sup> Estrela C, Ribeiro RG, Estrela CRA, Pecora JD, Sousa-Neto MD. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. Braz Dent J 2003;14:58-62.

<sup>185</sup> Leonardo MR, da Silva LA, Filho MT, Bonifácio KC, Ito IY. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a castor oil-based irrigant. J Endod 2001;27:717-9.

<sup>186</sup> Gomes BPFA, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. Int Endod J 2001;34:424-8.

<sup>187</sup> Ayhan H, Sultan N, Cirak M, Ruhi MZ, Bodur H. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. Int Endod J 1999;32:99-102.

Smith JJ, y cols., 1986 <sup>189</sup> .	Ácido cítrico 25 y 50% NaOCl 5,25%	Comparan el efecto germicida frente a distintos microorganismos, entre ellos <i>Ef</i> . Utilizaron TCD: impregnaron puntas de papel en suspensión de <i>Ef</i> (10 <sup>6</sup> ufc/ml), y las sumergieron en las soluciones durante 5 y 15 min. Posteriormente, las puntas se colocaron en caldo, se incubaron 72 h. Se midió la turbidez y se sembraron en placas de agar sangre.	NaOCl 5,25% fue 100% efectiva frente a <i>Ef</i> . Ácido cítrico 50% mostró actividad antimicrobiana en el 80% de los casos tras 15 min de exposición y en el 20% tras 5 min. A una concentración del 25%, el 80% de los recuentos fueron positivos tras 15 min y el 100% tras 5 min.
--	---------------------------------------	--	---

BSA: suero bovino de albúmina; *Ef. E. faecalis*; TCD: test de contacto directo; TDA: test de difusión en agar; ufc: unidades formadoras de colonias; min: minuto; sg: segundo; h: hora; X10: indica el número de veces que se repite la experiencia (en este caso sería 10 veces); CMI: concentración mínima inhibitoria; MH: medio Mueller-Hinton; MF: Mc Farland; DO: densidad óptica; ATMA: ácido amino tris-metilenfosfórico; HEBP: 1- hidroxietilen-1, 1-bifosfonato; FAB: *fastidious anaerobe broth*; HBSS: solución salina balanceada de Hanks; Ca(OH)<sub>2</sub>: hidróxido de calcio; TSA: agar tripticasa de soja; PMC: paramonoclorofenol.

## 2.4. Actividad antimicrobiana de las soluciones irrigadoras frente a biopelículas de *E. faecalis*

El modo de crecimiento en biopelículas es una estrategia de supervivencia de los microorganismos ante condiciones ambientales adversas. En lo que a las infecciones endodónticas concierne el concepto de biopelícula ha ganado atención en la última década. Actualmente, las investigaciones sobre la actividad antimicrobiana de las soluciones irrigadoras se están realizando sobre biopelículas.

Para realizar la revisión doctrinal de los estudios que evalúan *in vitro* la actividad antimicrobiana de soluciones irrigadoras frente a biopelículas de *E. faecalis*, se realizó una búsqueda en *PubMed* (2001 - 2009) empleando la siguiente estrategia: *biofilms AND irrigants AND Enterococcus faecalis*. Se localizaron un total de 12 artículos. A partir de estos se revisó la bibliografía para tratar de completar la revisión. Finalmente se seleccionaron 8 estudios *in vitro* que se han sistematizado en la Tabla 3, incluyendo las soluciones irrigadoras testadas, el material y método utilizado así como los resultados y conclusiones principales.

Los estudios realizados *ex vivo* han sido mucho más escasos. Frente a *E. faecalis* sólo se ha encontrado el trabajo realizado por Clegg y cols.<sup>190</sup> quienes demostraron que hipoclorito sódico al 6% fue más eficaz que hipoclorito sódico al 1 y 3%, clorhexidina al 2% y BioPure MTAD® ya que eliminó físicamente las biopelículas polimicrobianas y no dejó bacterias viables tras 15

<sup>188</sup> Siqueira JF Jr, Batista MM, Fraga RC, de Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod* 1998;24:414-6.

<sup>189</sup> Smith JJ, Wayman BE. An evaluation of the antimicrobial effectiveness of citric acid as a root canal irrigant. *J Endod* 1986;12:54-8.

<sup>190</sup> Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms *in vitro*. *J Endod* 2006;32:434-7.

minutos de exposición. Por otro lado, Lima y cols.<sup>191</sup> evaluaron la efectividad de clorhexidina al 2% y antibióticos en forma de gel para eliminar biopelículas de *E. faecalis*. De todos los medicamentos probados sólo los que contenían clorhexidina al 2% fueron capaces de eliminar la mayor parte de las biopelículas.

Tabla 3. Estudios que evalúan *in vitro* la actividad antimicrobiana de soluciones irrigadoras frente a biopelículas de *E. faecalis*.

Referencia	Soluciones	Material y Métodos	Resultados y Conclusiones
Williamson AE y cols., 2009 <sup>192</sup> .	NaOCl 6% CLX 2% Chlor-XTRA® CHX-Plus®	Determinan la eficacia bactericida frente a BP de <i>Ef</i> ER3/2s. Generaron BP sobre portas de cristal sumergidos en tubos con 30 ml de BHI y 0,2 ml de suspensión de <i>Ef</i> en BHI (10 <sup>8</sup> ufc/ml) que incubaron anaeróticamente 48 h a 37 °C. Se expusieron a cada solución irrigadora durante 1, 3 y 5 min. Tras neutralizar, las BP se recuperaron en caldo BHI. Resultados en ufc/ml y transformación logarítmica. X6.	No hubo diferencias significativas entre NaOCl 6% y Chlor-XTRA® (reducción 7 y 8 log). Tampoco entre CLX 2% y CHX-Plus® (reducción 3 y 4 log).  NaOCl 6% y Chlor-XTRA® fueron estadísticamente más eficaces que CLX 2% y CHX-Plus® sólo a 1 y 3 min.
Bryce G y cols., 2008 <sup>193</sup> .	NaOCl EDTA Cordosyl, Yodo, SDS, CTAB, Tween 80	Investigan la capacidad para romper y matar BP de especies simples o dobles, entre ellas de <i>Ef</i> . Generaron BP en filtros de membrana de nitrato de celulosa. Las BP fueron expuestas 1, 5 y 10 min. Una vez recuperadas se evaluó el número de células viables y el grado de disrupción con microscopio laser confocal.	NaOCl fue la solución más eficaz para romper BP. El yodo sólo fue efectivo en matar BP a diferencia de CTAB y SDS que rompieron BP y mataron las bacterias. La mayoría de la disrupción celular ocurrió tras el primer minuto.
Giardino L y cols., 2007 <sup>194</sup> .	NaOCl 5,25% BioPure MTAD® Tetraclean®	Evalúan la eficacia antimicrobiana sobre BP de <i>Ef</i> ATCC 29212. Generaron BP en filtros de membrana de nitrato de celulosa inoculados con suspensión de <i>Ef</i> en BHI (0,5 MF). Las membranas se colocaron en placas de BHI agar y se incubaron aeróticamente 48 h a 37 °C. Después se expusieron 5, 30 y 60 min a cada solución. Tras neutralizar se recuperaron. Resultados en ufc/membrana. X3.	NaOCl 5,25% eliminó 100% de la BP tras 5 min. Tetraclean® redujo la BP al 100% tras 60 min, al 99,9% tras 30 min y al 90% tras 5 min.  BioPure MTAD® no eliminó la BP en ningún tiempo.  NaOCl fue significativamente mejor que Tetraclean® y BioPure MTAD®.

<sup>191</sup> Lima KC, Fava LR, Siqueira JF Jr. Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* biofilms to some antimicrobial medications. J Endod 2001;27:616-9.

<sup>192</sup> Williamson AE, Cardon JW, Drake DR. Antimicrobial susceptibility of monoculture biofilms of a clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. J Endod 2009;35:95-7.

<sup>193</sup> Bryce G, Ready D, Donnell DO, Ng P, Pratten J, Gulabivala K. Biofilm disruption by root canal irrigants and potential irrigants [abstract]. Int Endod J 2008;41:814-5.

<sup>194</sup> Giardino L, Ambu E, Savoldi E, Rimondini R, Cassanelli C, Debbia EA. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of sodium hypochlorite, MTAD, and Tetraclean against *Enterococcus faecalis* biofilm. J Endod 2007;33:852-5.

Dunavant TR y cols., 2006 <sup>195</sup> .	NaOCl 1 y 6% BioPure MTAD® CLX 2% SmearClear® REDTA®	Evalúan la eficacia antimicrobiana frente a BP de <i>Ef</i> OG1X. Generaron BP en dispositivo de fluido continuo, inoculado con cultivo de <i>Ef</i> en BHI que se incubó durante 24 h, 37 °C. Se expusieron a cada solución 1 y 5 min y después, se introdujeron 3 veces en 1 ml de PBS, para eliminar el irrigante residual. Las BP se recuperaron en caldo. Resultados en ufc/cupón y porcentaje de muerte. X4.	Porcentaje de muerte: NaOCl 6%, un 99,99%; NaOCl 1%, un 99,98%; SmearClear®, un 78,06%; CLX 2%, un 60,49%; REDTA®, un 26,99%; y BioPure MTAD®, un 16,08%.  NaOCl fue el más efectivo sin diferencias entre 1 y 6% y con diferencias significativas con el resto de soluciones.
Sena NT y cols., 2006 <sup>196</sup> .	NaOCl 2,5 y 5,25%  CLX 2% (gel y líquido)	Investigan la efectividad frente a BP de especies simples, entre ellas <i>Ef</i> ATCC 29212. Generaron BP en filtros de membrana de nitrato de celulosa inoculados con suspensión de <i>Ef</i> en BHI (0,5 MF). Las membranas se colocaron en placas de BHI agar y se incubaron 10 días en atmósfera de CO <sub>2</sub> a 37 °C. Se expusieron a cada solución 30 sg, 5, 10, 15, 30 y 60 min con y sin agitación. Tras la neutralizar, se resuspendieron. Resultados en ufc/membrana.	Las soluciones líquidas, especialmente el NaOCl 5,25% y CLX 2%, mataron las BP más rápido (30 sg) con o sin agitación. NaOCl 2,5% eliminó BP tras 30 sg con agitación y, sin agitación necesitó más de 60 min. CLX gel necesitó más tiempo. La agitación mecánica mejoró la eficacia de las soluciones irrigadoras.
Hems RS y cols., 2005 <sup>197</sup> .	Ozono NaOCl 2,5%	Evalúan el efecto antibacteriano frente a <i>Ef</i> E78.2 en suspensión o en BP. Las BP se generaron en filtros de membrana de nitrato de celulosa que se inocularon con suspensión de <i>Ef</i> , se colocaron en placas de agar-sangre y se incubaron. Se expusieron a 10 ml de NaOCl 2,5% y al ozono 60, 120 y 240 sg. Tras la neutralizar, las BP se resuspendieron. Resultados en ufc/membrana. X4.	No hubo reducción significativa en la viabilidad celular tras aplicar ozono 240 sg, mientras que con NaOCl 2,5% no se detectaron células viables. El ozono mostró efecto antibacteriano sobre <i>Ef</i> en suspensión pero ejerció poca actividad cuando se expuso a BP.
Abdullah M y cols., 2005 <sup>198</sup> .	NaOCl 3% Povidona yodada 10% CLX 0,2% EDTA 17% Ca(OH) <sub>2</sub>	Comparan la eficacia frente a <i>Ef</i> en suspensión, pellet o en BP. Las BP se generaron en filtros de membrana de nitrato de celulosa que se inocularon con suspensión de <i>Ef</i> en BHI, se colocaron en placas de FAA agar y se incubaron 48 h anaeróticamente, a 37 °C. Se expusieron a las soluciones 1, 2, 4, 8, 15, 30 ó 60 min. Tras neutralizar, las BP se resuspendieron. Resultados en ufc/membrana.	NaOCl 3% y povidona yodada redujeron el 100% de las BP tras 2 y 30 min de contacto, respectivamente. Ca(OH) <sub>2</sub> y CLX 0,2% alcanzaron una reducción de 7 log y 5 log respectivamente, tras 60 min. No hubo diferencias significativas entre PBS (control -) y EDTA 17%.

<sup>195</sup> Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod* 2006;32:527-31.

<sup>196</sup> Sena NT, Gomes BPFA, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. *In vitro* antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J* 2006;39:878-85.

<sup>197</sup> Hems RS, Gulabivala K, Ng YL, Ready D, Spratt DA. An *in vitro* evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2005;38:22-9.

<sup>198</sup> Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, Moles DR, Spratt DA. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *J Endod* 2005;31:30-6.

Spratt DA y cols., 2001 <sup>199</sup> .	NaOCl 2,25% CLX 0,2% Povidona yodada 10% 5 ppm plata coloidal	Evalúan la efectividad frente a BP de especies simples, entre ellas <i>Ef</i> . Las BP se generaron en filtros de membrana de nitrato de celulosa inoculadas con suspensión en BHI, se colocaron en placas de FAA agar y se incubaron 48 h anaeróticamente, 37 °C. Se expusieron 15 y 60 min a cada solución. Tras la neutralizar, las BP se resuspendieron. Resultados en ufc/membrana. X4.	NaOCl 2,25% fue el más efectivo frente a <i>Ef</i> , alcanzando el 100% de muerte a cualquier tiempo. La povidona yodada solo fue efectiva al 100% tras 60 min de exposición. La solución de CLX 0,2% produjo poca reducción de las BP incluso tras 60 min. La plata coloidal no fue efectiva.
--	--	--	--

*Ef. E. faecalis*; DO: densidad óptica; MF: Mc Farland; ufc: unidades formadoras de colonias; h: hora; min: minuto; sg: segundo; X6: indica el número de veces que repiten la experiencia (en este caso sería 6 veces); FAA: *fastidious anaerobe agar*; LDGESS: lauril-dietilen-glicol-éter-sulfato sódico 1,25%; SDS: sulfato de sodio dodecil; CTAB: bromuro de cetil-trimetil amonio, cetrimida; PBS: solución salina tamponada; Ca(OH)<sub>2</sub>: hidróxido de calcio.

## 2.5. Agentes surfactantes

Los agentes activos superficiales o surfactantes son moléculas que contienen un segmento liposoluble y otro hidrosoluble que le permiten ocupar la interfase entre la fase acuosa y lipídica. En función de la carga iónica de la superficie de la molécula, los surfactantes se clasifican en aniónicos, la carga molecular es negativa; catiónicos, positiva; no iónicos, no hay carga y en los anfóteros existen cargas tanto positivas como negativas.

Concretamente, los surfactantes catiónicos destacan por dos propiedades importantes. Por un lado se absorben sobre substratos cargados negativamente produciendo una capa hidrófoba que aumenta el ángulo de contacto con el agua, reduciendo, de este modo, la tensión superficial de los líquidos. Por otro lado, los surfactantes catiónicos del tipo amonio cuaternario tienen acción antiséptica y bactericida<sup>200</sup>. Actúan sobre las membranas bacterianas reaccionando con los componentes fosfolipídicos provocando distorsión de la membrana citoplasmática y lisis por estrés osmótico<sup>201</sup>. Además, la carga positiva de los surfactantes catiónicos genera un efecto biocida sobre las células microbianas<sup>202</sup> ya que cambia el signo de la superficie celular de negativo a positivo y estas mueren<sup>203</sup>. En el caso de las biopelículas, este cambio electrostático desestabiliza las fuerzas cohesivas que mantienen la integridad de la estructura, originando la eliminación de la misma<sup>204</sup>. En las concentraciones utilizadas no son tóxicos.

<sup>199</sup> Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K. An *in vitro* evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *Int Endod J* 2001;34:300-7.

<sup>200</sup> Merianos JJ. Quaternary ammonium antimicrobial compounds. En: Block SS, (ed.), *Disinfection, Sterilization, and Preservation*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991; 225-62.

<sup>201</sup> Russell AD, Chopra I. *Understanding antibacterial action and resistance*. 2ª ed. Ellis Horwood. Chichester;1996.

<sup>202</sup> Kugler R, Bouloussa O, Rondelez F. Evidence of a charge-density threshold for optimum efficiency of biocidal cationic surfaces. *Microbiology* 2005;151:1341-8.

<sup>203</sup> Campanhã MTN, Mamizuka EM, Carmona-Ribeiro AM. Interactions between cationic liposomes and bacteria: the physical-chemistry of the bactericidal action. *J Lipid Res* 1999;40:1495-500.

<sup>204</sup> Cloete TE, Jacobs L, Brözel VS. The chemical control of biofouling in industrial water systems. *Biodegradation* 1998;9:23-37.

El bromuro de cetil-trimetil amonio o cetrimida es un surfactante catiónico derivado del amonio cuaternario cuya actividad bactericida se ha demostrado frente a bacterias grampositivas y gramnegativas, así como antifúngica<sup>205</sup>. Tiene la ventaja de ser muy poco irritante y reduce la tensión superficial de los líquidos, favoreciendo la entrada de éstos a lugares de difícil acceso como es el caso de los túbulos dentinarios<sup>206</sup>. Estas características justifican su inclusión como componente de soluciones irrigadoras usadas en endodoncia tales como Cetrexidin<sup>®</sup>, SmearClear<sup>®</sup>, REDTA<sup>®</sup> y EDTAC<sup>®</sup>, entre otras. Cuando se combina con clorhexidina se ha demostrado que existe sinergismo ya que ambos actúan sobre la pared celular de las bacterias<sup>207</sup>.

Para realizar la revisión doctrinal de estudios que evalúan la actividad antimicrobiana de cetrimida y clorhexidina, se realizó una búsqueda en *PubMed* (1984 - 2008) con la siguiente estrategia: *cetrimide AND irrigants*. De esta búsqueda se obtuvieron 19 artículos de los que se seleccionaron 3 que evaluaban actividad antimicrobiana frente a *E. faecalis*. D'Arcangelo y cols.<sup>208</sup> compararon la actividad antimicrobiana de hipoclorito sódico al 0,5%, 1%, 3% y 5% y distintas combinaciones de clorhexidina y cetrimida (CTR/CLX 0,2%/0,2%, 0,2%/1%, 0,2%/0,5%, 0,2%/0,4%, 0,2%/0,3%, 0,2%/0,4%, 0,3%/0,2%) frente a microorganismos, entre ellos *E. faecalis* en suspensión. Todos los antisépticos probados tuvieron efecto bactericida sobre todas las cepas probadas sin diferencias. Onçağ O y cols.<sup>209</sup>, en un estudio *ex vivo*, compararon las propiedades antibacterianas y la toxicidad de hipoclorito sódico al 5,25%, al 2% y Cetrexidin<sup>®</sup>. De este modo, irrigaron dientes contaminados con *E. faecalis*, con las soluciones durante 5 minutos. Basándose en la presencia de turbidez, encontraron que las soluciones de clorhexidina 2% y Cetrexidin<sup>®</sup> fueron más efectivas que el hipoclorito sódico al 5,25%. Por último, Portenier y cols.<sup>210</sup> (Tabla 2), observaron que la combinación de clorhexidina y cetrimida (CLX/CTR 0,1%/0,1% y 0,01%/0,01%) ejerció actividad bactericida frente una suspensión de *E. faecalis* inmediatamente, tras 10 segundos de exposición.

Para revisar los artículos que testaron cetrimida frente a biopelículas se realizó otra búsqueda en *PubMed* (1990 - 2008) con la siguiente estrategia: *cetrimide AND biofilms*. Se obtuvieron un total de 9 artículos de los que ninguno utilizaba biopelículas de *E. faecalis*. Sin embargo, obtienen que cetrimida debilita la estabilidad de las biopelículas de *Pseudomonas fluorescens* pero no las

<sup>205</sup> Vieira DB, Carmona-Ribeiro AM. Cationic lipids and surfactants as antifungal agents: mode of action. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:760-7.

<sup>206</sup> Giardino L, Ambu E, Becce C, Rimondini L, Morra M. Surface tension comparison of four common root canal irrigants and two new irrigants containing antibiotic. *J Endod* 2006;32:1091-3.

<sup>207</sup> Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. *J Endod* 2006;32:138-41.

<sup>208</sup> D'Arcangelo C, Varvara G, De Fazio P. An evaluation of the action of different root canal irrigants on facultative aerobic-anaerobic, obligate anaerobic, and microaerophilic bacteria. *J Endod* 1999;25:351-3.

<sup>209</sup> Onçağ O, Hoşgör M, Hilmioglu S, Zekioğlu O, Eronat C, Burhanoglu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *Int Endod J* 2003;36:423-32.

<sup>210</sup> Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. *J Endod* 2006;32:138-41.

elimina por completo<sup>211</sup>. Asimismo demuestran una elevada acción antimicrobiana frente a biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*<sup>212</sup>, *Escherichia coli* y *Staphylococcus epidermidis*<sup>213</sup>.

Tan sólo Bryce y cols.<sup>214</sup> (Tabla 3) expusieron ceftrixima a biopelículas de *E. faecalis* y obtuvieron que fue efectivo para romper y matar las bacterias de las biopelículas.

---

<sup>211</sup> Simões M, Pereira MO, Vieira MJ. Effect of mechanical stress on biofilms challenged by different chemicals. *Water Res* 2005;39:5142-52.

<sup>212</sup> Al-Adham IS, Al-Hmoud ND, Khalil E, Kierans M, Collier PJ. Microemulsions are highly effective anti-biofilm agents. *Lett Appl Microbiol* 2003;36:97-100.

<sup>213</sup> Gilbert P, Das JR, Jones MV, Allison DG. Assessment of resistance towards biocides following the attachment of microorganisms to, and growth on, surfaces. *J Appl Microbiol* 2001;91:248-54.

<sup>214</sup> Bryce G, Ready D, Donnell DO, Ng P, Pratten J, Gulabivala K. Biofilm disruption by root canal irrigants and potential irrigants [abstract]. *Int Endod J* 2008;41:814-55.

## **3. MATERIAL Y MÉTODOS**



### 3.1. Cepa bacteriana

En este estudio se ha utilizado la cepa de *Enterococcus faecalis* CECT 795 de la Colección Española de Cultivos Tipo<sup>215</sup> (CECT, Burjasot, Valencia).

### 3.2. Medios de cultivo

#### TSB

El caldo tripticasa de soja (TSB, *Tryptic Soy Broth without dextrose*, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) se utilizó para la conservación de *E. faecalis* a -20 °C.

Para su preparación se añadieron a un vaso de precipitado, 37 g de polvo TSB y 1 litro de agua destilada. Una vez disuelto en ebullición, se esterilizó en autoclave 15 minutos a 121 °C.

#### Agar mantenimiento

Es un medio utilizado para el mantenimiento de las bacterias viables. Su composición es la siguiente: 15 g de peptona tripticasa de caseína, 15 g de peptona de soja, 5 g de cloruro sódico, 15 g de agar y 1 litro de agua destilada.

Para su preparación se añadieron todos los componentes a un vaso de precipitado. Una vez disueltos en ebullición, se repartieron 10 ml/tubo y se esterizaron en autoclave 15 minutos a 121 °C. Al sacarlos del autoclave, los tubos se pusieron inclinados para que quedaran con lengüeta o pico de flauta antes de su solidificación. Después de la esterilización, el pH del medio era  $7,2 \pm 0,2$ .

#### BHI

El caldo infusión cerebro corazón (BHI, *Brain Heart Infusion*, Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España) se usó para preparar la suspensión bacteriana inicial a partir de la cual se crearon las biopelículas, así como para recuperarlas. Para el recuento de las células viables se utilizó el medio agar BHI, en el que se observó un buen crecimiento de la cepa bacteriana.

Para la preparación del caldo, se añadieron a un vaso de precipitado, 37 g de polvo BHI y 1 litro de agua destilada. Una vez disuelto en ebullición, se esterilizó en autoclave 15 minutos a 121 °C. Después de la esterilización el pH del medio era  $7,38 \pm 0,2$ . En la preparación de la forma sólida,

---

<sup>215</sup> Colección Española de Cultivos Tipo. Página web: <http://www.cect.org/>. Acceso 11 febrero 2009.

se incorporaron 15 g de agar al vaso de precipitado y, tras la esterilización, se añadieron 15 ml por tubo y por placa de Petri.

### **Agar sangre**

En todas las experiencias se utilizó agar sangre (Agar Columbia + 5% de sangre de cordero, bioMérieux S.A., Marcy l'Etoile, Francia) para comprobar que la bacteria está en cultivo puro.

### **Otros preparados**

Se utilizó solución salina 0,9% para el lavado de las biopelículas así como para realizar las diluciones para el recuento de las biopelículas. Su composición es la siguiente: 9 g de NaCl; 1000 ml de agua destilada.

Los componentes se disolvieron y se esterilizó en autoclave 20 minutos a 121 °C.

### **3.3. Conservación de la bacteria**

La bacteria se incubó 24 horas en TSB y, posteriormente, se adicionó glicerol estéril al 50% y se conservó a -20 °C en este medio. Para su uso, se sembró en BHI, así como en agar sangre para comprobar que estaba en cultivo puro. A partir del cultivo en BHI, la bacteria se sembró en tubos en lengüeta con medio agar mantenimiento y se mantuvo a 4 °C para su posterior utilización en las experiencias.

### **3.4. Soluciones irrigadoras**

Las soluciones irrigadoras utilizadas para el estudio de su actividad antiséptica fueron las siguientes:

- Hipoclorito sódico 10% (Panreac Química S.A., Castellar del Vallès, Barcelona, España).
- Digluconato de clorhexidina 20% (Guinama, Alboraya, Valencia, España).
- Ácido cítrico (Panreac Química S.A. Castellar del Vallès, Barcelona, España).
- Ácido etilendiaminotetraacético, EDTA, sal disódica, dihidrato para análisis (Scharlau Chemie S.A., La Jota, Barcelona, España).

- Ácido fosfórico 50% (Panreac Química S.A., Montcada i Reixac, Barcelona, España).
- Bromuro de cetil-trimetil amonio, cetrimida (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania).

### Preparación de las soluciones irrigadoras

Las soluciones irrigadoras se prepararon el mismo día que se realizó cada experiencia, con un tiempo máximo previo a uso de 60 minutos. A continuación se detalla cómo se llevó a cabo la preparación de éstas a las concentraciones más altas.

En el caso del hipoclorito sódico, debido a la inestabilidad de las soluciones, se determinó la cantidad de cloro activo de la solución comercial mediante un método yodométrico<sup>216</sup>. El fundamento de la valoración del hipoclorito radica en que el ioduro potásico (IK) es oxidado por el hipoclorito sódico en medio ácido (acético) y el yodo (I<sub>2</sub>) liberado se titula mediante una solución de tiosulfato sódico. Para ello, los reactivos utilizados fueron: ácido acético glacial, ioduro potásico puro (exento de iodato), tiosulfato sódico N/10 (tiosulfato sódico pentahidrato [Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 5H<sub>2</sub>O] 24,818 g y agua destilada c.s.p. 1000 ml) y solución de almidón (almidón soluble 2,5 g, agua destilada 250 ml).

Una vez preparados los reactivos, el hipoclorito se diluyó hasta un grado clorométrico de 3,17 g/kg. El hipoclorito valorado tenía 100 g/l y se podía diluir aproximadamente 1/40.

En un matraz Erlenmeyer de 250 ml se añadieron 100 ml de agua destilada (como base de dilución de los reactivos añadidos), 5 ml de ácido acético glacial, 1 g de IK, 10 ml de la dilución de hipoclorito y 2 - 3 ml de solución de almidón. Se esperaron 2 ó 3 minutos y se tituló con tiosulfato sódico N/10, hasta la desaparición del color azul (del almidón).

$$\text{El contenido en g/l de cloro} = 0,355 \times N \times V/V'$$

N = número de mililitros gastados de tiosulfato; V/V' = inversa de la dilución del hipoclorito; 1 grado clorométrico = 3,17 gramos de cloro/kg

Una vez conocidos los g/l de cloro se realizaron las diluciones añadiendo agua destilada estéril. De este modo, para preparar 100 ml de hipoclorito sódico al 5,25%, si la solución comercial contenía 8 g/l de cloro, se disolvieron 65,6 ml de hipoclorito al 8% en 100 ml de agua destilada estéril. Las soluciones de hipoclorito sódico se mantuvieron en oscuridad hasta su uso.

---

<sup>216</sup> APHA (American Public Health Association). Standard methods for the examination of water and wastewater. 7ª ed. APHA. Washington;1989:4-51.

La solución de clorhexidina al 4% fue preparada disolviendo 20 ml de clorhexidina al 20% en 100 ml de agua destilada estéril.

La solución de EDTA al 17% fue preparada disolviendo 17 g de EDTA (p/v) en agua destilada estéril hasta un volumen aproximado de 100 ml. Seguidamente se añadió hidróxido sódico (NaOH) hasta su disolución ajustando el pH a 7.

El ácido cítrico al 25% fue preparado disolviendo 25 g de ácido (p/v) en agua destilada estéril hasta un volumen de 100 ml.

La solución de ácido fosfórico al 5% fue preparada disolviendo 5 ml de ácido fosfórico al 50% en agua destilada estéril hasta un volumen de 100 ml.

La solución de cetrimida al 0,1% fue preparada disolviendo 0,1 g de cetrimida en agua destilada estéril hasta un volumen de 100 ml. Para preparar las combinaciones de clorhexidina y cetrimida, se hicieron por separado las 10 diluciones de clorhexidina y cetrimida a doble concentración y, posteriormente, se mezclaron volúmenes iguales obteniendo las concentraciones deseadas.

Todas las soluciones fueron homogeneizadas mediante agitación continua con una varilla magnética y esterilizadas mediante filtros estériles de 0,45  $\mu\text{m}$  (Sarstedt, Filtropur S 0,45, Nümbrecht, Alemania). Las diluciones de éstas se realizaron igualmente en agua destilada estéril.

### **3.5. Neutralizantes**

Se prepararon a doble concentración [ $\times 2$ ], ya que al añadirlos en los tubos para el ensayo del neutralizante sufrían una dilución a la mitad. Cada neutralizante se esterilizó de la forma conveniente de acuerdo a su composición. Existe una gran diversidad de neutralizantes; a continuación se exponen los utilizados en este estudio que, para mayor simplicidad se han nombrado con letras.

#### **Neutralizante A [ $\times 2$ ]:**

Se utilizó frente al hipoclorito sódico. Su composición a doble concentración es la siguiente: 32,25 g de Tween 80; 6,25 ml de bisulfito sódico al 40%; 3,922 g de tiosulfato sódico  $5\text{H}_2\text{O}$ ; diluyente c.s.p. 250 ml.

Se añadieron 32,25 g de Tween 80 en un vaso de 50 ó 100 ml, se colocó en la balanza y se disolvió en varias alícuotas de diluyente. Una vez disuelto, se trasvasó todo el contenido del vaso

a otro de 250 ml. Se añadió diluyente hasta completar aproximadamente los 2/3 del volumen. A continuación se incorporaron el resto de los componentes, agitando hasta su disolución. Se vertió todo el contenido a un matraz aforado de 250 ml y se enrasó con diluyente hasta 250 ml.

Posteriormente, se ajustó a pH 7 con una solución de hidróxido sódico (NaOH) y se esterilizó por filtración con filtros estériles de 0,45 µm diámetro de poro.

Las cantidades descritas corresponden al neutralizante a doble concentración. Para prepararlo a concentración simple se diluyó a la mitad con diluyente.

### **Neutralizante B [ $\times 2$ ]:**

Se utilizó frente a la clorhexidina. Su composición a doble concentración [ $\times 2$ ] es la siguiente: 32,25 g de Tween 80; 6,25 ml de bisulfito sódico al 40%; 3,922 g de tiosulfato sódico 5H<sub>2</sub>O; diluyente c.s.p. 250 ml; 1 g de lecitina.

La lecitina formaba una suspensión coloidal que no podía ser esterilizada por filtración. Por ello se preparó el neutralizante sin lecitina y, una vez esterilizado por filtración, se añadió la lecitina en condiciones asépticas.

Se colocó un vaso de 50 ó 100 ml en la balanza, se añadieron 32,25 g de Tween 80 con una pipeta y se disolvió en varias alícuotas de diluyente. Una vez disuelto, todo el contenido del vaso se trasvasó a otro de 250 ml y se añadió diluyente hasta completar aproximadamente los 2/3 del volumen. Se incorporaron el resto de los componentes (excepto la lecitina) y se agitó hasta su disolución. Se vertió todo el contenido a un matraz aforado de 250 ml, completando con diluyente hasta 250 ml.

Seguidamente se ajustó el pH a 7 con una solución de NaOH y se esterilizó por filtración con filtros estériles de 0,45 µm diámetro de poro.

Se pesó 1 g de lecitina en condiciones asépticas y se añadió a la solución estéril previamente preparada, agitándose hasta su disolución (introduciendo una varilla magnética estéril y colocándolo sobre un agitador magnético).

Las cantidades descritas corresponden al neutralizante a doble concentración. Para prepararlo a concentración simple se le añadió igual volumen de diluyente.

### **Neutralizante C [ $\times 2$ ]:**

Se utilizó frente al EDTA. Su composición a doble concentración es la siguiente: 32,25 g de Tween 80; 6,25 ml de bisulfito sódico al 40%; 3,922 g de tiosulfato sódico 5H<sub>2</sub>O; diluyente c.s.p. 250 ml; 1 g de lecitina; 2,525 g de cloruro cálcico.

Como ya se ha explicado, la lecitina formaba una suspensión coloidal que no podía ser esterilizada por filtración. Por ello, el neutralizante se preparó sin lecitina y una vez esterilizado por filtración se añadió la lecitina en condiciones asépticas.

Se incorporaron 2/3 del volumen de diluyente en un vaso de 250 ml y se disolvió el cloruro cálcico. En otro vaso de 250 ml se añadieron el resto de los componentes (excepto la lecitina) y se agregó la solución anterior poco a poco hasta que se disolvió completamente. Todo el contenido se vertió a un matraz aforado de 250 ml y se enrasó con diluyente hasta 250 ml.

A continuación se ajustó a pH 7 con una solución de NaOH y se esterilizó por filtración (filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro).

Posteriormente, se pesó 1 g de lecitina en condiciones asépticas y se añadió a la solución estéril previamente preparada, agitando hasta su disolución (introduciendo una varilla magnética estéril y colocándolo sobre un agitador magnético).

Las cantidades descritas corresponden al neutralizante a doble concentración. Para prepararlo a concentración simple se le añadió igual volumen de diluyente o se diluye a la mitad con diluyente.

### **Neutralizante D [ $\times 2$ ]:**

Se utilizó frente al ácido cítrico. Su composición a doble concentración [ $\times 2$ ] es la siguiente:

Solución A: carbonato sódico, 0,2 M

Solución B: bicarbonato sódico, 0,2 M

Se prepararon ambas soluciones por separado y se mezclaron hasta conseguir un pH 9,6. Se añadieron 29 ml de la solución A y el resto hasta conseguir un pH de 9,6 de la solución B, obteniéndose 100 ml aproximadamente. La esterilización se hizo por filtración con filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.

Las cantidades descritas corresponden al neutralizante a doble concentración. Para prepararlo a concentración simple se le añadió igual volumen de agua destilada.

### **Neutralizante E [ $\times 2$ ]:**

Se utilizó frente al ácido fosfórico. Su composición a doble concentración [ $\times 2$ ] es la siguiente:

Solución A: carbonato sódico, 0,1 M

Solución B: bicarbonato sódico, 0,1 M

Se prepararon ambas soluciones por separado y se mezclaron hasta conseguir un pH 9,6. Se añadieron 29 ml de la solución A y el resto hasta conseguir un pH de 9,6 de la solución B, obteniéndose 100 ml aproximadamente. La esterilización se hizo por filtración con filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.

Las cantidades descritas corresponden al neutralizante a doble concentración. Para prepararlo a concentración simple se le añadió igual volumen de agua destilada.

### **Diluyente (triptona-sal):**

Se utilizó para la preparación de los neutralizantes así como para realizar la suspensión bacteriana inicial para determinar la concentración mínima bactericida (CMB). Su composición es la siguiente: 1 g de peptona de caseína; 8,5 g de cloruro sódico y 1000 ml de agua destilada.

Los componentes se disolvieron en ebullición, se ajustó el pH a 7,2 y se esterilizó en autoclave 20 minutos a 121 °C.

## **3.6. Determinación de la concentración mínima bactericida de las soluciones irrigadoras frente *E. faecalis* en suspensión**

La actividad bactericida de las soluciones irrigadoras se determinó hallando la concentración mínima bactericida (CMB) por el método de dilución-neutralización, de acuerdo con la norma AFNOR NF T 72-150<sup>217</sup> aceptada por el Comité Europeo de Normalización<sup>218</sup>, en un tiempo de contacto de 5 minutos<sup>219</sup>.

Las soluciones y sus concentraciones iniciales fueron: hipoclorito sódico al 0,1%, clorhexidina al 1%, EDTA al 17%, ácido cítrico al 25% y ácido fosfórico al 5%. Para la determinación de la CMB se hicieron 10 diluciones seriadas a la mitad de las soluciones irrigadoras salvo para el ácido cítrico, del que se han utilizado concentraciones específicas para incluir algunas de uso en endodoncia como el 20% y 10% (Tabla 4).

---

<sup>217</sup> AFNOR. Antiseptiques et désinfectants. AFNOR NF T 72-150, Paris, 1995;17-39.

<sup>218</sup> European Committee for Standardization. Norma española UNE-EN 1040. Antisépticos y desinfectantes químicos. Actividad bactericida básica. Método de ensayo y requisitos (fase 1). AENOR, Madrid, 1997.

<sup>219</sup> Espigares E, Bueno A, Espigares M, Gálvez R. Isolation of *Salmonella* serotypes in wastewater and effluent: Effect of treatment and potential risk. Int J Hyg Environ-Health 2006;209:103-7.

Tabla 4. Diluciones de las soluciones irrigadoras utilizadas para el cálculo de la CMB.

Diluciones*	Soluciones irrigadoras (%)				
	NaOCl	CLX	EDTA	Ácido cítrico	Ácido fosfórico
1/2	0,1	1	17	25	5
1/4	0,05	0,5	8,5	20	2,5
1/8	0,025	0,25	4,25	15	1,25
1/16	0,0125	0,125	2,125	10	0,625
1/32	0,0063	0,0625	1,0625	5	0,3125
1/64	0,0031	0,0313	0,5313	2,5	0,1563
1/128	0,0016	0,0156	0,2656	1,25	0,0781
1/256	0,0008	0,0078	0,1328	0,625	0,0391
1/512	0,0004	0,0039	0,0664	0,3125	0,0195
1/1024	0,0002	0,0002	0,0332	0,1563	0,0098

\* Todas las diluciones se hicieron a la mitad excepto para el ácido cítrico del que se incluyeron el 20% y 15%.

### 3.6.1. Preparación de la suspensión bacteriana

La cepa de *E. faecalis* mantenida a 4 °C se sembró en una placa con medio agar mantenimiento y se incubó 18 - 24 horas a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se preparó un segundo subcultivo a partir del primero y se incubó 18 - 24 horas a 37 °C. A partir de este segundo subcultivo, se preparó un tercero de la misma forma descrita. Por lo tanto se le dieron tres pases en total.

A partir del tercer subcultivo se realizó una suspensión bacteriana en diluyente y se ajustó midiendo en el espectrofotómetro (Spectronic 301, Milton Roy Company, USA) a una longitud de onda de 620 nm hasta que se obtuvo un valor comprendido entre 0,3 y 0,4 de absorbancia, equivalente a  $1-3 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/ml) (Figura 1). Dicha suspensión se mantuvo en baño termostatzado a 20 °C (Figura 2).



Figura 1: Espectrofotómetro

A partir de esta suspensión bacteriana de ensayo, utilizando diluyente y tubos estériles de 10 ml de capacidad, se prepararon las diluciones seriadas, que se indican en la Tabla 5.



Figura 2: Baño termostatzado

Tabla 5. Diluciones de la suspensión bacteriana.

Nº de tubo	1	2	3	4	5	6
Dilución de concentración anterior	1/10	1/10	1/10	1/10	1/5	1/20
Dilución	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$0,2 \times 10^{-4}$	$10^{-6}$
Suspensión bacteriana en diluyente (ml)	0,4 en 3,6	0,4 en 3,6	0,4 en 3,6	0,4 en 3,6	0,8 en 3,2	0,2 en 3,8
Concentración bacteriana (ufc/ml)				$1 - 3 \times 10^4$	$2 - 6 \times 10^3$	$1 - 3 \times 10^2$

Los volúmenes se ajustaron para el uso de micropipetas automáticas de volumen regulable. Cada dilución se preparó tomando la cantidad señalada de la dilución anterior y se añadió a la cantidad de diluyente indicada, agitándose vigorosamente de 5 a 10 segundos (Figura 3). La suspensión de ensayo inicial (que contenía  $1 - 3 \times 10^8$  ufc/ml) y los tubos nº 5 y 6 se conservaron en un baño termostatzado a 20 °C. El resto de los tubos se desecharon.

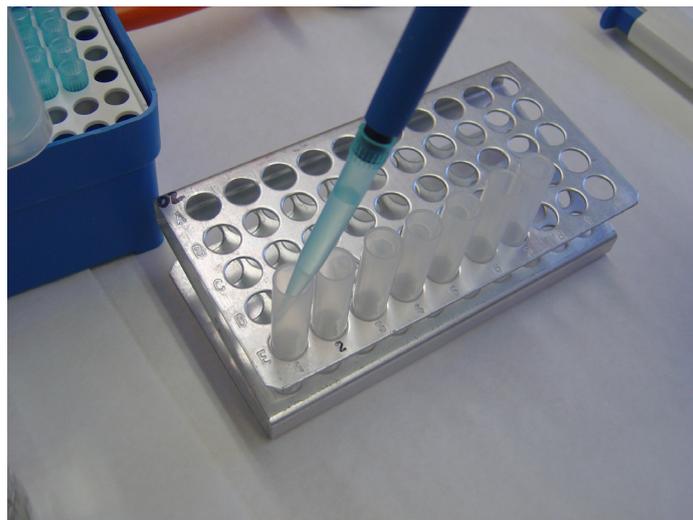


Figura 3: Procedimiento de dilución de la suspensión bacteriana

A continuación, se tomaron dos alícuotas de 1 ml de la dilución bacteriana correspondiente al tubo nº 6 (equivalente a  $1 - 3 \times 10^2$  ufc/ml) y se depositaron en dos placas de Petri, añadiendo en cada una el contenido de un tubo de BHI agar, en sobrefusión a 50 °C. Se agitaron suavemente para mezclar bien, y una vez solidificadas las placas se incubaron 48 horas a 37 °C. Transcurrido este tiempo se realizó el recuento de las colonias de la suspensión madre (N).

### 3.6.2. Ensayo del neutralizante

Previo al estudio de la actividad bactericida se realizaron ensayos de los neutralizantes para comprobar su eficacia frente a las soluciones.

En cada ensayo del neutralizante, se prepararon: 4 tubos de BHI agar para cada neutralizante/solución irrigadora, que se fundieron al baño maría y se mantuvieron en un baño termostático a 50 °C; 2 tubos de 5 ml de capacidad que contenían 1 ml de agua destilada estéril (tubo A) y 1 ml de la solución irrigadora a concentración 1/5 de la máxima que se ensayó (tubo B).

En las siguientes operaciones era muy importante controlar el tiempo, por lo que se utilizó un cronómetro, estimándose un intervalo de 20 segundos entre cada tubo.

Se añadió 1 ml de neutralizante a doble concentración a cada uno de los tubos anteriores, A y B. Los tubos se agitaron y se mantuvieron a 20 °C durante 10 minutos, que correspondía al tiempo de neutralización. Transcurrido este tiempo, se añadieron en cada tubo 0,1 ml de la dilución bacteriana correspondiente al tubo nº 5, equivalente a  $2 - 6 \times 10^3$  ufc/ml. Se agitó y se

mantuvieron durante 5 minutos a 20 °C. A continuación, se tomaron dos alícuotas de 1 ml de cada tubo y se depositaron en las respectivas placas de Petri, añadiendo en cada una el contenido de un tubo de agar BHI, en sobrefusión a 50 °C. Se agitó suavemente y, una vez solidificadas, se incubaron a 37 °C

Para el recuento de las colonias se obtuvo el valor medio de las dos placas controles en las que se adicionó agua destilada (N'), y el valor medio de las dos placas en las que se adicionó la solución irrigadora (n'). Para que el neutralizante fuese efectivo se tenía que cumplir que al menos el 50% de las células bacterianas fueran viables, es decir,

$$n' \geq 0,5 N'$$

### 3.6.3. CMB de las soluciones

Una vez comprobada la eficacia de los neutralizantes se procedió al ensayo de las soluciones irrigadoras para obtener la CMB. Para ello se prepararon: tubos de agar BHI que se fundieron al baño maría y se mantuvieron en sobrefusión en baño termostatzado a 50 °C; tubos de 5 ml de capacidad con 2,25 ml de neutralizante a concentración simple y con 0,9 ml de cada concentración de solución irrigadora.

En las siguientes operaciones era muy importante controlar el tiempo por lo que se utilizó un cronómetro y se realizaron en tubos siempre en el mismo orden. Como se ha señalado anteriormente, es fácil trabajar con 10 tubos, distanciando 20 segundos la misma operación en cada tubo.

A continuación las soluciones se expusieron a la suspensión bacteriana. Para ello se añadieron 0,1 ml de la suspensión de ensayo inicial ( $1 - 3 \times 10^8$  ufc/ml), a cada tubo de solución irrigadora. Los tubos se agitaron y se mantuvieron durante 5 minutos a 20 °C. Transcurrido este tiempo, se procedió a neutralizar el antimicrobiano. Se tomaron 0,25 ml de cada tubo y se añadieron a un tubo con 2,25 ml de neutralizante a concentración simple. Se agitaron y se mantuvieron durante 10 minutos a 20 °C. A continuación, se tomaron dos alícuotas de 1 ml de cada tubo y se añadieron a placas de Petri, vertiendo en cada una el contenido de un tubo de agar BHI, en sobrefusión a 50 °C. Se agitaron suavemente para mezclar bien y, una vez solidificadas, se incubaron 48 horas a 37 °C. Transcurrido este tiempo se realizó el recuento de las colonias.

Cada solución irrigadora se probó en 3 experiencias distintas, 2 réplicas en cada una, obteniendo un total de 6 recuentos. Para el análisis descriptivo se utilizó el programa Microsoft Excel 2007. Se calculó la media del logaritmo de los recuentos de células viables, de las 6 placas expuestas a los irrigantes (n) y de las 6 placas iniciales (N'). El recuento incontable se consideró a partir de

300 ufc/ml. A continuación, se calculó la reducción logarítmica  $\pm$  error estándar de los recuentos. Para que una concentración de la solución irrigadora fuera bactericida se tenía que producir una reducción de 5 unidades logarítmicas ( $10^5$ ) en el número de células bacterianas. Para calcular la reducción logarítmica era necesario tener en cuenta que se partió de datos obtenidos en el recuento de la suspensión bacteriana, que se hicieron mediante diluciones sucesivas hasta un total de  $10^{-6}$ . Por tanto, el valor inicial de la suspensión era  $N' \times 10^6$ , que sufría una dilución 1/100 entre la solución irrigadora y el neutralizante, con lo que quedaba  $N' \times 10^4$ . La reducción logarítmica se calculó siguiendo la siguiente ecuación:

$$\log(N' \times 10^4) - \log n$$

### **3.7. Determinación de la concentración mínima bactericida de las soluciones irrigadoras frente *E. faecalis* en suspensión, en función del tiempo**

El objetivo fue determinar el tiempo necesario para que las soluciones irrigadoras, a las concentraciones de uso en endodoncia seleccionadas, puedan ejercer actividad bactericida frente a una suspensión de *E. faecalis*. Se llevó a cabo mediante el método de dilución-neutralización de acuerdo con la norma AFNOR NF T 72-150<sup>220</sup> aceptada por el Comité Europeo de Estandarización<sup>221</sup>. Los tiempos de contacto seleccionados fueron 30 segundos, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 y 60 minutos.

Las soluciones y concentraciones de uso seleccionadas fueron: hipoclorito sódico al 0,5%, 1%, 2,5% y 5,25%; clorhexidina al 0,12%, 0,2% y 2%; EDTA al 17%; ácido cítrico al 10% y el 25%. El ácido fosfórico se ensayó al 2,5% y 5%.

Se siguió el mismo procedimiento que en el apartado anterior. La densidad óptica de la suspensión bacteriana se determinó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 620 nm hasta obtener un valor comprendido entre 0,3 y 0,4 de absorbancia ( $1 - 3 \times 10^8$  ufc/ml). A partir de esta suspensión bacteriana de ensayo se prepararon diluciones seriadas (Tabla 5). La suspensión de ensayo inicial (que contenía  $1 - 3 \times 10^8$  ufc/ml) y los tubos nº 5 y 6 se conservaron en baño termostático a 20 °C. El resto de los tubos se desecharon.

Dos alícuotas de 1 ml de la dilución nº 6 ( $1 - 3 \times 10^2$  ufc/ml) se añadieron en las correspondientes placas de Petri, agregando en cada una el contenido de un tubo de BHI agar,

---

<sup>220</sup> AFNOR. Antiseptiques et désinfectants. AFNOR NF T 72-150, Paris, 1995;17-39.

<sup>221</sup> European Committee for Standardization. Norma española UNE-EN 1040. Antisépticos y desinfectantes químicos. Actividad bactericida básica. Método de ensayo y requisitos (fase 1). AENOR, Madrid, 1997.

en sobrefusión a 50 °C. Las placas se agitaron suavemente para mezclar bien el contenido, se dejaron solidificar y se incubaron 48 horas a 37 °C. Transcurrido este tiempo se realizó el recuento de las colonias (N) de la suspensión de bacterias madre.

Se hicieron ensayos del neutralizante para aquellas soluciones irrigadoras cuyas concentraciones seleccionadas eran superiores a las que se había empleado anteriormente. Estas fueron las siguientes: 5,25% para el hipoclorito y 2% para la clorhexidina. Se utilizó el mismo procedimiento descrito en el apartado 3.6.2.

Una vez comprobada la eficacia de los neutralizantes se determinó la CMB en función del tiempo de contacto frente a la suspensión de *E. faecalis*. Para ello se prepararon tubos de 5 ml de capacidad con 0,9 ml de cada concentración de solución irrigadora y se les añadieron 0,1 ml de la suspensión de ensayo ( $1 - 3 \times 10^8$  ufc/ml). Se mantuvieron en contacto durante 30 segundos, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 y 60 minutos a 20 °C.

Transcurrido este tiempo, se procedió a la neutralización de cada solución irrigadora. Para ello se tomaron 0,25 ml de cada tubo y se añadieron a un tubo de 5 ml de capacidad con 2,25 ml de neutralizante a concentración simple. Se mantuvieron en contacto a 20 °C durante 10 minutos.

A continuación, se tomaron dos alícuotas de 1 ml de cada tubo y se depositaron en sus respectivas placas, añadiendo en cada una el contenido de un tubo de agar BHI, en sobrefusión a 50 °C. Se mezclaron bien, y una vez solidificadas se incubaron 48 horas a 37 °C. Transcurrido este tiempo se realizó el recuento de las colonias.

Cada solución irrigadora se probó en 3 experiencias distintas, 2 réplicas en cada una, obteniendo un total de 6 recuentos. Para el análisis descriptivo se calculó la media del logaritmo de los recuentos de células viables, de las 6 placas expuestas a los irrigantes (n) y de las 6 placas iniciales (N'). El recuento incontable se consideró a partir de 300 ufc/ml. Seguidamente, se calculó la reducción logarítmica de los recuentos, como se ha explicado anteriormente, considerando que una reducción  $\geq 5$  unidades indicaba que la solución tenía actividad bactericida.

### **3.7.1. Control de esterilidad**

Se realizó con objeto de comprobar la esterilidad de los reactivos utilizados una vez finalizada la experiencia. Se tomaron alícuotas de 1 ml de cada uno de los reactivos: diluyente, agua destilada y neutralizantes. Se añadieron a placas de Petri y se virtió en cada placa un tubo de agar BHI mantenido en sobrefusión a 50 °C. Una vez mezclados, se dejaron solidificar y se

incubaron 48 horas a 37 °C. Transcurrido este tiempo se observó si había crecimiento microbiano que indicaría contaminación; en su caso se desechó la experiencia.

### **3.8. Determinación de la concentración mínima para erradicar biopelículas de *E. faecalis* de las soluciones irrigadoras: hipoclorito sódico, clorhexidina, edta y ácidos cítrico y fosfórico**

Para determinar la concentración mínima para erradicar las biopelículas de *E. faecalis* se utilizó el dispositivo conocido originariamente como *Calgary Biofilm Device* (CBD; disponible comercialmente como MBEC™ High-throughput [HTP]; Innovotech Inc., Edmonton, Alberta, Canadá<sup>222</sup>), cuyo método fue descrito por primera vez por Ceri y cols.<sup>223</sup>. Este dispositivo consta de dos partes; la superior es una tapadera de poliestireno con 96 pivotes o *pegs* (llamada *peg lid*), que encaja en una placa de microtiter estándar de 96 pocillos. La parte inferior es un recipiente ondulado en el que se añade la suspensión bacteriana inicial. Cuando el dispositivo completo se coloca en una agitador de balanceo, el caldo fluye alrededor de los *pegs* favoreciendo la adhesión de las bacterias planctónicas a las paredes de éstos y de este modo se va formando una biopelícula; al mismo tiempo, las células planctónicas se desprenden de la superficie. Figura 4.

Las soluciones irrigadoras seleccionadas y las concentraciones iniciales fueron las mismas que las ensayadas para calcular la CMB, (Tabla 4), excepto: clorhexidina cuya concentración inicial fue del 4% y a partir de ella se realizaron 10 diluciones a la mitad (1/2, 1/4, 1/8, etc); el ácido cítrico del que igualmente, se hicieron 10 diluciones a la mitad a partir del 25%. Los tiempos de exposición de las biopelículas a las soluciones fueron 1, 5 y 10 minutos.

---

<sup>222</sup> Innovotech. Página web: <http://www.innovotech.ca/>. Acceso el 24 de enero de 2009.

<sup>223</sup> Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 1999;37:1771-6.

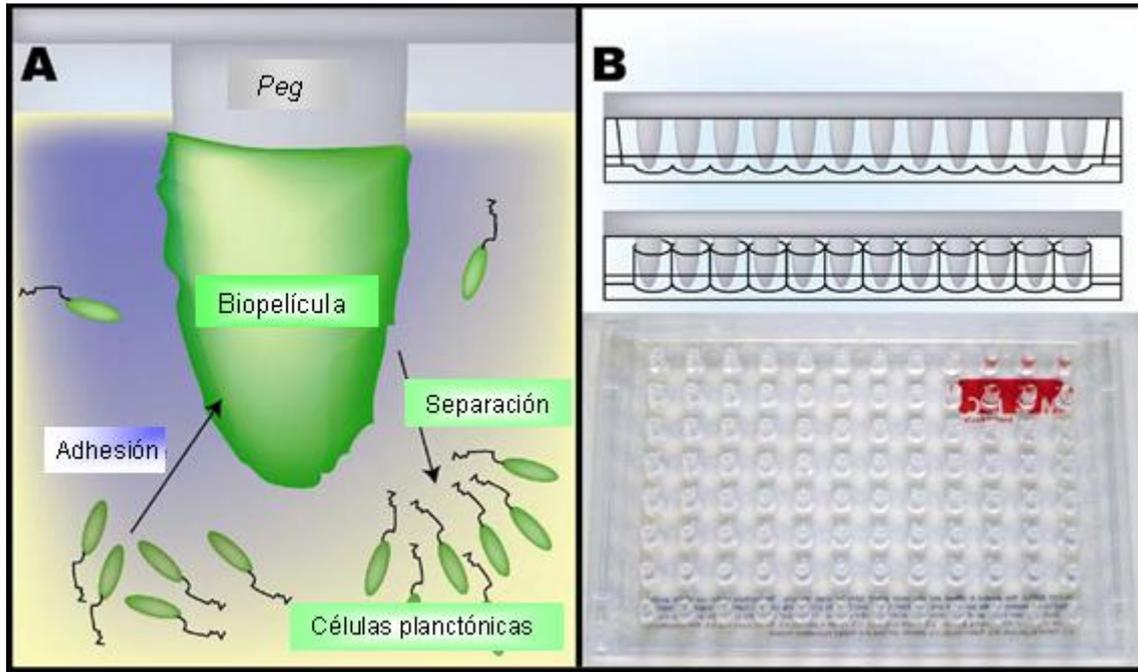


Figura 4. Dispositivo MBEC™ HTP. A) Las biopelículas se forman en las paredes de los *pegs* de poliestireno cuando las bacterias planctónicas se adhieren irreversiblemente a la superficie. A su vez las células planctónicas se separan de la superficie de la biopelícula. B) Detalle de la tapadera (*peg lid*) que consta de 96 *pegs* idénticos y encaja perfectamente en una placa de microtiter de 96 pocillos.

Para el estudio de la actividad de los irrigantes frente a biopelículas se usaron placas de microtiter de 96 pocillos de fondo plano (Nuncion Delta Surface, Nunc, Roskilde, Dinamarca). En función del contenido de cada una se denominaron:

- *Placa de lavado*: contiene 200  $\mu$ l de solución salina por pocillo. Se utilizó para el lavado de las biopelículas formadas en los *pegs* con el objetivo de eliminar las células planctónicas así como la solución irrigadora residual.
- *Placa C1*: contiene 200  $\mu$ l de solución salina en los pocillos de la fila A y 180  $\mu$ l de solución salina en los pocillos de las fila B a la F. Se utilizó para realizar las diluciones seriadas de las biopelículas iniciales.
- *Placa de ensayo*: es aquella en la que se añaden 200  $\mu$ l de cada solución irrigadora para exponerlos a las biopelículas.
- *Placa de recuperación*: contiene 200  $\mu$ l de caldo BHI por pocillo. Se utilizó para recuperar las biopelículas expuestas a los antisépticos.
- *Placa C2*: contiene 180  $\mu$ l de solución salina en los pocillos de las fila B a la F. En la fila A se añadieron 50  $\mu$ l de las biopelículas expuestas a los antisépticos resuspendidas en caldo BHI y sirvió para realizar las diluciones seriadas.

### 3.8.1. Formación de las biopelículas de *E. faecalis*

A partir del cultivo de *E. faecalis* mantenido a 4 °C, se hizo un primer subcultivo en una placa de BHI agar y se incubó 18 - 24 horas a 37 °C. Se comprobó la pureza del primer subcultivo observando que todas las colonias tuvieran la misma morfología. A partir de este primer subcultivo, se sembró un segundo y se incubó 18 - 24 horas a 37 °C. Una vez verificada la pureza del segundo subcultivo, se realizó una suspensión bacteriana a partir del mismo en BHI, y se ajustó a una densidad óptica 1.0. de la escala de McFarland (que equivale a  $3 \times 10^8$  ufc/ml) en un turbidímetro (bioMérieux S.A. France, modelo DENSIMAT IDN 002927, Marcy l'Etoile, Francia). A continuación, se añadieron 1 ml de esta suspensión y 29 ml de caldo BHI a un frasco de 100 ml de capacidad. Esta dilución 1/30 de la suspensión, que equivale aproximadamente a  $10^7$  ufc/ml, sirvió como inóculo inicial para el MBEC™ HTP.

Posteriormente se añadieron 22 ml del inóculo a la base del MBEC™ HTP y sobre ella se colocó la tapadera con los 96 *pegs*. El dispositivo completo se situó sobre el agitador de balanceo (OVAN, modelo Swing Sw 8 10000-00015, Badalona, España) en una incubadora a 37 °C y 95% de humedad relativa durante 24 horas, para facilitar la formación de las biopelículas. El agitador de balanceo oscila 5 revoluciones por minuto y forma un ángulo de  $\pm 8$  grados. Este movimiento es simétrico (Figura 5). Los *peg*s tienen un área de superficie de aproximadamente 109 mm<sup>2</sup> con una carga electrostática neutra. Una vez que el *peg lid* se coloca sobre la base del MBEC™ HTP, la punta redondeada del *peg* se sumerge alrededor de 3 - 4 mm en el medio. Durante el movimiento en el agitador de balanceo, la interfase aire-líquido se encuentra 4 - 5 mm por encima de la punta del *peg*<sup>224</sup>.

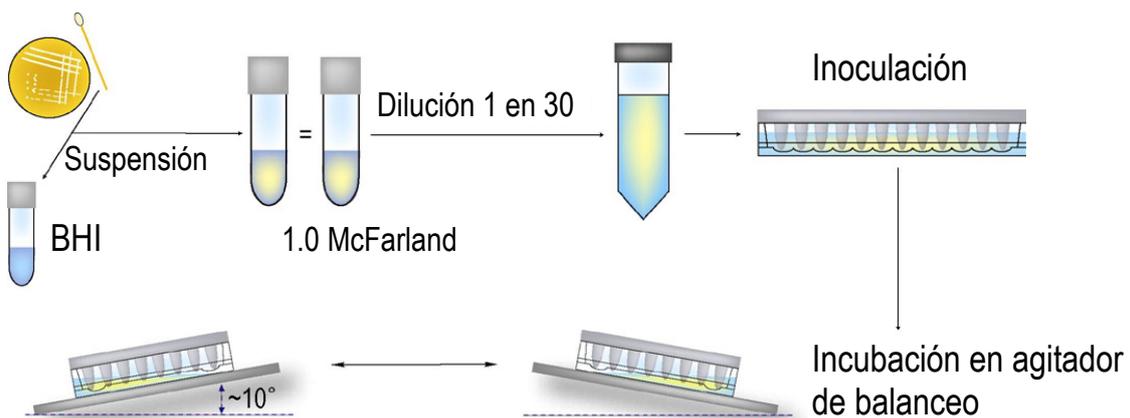


Figura 5. Inoculación del dispositivo MBEC™ HTP. A partir del segundo subcultivo, se realizó una suspensión bacteriana en BHI y se ajustó a una densidad óptica 1.0 de la escala de McFarland. Esta suspensión se diluyó 1/30 en BHI y sirvió para inocular la base del dispositivo con 22 ml. El dispositivo completo se incubó a 37 °C en un agitador de balanceo durante 24 horas.

<sup>224</sup> Harrison JJ, Ceri H, Yerly J, Stremick CA, Hu Y, Martinuzzi R, Turner RJ. The use of microscopy and three-dimensional visualization to evaluate the structure of microbial biofilms cultivated in the Calgary Biofilm Device. *Biol Proced Online* 2006;8:194-215.

Transcurrido el período de incubación, se retiró el dispositivo MBEC™ HTP del agitador de balanceo. A continuación, el resto de la experiencia se realizó en una cámara de flujo laminar (Telstar S.A., modelo Bio-II-B, Terrasa, España) para evitar la contaminación durante el procedimiento. El *peg lid* se separó de la base y se colocó sobre una *placa de lavado* sumergiendo los *pegs* en solución salina durante 2 minutos, con el fin de eliminar las bacterias débilmente adheridas a la biopelícula. La base del MBEC™ HTP se desechó. Seguidamente se cortaron 4 *pegs* alternos de la columna 1 (A1, C1, E1 y G1) de cada *peg lid*, con una hoja de bisturí del nº 15 (Paragon, Sheffield, Inglaterra) calentada al rojo cereza en un mechero Bunsen, para cuantificar la formación de biopelícula. Los *pegs* se introdujeron en los pocillos de la fila A de la *placa C1* y se vibraron en un baño de ultrasonido (Branson Ultrasonics Corporation, modelo 5510E-MT, Danbury, CT, USA) a 60 Hz durante 10 minutos; las vibraciones se transferían primero a través del agua, luego a través de la bandeja de acero y finalmente al dispositivo MBEC™ HTP, rompiendo las biopelículas de la superficie de los *pegs*. Una vez resuspendidas las biopelículas, se hicieron diluciones seriadas en solución salina ( $10^{-1}$  -  $10^{-5}$ ); para ello se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de las biopelículas recuperadas en los pocillos de la fila A, a los pocillos de la fila B que contenían 180  $\mu\text{l}$  de solución salina; de éstos se tomaron 20  $\mu\text{l}$  que se transfirieron a los de la fila C y, sucesivamente hasta la fila F. Gotas de 10  $\mu\text{l}$  de cada una de las diluciones se sembraron en placas de BHI agar. Éstas se incubaron a 37 °C durante 24 horas y se hicieron los recuentos. Este control de crecimiento sirvió para determinar el número inicial de bacterias en las biopelículas formadas en cada dispositivo.

En algunas experiencias se cortaron el resto de los *pegs* de la columna 1 (B1, D1, F1 y H1) siguiendo el mismo procedimiento y, se observaron al microscopio electrónico de campo de emisión mediante barrido (FESEM: *Field Emission Scanning Electron Micrograph*; modelo DSM 950 Zeiss, Oberkochen, Alemania) para comprobar la eficacia del método en la formación de biopelículas. Las muestras se prepararon en el Laboratorio de Preparación de Muestras Biológicas (LPMB) del Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada. El protocolo que se siguió fue el siguiente:

1. Las muestras se fijaron en una solución de glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato 0,1 M, pH = 7,4 durante 2 horas, a 4 °C.
2. Se lavaron en el mismo tampón (3 veces, 15 minutos cada una a 4 °C).
3. Las muestras se postfijaron con tetróxido de osmio al 1% en oscuridad durante 1 hora y a temperatura ambiente.
4. Se lavaron en agua destilada (3 veces, 5 minutos cada una).
5. Se deshidrataron en un gradiente de concentraciones crecientes de etanol, con los siguientes pasos: etanol 50%, 15 minutos; etanol 70%, 15 minutos; etanol 90%, 15 minutos y etanol 100%, 2 cambios de 15 minutos.

6. Se desecaron por el método por punto crítico<sup>225</sup> con dióxido de carbono en un secador de punto crítico (Polaron CPD7501).
7. Las muestras se recubrieron con oro-paladio (Sputter coater, Polaron SC7640).
8. Finalmente se observaron en el FESEM.

### 3.8.2. Determinación de curva de crecimiento

Previo al estudio de la actividad bactericida de los antisépticos se realizó una curva de crecimiento en medio líquido, con el objetivo de conocer el desarrollo de la biopelícula de *E. faecalis*. Para ello se generaron biopelículas siguiendo los pasos explicados previamente. Una vez formadas, las biopelículas se resuspendieron en BHI en la *placa de recuperación* que se incubó a 37 °C durante 24 horas. La densidad óptica de la *placa de recuperación* se midió en un espectrofotómetro (Asys Hitech GmbH, modelo Expert 96, Austria), a una longitud de onda de 650 nm, en intervalos de 1 hora durante las primeras 9 horas y, a las 24 horas. Se calculó la media y desviación estándar de los valores de absorbancia obtenidos.

### 3.8.3. Equivalencia de las biopelículas

Para determinar la fiabilidad del método, es decir, demostrar que las biopelículas formadas en los *pegs* del MBEC™ HTP eran estadísticamente equivalentes, se llevó a cabo la siguiente experiencia. Se obtuvo la media y desviación estándar del logaritmo de los recuentos de los *pegs* de cada fila, de la A a la H, a partir de 4 determinaciones realizadas en 4 *peg lids* diferentes. Los recuentos de cada fila se compararon globalmente mediante el análisis de la varianza de una vía (ANOVA).

### 3.8.4. Test de susceptibilidad a las soluciones irrigadoras

El test de susceptibilidad a los irrigantes se llevó a cabo en una placa de microtiter llamada *placa de ensayo* (Figura 6). El volumen final de los pocillos de esta placa fue de 200 µl para asegurar la completa inmersión de los *pegs* en el antimicrobiano. Se añadieron diez diluciones de cada solución irrigadora a lo largo de la *placa de ensayo*, desde la columna 2 a la 11. En las columnas 1 y 12 se añadió caldo BHI y sirvieron como control de esterilidad y control de crecimiento,

---

<sup>225</sup> Anderson TF. Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. Trans NY Acad Sci 1951;13:130-3.

respectivamente (en la columna 1 se habían cortado 4 *pegs* y en la columna 12 no había antiséptico). En cada *placa de ensayo* se repitieron dos filas de cada solución irrigadora, de modo que se probaron 4 irrigantes por placa. A su vez, cada una servía para un tiempo de exposición.

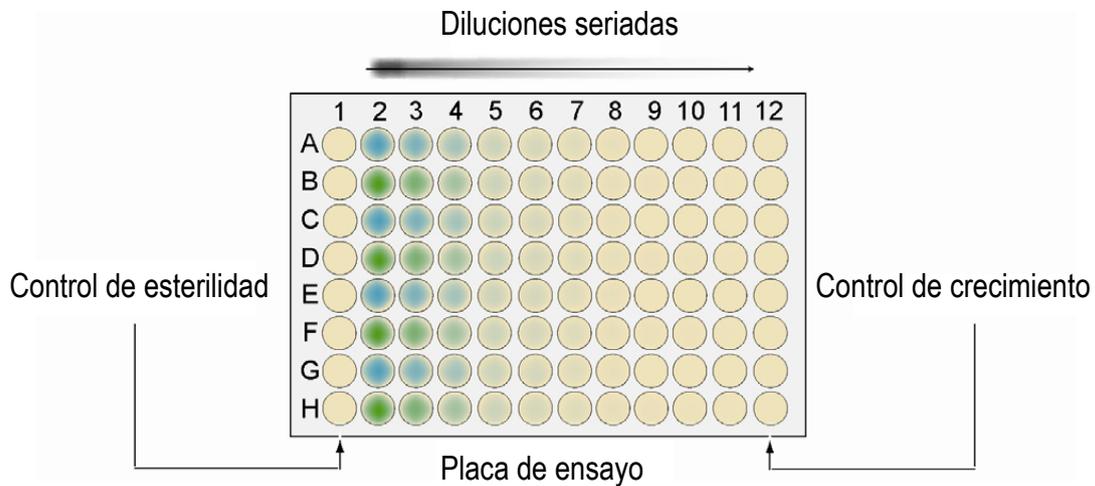


Figura 6. Placa de ensayo. En los pocillos de las columnas 2 - 11 se añadieron las diluciones de las soluciones irrigadoras. La columna 1 sirvió como control de esterilidad y la 12 como control de crecimiento.

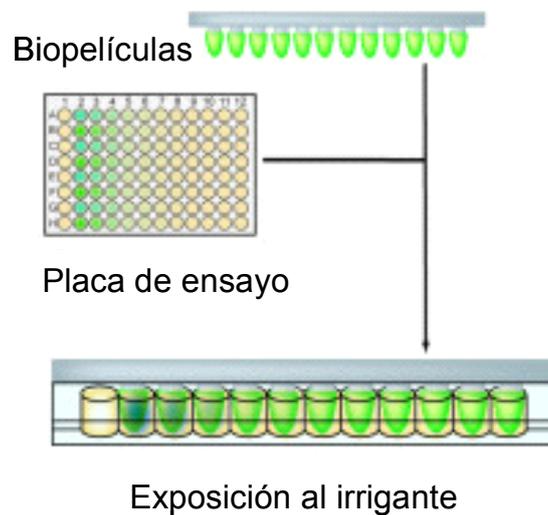


Figura 7. Exposición de la biopelícula a las soluciones irrigadoras. El *peg lid* se colocó en la placa de ensayo que contenía las soluciones irrigadoras y se mantuvieron en contacto durante el tiempo establecido.

En las siguientes operaciones era muy importante controlar el tiempo, por lo que se utilizó un cronómetro. Una vez preparada la *placa de ensayo*, el *peg lid* se sumergió en ella durante el tiempo previsto (Figura 7), transcurrido el cual se lavó dos veces en dos *placas de lavado*, durante 2 minutos cada una, para eliminar la posible actividad antibacteriana residual. A continuación, se transfirió a la *placa de recuperación* que contenía 200  $\mu\text{l}$  de caldo BHI por pocillo. Se sometió a vibración en el baño de ultrasonido durante 10 minutos con el objetivo de romper la estructura de la biopelícula y resuspenderla en el caldo (Figura 8).

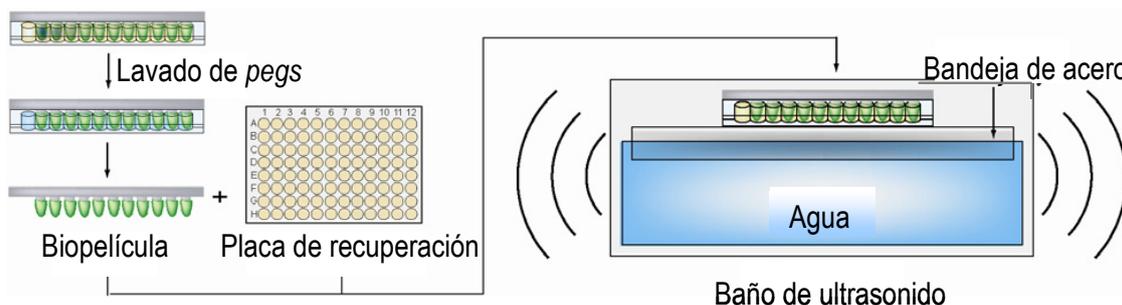


Figura 8. Recuperación de las biopelículas bacterianas. Tras la exposición a las soluciones irrigadoras, los *pegs* se lavaron dos veces en dos placas de lavado. Para la resuspensión de las biopelículas, el *peg lid* se introdujo en la placa de recuperación y se agitó en el baño de ultrasonido.

Después de la vibración, se retiró el *peg lid* y se desechó. A continuación, se hicieron diluciones seriadas de las biopelículas recuperadas de  $10^0$  a  $10^{-5}$  en la *placa C2*. Para ello, se tomaron 50  $\mu\text{l}$  de cada pocillo de la placa de recuperación y se transfirieron a los pocillos de la fila A de la *placa C2*; de ahí se tomaron 20  $\mu\text{l}$  y se añadieron a los pocillos de la fila B que contenía 180  $\mu\text{l}$  de solución salina y, sucesivamente hasta la fila F. De estas diluciones se sembraron gotas de 10  $\mu\text{l}$  en placas de BHI agar (12 gotas por placa). Se incubaron a 37 °C, 24 horas y se hicieron los recuentos de células viables. La *placa de recuperación* se incubó a 37 °C y a las 7 horas se midió la densidad óptica en el espectrofotómetro a 650 nm.

Cada solución irrigadora y tiempo de exposición se probó en tres *placas de prueba* distintas, dos repeticiones por placa, obteniendo un total de 6 determinaciones.

Para el análisis descriptivo se utilizó el programa Microsoft Excel 2007. Se obtuvo la media del logaritmo de los recuentos de células viables. A continuación, se calculó la reducción logarítmica  $\pm$  error estándar de los recuentos, siguiendo la siguiente ecuación:

**Reducción logarítmica =  $\log_{10}$  (ufc/ml iniciales) –  $\log_{10}$  (ufc/ml tras la exposición al irrigante)**

Las ufc/ml iniciales hacen referencia al número inicial de bacterias formado en las biopelículas antes de exponerlas a las soluciones irrigadoras en la *placa de ensayo*<sup>226</sup>. Siguiendo lo establecido en la norma AFNOR<sup>227</sup>, para que una concentración de la solución irrigadora tuviera actividad bactericida frente a las biopelículas de *E. faecalis* a un tiempo determinado, se tenía que producir una reducción de 5 unidades logarítmicas ( $10^5$ ) en el número de células bacterianas. Este valor lo calificamos como la Menor Concentración para Erradicar una Biopelícula (MCEB). Para el análisis descriptivo de las medidas de densidad óptica, se obtuvo la media y desviación estándar de las densidades ópticas medidas a las 7 horas.

### 3.9. Determinación de la concentración mínima para erradicar biopelículas de *E. faecalis* de clorhexidina, cetrimida y las combinaciones de ambos

Para el estudio de la concentración mínima de clorhexidina, cetrimida y las combinaciones de ambos para erradicar biopelículas, se siguió la misma metodología descrita en el apartado anterior, utilizando el MBEC™ HTP<sup>228</sup>. Se partió de soluciones de clorhexidina al 4% (ver Tabla 4), cetrimida al 1% y clorhexidina al 4% combinada con concentraciones constantes de cetrimida: 0,0025%, 0,005%, 0,01%, 0,02%, 0,05% y 0,1%. De todas ellas se hicieron 10 diluciones a la mitad (Tabla 6). Los tiempos de exposición seleccionados fueron 30 segundos, 1 y 2 minutos.

Tabla 6. Diluciones de las soluciones irrigadoras utilizadas para el cálculo de la MBEC de clorhexidina y cetrimida.

Dilución*	Soluciones irrigadoras (%)						
	CTR	CLX/CTR 0,0025%	CLX/CTR 0,005%	CLX/CTR 0,01%	CLX/CTR 0,02%	CLX/CTR 0,05%	CLX/CTR 0,1%
1/2	1	4/0,0025	4/0,005	4/0,01	4/0,02	4/0,05	4/0,1
1/4	0,5	2/0,0025	2/0,005	2/0,01	2/0,02	2/0,05	2/0,1
1/8	0,25	1/0,0025	1/0,005	1/0,01	1/0,02	1/0,05	1/0,1
1/16	0,125	0,5/0,0025	0,5/0,005	0,5/0,01	0,5/0,02	0,5/0,05	0,5/0,1
1/32	0,0625	0,25/0,0025	0,25/0,005	0,25/0,01	0,25/0,02	0,25/0,05	0,25/0,1
1/64	0,031	0,125/0,0025	0,125/0,005	0,125/0,01	0,125/0,02	0,125/0,05	0,125/0,1
1/128	0,016	0,0625/0,0025	0,0625/0,005	0,0625/0,01	0,0625/0,02	0,0625/0,05	0,0625/0,1
1/256	0,008	0,0313/0,0025	0,0313/0,005	0,0313/0,01	0,0313/0,02	0,0313/0,05	0,0313/0,1
1/512	0,004	0,0156/0,0025	0,0156/0,005	0,0156/0,01	0,0156/0,02	0,0156/0,05	0,0156/0,1
1/1024	0,002	0,0078/0,0025	0,0078/0,005	0,0078/0,01	0,0078/0,02	0,0078/0,05	0,0078/0,1

<sup>226</sup> Harrison JJ, Ceri H, Roper NJ, Badry EA, Sproule KM, Turner RJ. Persister cells mediate tolerance to metal oxyanions in *Escherichia coli*. *Microbiology* 2005;151:3181-95.

<sup>227</sup> AFNOR. Antiseptiques et désinfectants. AFNOR NF T 72-150, Paris, 1995;17-39.

<sup>228</sup> Innovotech. Página web: <http://www.innovotech.ca/>. Acceso el 24 de enero de 2009.

Brevemente, se inocularon 22 ml de la suspensión inicial (aproximadamente  $10^7$  ufc/ml) en el recipiente del MBEC™ HTP y, una vez colocado el *peg lid*, se incubaron en el agitador de balanceo durante 24 horas, a 37 °C y 95% de humedad relativa. Una vez formadas las biopelículas, los *pegs* se sumergieron en una *placa de lavado* para eliminar las bacterias débilmente adheridas a ellas. Seguidamente, se cortaron 4 *pegs* de la columna 1 (A1, C1, E1 y G1) para cuantificar la densidad de la biopelícula formada en los *pegs*. El resto de los *pegs* de la fila 1 se cortaron y algunos de ellos se observaron al microscopio electrónico FESEM.

A continuación, se preparó una *placa de ensayo* que contenía las diluciones de las soluciones (Tabla 6) en las columnas 2 - 11. Las columnas 1 y 12 sirvieron como control de esterilidad y control de crecimiento, respectivamente. El *peg lid* se colocó sobre la *placa de ensayo* durante 30 segundos, 1 y 2 minutos. Tras la exposición, el *peg lid* se lavó dos veces en dos *placas de lavado* durante 2 minutos cada una. Las biopelículas se colocaron en la *placa de recuperación*, se agitaron y se resuspendieron en caldo BHI. Una vez recuperadas se hicieron diluciones seriadas ( $10$  a  $10^{-5}$ ) en una *placa C2*, se sembraron gotas de 10  $\mu$ l en placas de BHI agar y se incubaron 24 horas a 37 °C. Posteriormente se realizaron los recuentos de células viables. Cada solución irrigadora y tiempo de exposición se probó en 2 - 3 *placas de prueba* distintas, dos repeticiones por placa, obteniendo un total de 4 - 6 determinaciones.

Para el análisis descriptivo, se obtuvo la media del logaritmo de los recuentos de células viables. A continuación, se calculó la reducción logarítmica de los recuentos, como se ha explicado anteriormente, considerando que una reducción  $\geq 5$  unidades logarítmicas erradicaba las biopelículas.

## **4. RESULTADOS**



#### 4.1. Eficacia de los neutralizantes frente a las diferentes soluciones irrigadoras

En la Tabla 7 se muestran los resultados de los ensayos de los neutralizantes. Todos los neutralizantes probados fueron efectivos en la neutralización de las soluciones irrigadoras correspondientes y ninguno de ellos presentó actividad antimicrobiana.

Tabla 7. Eficacia de los neutralizantes frente a las soluciones irrigadoras. Recuentos bacterianos (ufc/ml)\*.

Solución irrigadora	Neutralizante	N	N'	n'
NaOCl	A	201,5	207,5	224,75
CLX	B	159,5	148,17	141,83
EDTA	C	167,25	155	144
Ácido cítrico	D	196,83	189,33	138,33
Ácido ortofosfórico	E	184,5	168,83	157,5

\*Valores medios de tres experiencias; N: recuento de la suspensión madre (dilución  $10^{-6}$ ); N': 5 minutos de contacto de la suspensión bacteriana con el neutralizante; n': 10 minutos de contacto entre solución irrigadora y neutralizante y, después 5 minutos de contacto con la suspensión bacteriana; criterios de validez del neutralizante:  $N \cong N'$ ;  $n' \geq 0,5 N'$ .

#### 4.2. Concentración mínima bactericida de las soluciones irrigadoras frente *E. faecalis* en suspensión

La concentración mínima bactericida se determinó en un tiempo de contacto con la suspensión de *E. faecalis* de 5 minutos. La CMB del hipoclorito sódico fue la más baja, un 0,0063%. Para clorhexidina la CMB fue del 0,5%. La solución de EDTA no demostró actividad bactericida frente a *E. faecalis* en ninguna de las 10 diluciones en que se probó. El ácido cítrico presentó actividad bactericida a partir de una concentración del 20%. Finalmente, en relación al ácido fosfórico, la CMB obtenida fue del 2,5% (Tabla 8).

Tabla 8. Reducción logarítmica de los recuentos de *E. faecalis* en suspensión tras 5 minutos de exposición a las soluciones irrigadoras. Media  $\pm$  error estándar.

NaOCl (%)		CLX (%)		EDTA (%)		Ácido cítrico (%)		Ácido fosfórico (%)	
0,1	6,30 $\pm$ 0,04	1	5,53 $\pm$ 1,61	17	3,74 $\pm$ 0,18	25	6,29 $\pm$ 0,30	5	6,27 $\pm$ 0,29
0,05	6,30 $\pm$ 0,04	<b>0,5</b>	<b>5,70<math>\pm</math>1,44</b>	8,5	3,74 $\pm$ 0,18	<b>20</b>	<b>6,29<math>\pm</math>0,30</b>	<b>2,5</b>	<b>5,61<math>\pm</math>1,02</b>
0,025	6,30 $\pm$ 0,04	0,25	4,08 $\pm$ 1,37	4,25	3,74 $\pm$ 0,18	15	4,04 $\pm$ 1,03	1,25	4,03 $\pm$ 1,15
0,0125	6,30 $\pm$ 0,04	0,125	3,82 $\pm$ 0,71	2,125	3,74 $\pm$ 0,18	10	3,82 $\pm$ 0,30	0,625	3,86 $\pm$ 0,60
<b>0,0063</b>	<b>6,30<math>\pm</math>0,04</b>	0,0625	3,72 $\pm$ 0,25	1,0625	3,74 $\pm$ 0,18	5	3,82 $\pm$ 0,30	0,3125	3,79 $\pm$ 0,29
0,0031	3,83 $\pm$ 0,04	0,0313	3,72 $\pm$ 0,25	0,5313	3,74 $\pm$ 0,18	2,5	3,82 $\pm$ 0,30	0,1563	3,79 $\pm$ 0,29
0,0016	3,83 $\pm$ 0,04	0,0156	3,72 $\pm$ 0,25	0,2656	3,74 $\pm$ 0,18	1,25	3,82 $\pm$ 0,30	0,0781	3,79 $\pm$ 0,29
0,0008	3,83 $\pm$ 0,04	0,0078	3,72 $\pm$ 0,25	0,1328	3,74 $\pm$ 0,18	0,625	3,82 $\pm$ 0,30	0,0391	3,79 $\pm$ 0,29
0,0004	3,83 $\pm$ 0,04	0,0039	3,72 $\pm$ 0,25	0,0664	3,74 $\pm$ 0,18	0,3125	3,82 $\pm$ 0,30	0,0195	3,79 $\pm$ 0,29
0,0002	3,83 $\pm$ 0,04	0,0002	3,72 $\pm$ 0,25	0,0332	3,74 $\pm$ 0,18	0,1563	3,82 $\pm$ 0,30	0,0098	3,79 $\pm$ 0,29

CMB: reducción log  $\geq$  5.

En la Tabla 9 se expresan los resultados de las concentraciones mínimas bactericidas de las soluciones irrigadoras probadas.

Tabla 9. CMB de las soluciones irrigadoras tras 5 minutos de contacto con *E. faecalis* en suspensión.

Solución irrigadora	CMB (%)
NaOCl	0,0063
CLX	0,5
EDTA	No detectada
Ácido cítrico	20
Ácido fosfórico	2,5

### 4.3. Concentración mínima bactericida de las soluciones irrigadoras frente *E. faecalis* en suspensión en función del tiempo de exposición

A fin de determinar el tiempo necesario para que las soluciones irrigadoras, a las concentraciones seleccionadas, ejercieran su actividad bactericida sobre la suspensión bacteriana, los tiempos de exposición fueron: 30 segundos, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 y 60 minutos.

Como se observa en la Tabla 10, las soluciones de hipoclorito sódico a concentraciones del 0,5%, 1%, 2,5% y 5,25% ejercieron su efecto bactericida en el menor de los tiempos ensayados, 30 segundos. La clorhexidina al 2% y 0,2% requirió tiempos de 3 y 10 minutos, respectivamente, para alcanzar el nivel de efectividad (5 unidades de reducción). Para una concentración del 0,12% fueron necesarios 25 minutos (Tabla 11).

Las reducciones logarítmicas de los recuentos de células viables tras la exposición a las soluciones ácidas se exponen en la Tabla 12. La solución de EDTA al 17% no mostró ningún efecto bactericida después de estar 60 minutos en contacto con la suspensión de *E. faecalis*. En el caso de ácido cítrico, fue necesario un tiempo de 10 minutos al 10% y de 3 minutos al 25%. Por último, el ácido fosfórico cuando se utilizó al 2,5% requirió 5 minutos, mientras que al 5% ejerció su efecto a los 3 minutos.

En todos los casos, los controles de esterilidad dieron recuentos negativos.

Tabla 10. Reducción logarítmica de los recuentos de *E. faecalis* en suspensión tras 0,5 - 60 minutos de exposición al hipoclorito sódico. Media  $\pm$  error estándar.

Tiempo (min)	NaOCl 0,5%	NaOCl 1%	NaOCl 2,5%	NaOCl 5,25%
0,5	<b>6,40<math>\pm</math>0,35</b>	<b>6,45<math>\pm</math>0,48</b>	<b>6,38<math>\pm</math>0,32</b>	<b>6,39<math>\pm</math>0,33</b>
1	6,40 $\pm$ 0,35	6,45 $\pm$ 0,48	6,38 $\pm$ 0,32	6,39 $\pm$ 0,33
3	6,40 $\pm$ 0,35	6,45 $\pm$ 0,48	6,38 $\pm$ 0,32	6,39 $\pm$ 0,33
5	6,40 $\pm$ 0,35	6,45 $\pm$ 0,48	6,38 $\pm$ 0,32	6,39 $\pm$ 0,33
10	6,40 $\pm$ 0,35	6,45 $\pm$ 0,48	6,38 $\pm$ 0,32	6,39 $\pm$ 0,33
15	6,40 $\pm$ 0,35	6,45 $\pm$ 0,48	6,38 $\pm$ 0,32	6,39 $\pm$ 0,33
20	6,40 $\pm$ 0,35	6,45 $\pm$ 0,48	6,38 $\pm$ 0,32	6,39 $\pm$ 0,33
25	6,40 $\pm$ 0,35	6,45 $\pm$ 0,48	6,38 $\pm$ 0,32	6,39 $\pm$ 0,33
30	6,40 $\pm$ 0,35	6,45 $\pm$ 0,48	6,38 $\pm$ 0,32	6,39 $\pm$ 0,33
40	6,40 $\pm$ 0,35	6,45 $\pm$ 0,48	6,38 $\pm$ 0,32	6,39 $\pm$ 0,33
50	6,40 $\pm$ 0,35	6,45 $\pm$ 0,48	6,38 $\pm$ 0,32	6,39 $\pm$ 0,33
60	6,40 $\pm$ 0,35	6,45 $\pm$ 0,48	6,38 $\pm$ 0,32	6,39 $\pm$ 0,33

Tabla 11. Reducción logarítmica de los recuentos de *E. faecalis* en suspensión tras 0,5 - 60 minutos de exposición a clorhexidina. Media  $\pm$  error estándar.

Tiempo (min)	CLX 0,12%	CLX 0,2%	CLX 2%
0,5	4,04 $\pm$ 0,13	4,04 $\pm$ 0,13	4,07 $\pm$ 0,15
1	4,04 $\pm$ 0,13	4,04 $\pm$ 0,13	4,14 $\pm$ 0,44
3	4,04 $\pm$ 0,13	4,04 $\pm$ 0,13	<b>6,55<math>\pm</math>0,15</b>
5	4,04 $\pm$ 0,13	4,04 $\pm$ 0,13	6,55 $\pm$ 0,15
10	4,04 $\pm$ 0,13	<b>5,20<math>\pm</math>0,38</b>	6,55 $\pm$ 0,15
15	4,04 $\pm$ 0,13	6,09 $\pm$ 1,21	6,55 $\pm$ 0,15
20	4,32 $\pm$ 0,97	6,52 $\pm$ 0,13	6,55 $\pm$ 0,15
25	<b>5,41<math>\pm</math>1,14</b>	6,52 $\pm$ 0,13	6,55 $\pm$ 0,15
30	6,18 $\pm$ 1,06	6,52 $\pm$ 0,13	6,55 $\pm$ 0,15
40	6,52 $\pm$ 0,13	6,52 $\pm$ 0,13	6,55 $\pm$ 0,15
50	6,52 $\pm$ 0,13	6,52 $\pm$ 0,13	6,55 $\pm$ 0,15
60	6,52 $\pm$ 0,13	6,52 $\pm$ 0,13	6,55 $\pm$ 0,15

Tabla 12. Reducción logarítmica de los recuentos de *E. faecalis* en suspensión tras 0,5 - 60 minutos de exposición a las soluciones ácidas. Media  $\pm$  error estándar.

Tiempo (min)	EDTA 17%	Ácido cítrico 10%	Ácido cítrico 25%	Ácido fosfórico 2,5%	Ácido fosfórico 5%
0,5	4,05 $\pm$ 0,17	4,04 $\pm$ 0,17	4,04 $\pm$ 0,17	4,05 $\pm$ 0,11	4,04 $\pm$ 0,11
1	4,05 $\pm$ 0,17	4,04 $\pm$ 0,17	4,04 $\pm$ 0,17	4,05 $\pm$ 0,84	4,04 $\pm$ 0,11
3	4,05 $\pm$ 0,17	4,04 $\pm$ 0,17	<b>6,52<math>\pm</math>0,17</b>	4,05 $\pm$ 0,84	<b>6,51<math>\pm</math>0,11</b>
5	4,05 $\pm$ 0,17	4,17 $\pm$ 0,60	6,52 $\pm$ 0,17	<b>6,53<math>\pm</math>0,11</b>	6,51 $\pm$ 0,11
10	4,05 $\pm$ 0,17	<b>6,52<math>\pm</math>0,17</b>	6,52 $\pm$ 0,17	6,53 $\pm$ 0,11	6,51 $\pm$ 0,11
15	4,05 $\pm$ 0,17	6,52 $\pm$ 0,17	6,52 $\pm$ 0,17	6,53 $\pm$ 0,11	6,51 $\pm$ 0,11
20	4,05 $\pm$ 0,17	6,52 $\pm$ 0,17	6,52 $\pm$ 0,17	6,53 $\pm$ 0,11	6,51 $\pm$ 0,11
25	4,05 $\pm$ 0,17	6,52 $\pm$ 0,17	6,52 $\pm$ 0,17	6,53 $\pm$ 0,11	6,51 $\pm$ 0,11
30	4,05 $\pm$ 0,17	6,52 $\pm$ 0,17	6,52 $\pm$ 0,17	6,53 $\pm$ 0,11	6,51 $\pm$ 0,11
40	4,05 $\pm$ 0,17	6,52 $\pm$ 0,17	6,52 $\pm$ 0,17	6,53 $\pm$ 0,11	6,51 $\pm$ 0,11
50	4,05 $\pm$ 0,17	6,52 $\pm$ 0,17	6,52 $\pm$ 0,17	6,53 $\pm$ 0,11	6,51 $\pm$ 0,11
60	4,05 $\pm$ 0,17	6,52 $\pm$ 0,17	6,52 $\pm$ 0,17	6,53 $\pm$ 0,11	6,51 $\pm$ 0,11

En la Tabla 13 se detallan los tiempos que requieren las soluciones irrigadoras, a las concentraciones seleccionadas para ejercer un efecto bactericida sobre las suspensiones de *E. faecalis*.

Tabla 13. Tiempos de contacto necesarios para que las soluciones irrigadoras ejerzan actividad bactericida frente a *E. faecalis* en suspensión.

Solución irrigadora (%)	Tiempo	
<b>NaOCI</b>	0,5	< 30 sg
	1	< 30 sg
	2,5	< 30 sg
	5,25	< 30 sg
<b>CLX</b>	0,12	25 min
	0,2	10 min
	2	3 min
<b>EDTA</b>	17	No detectada
<b>Ácido cítrico</b>	10	10 min
	25	3 min
<b>Ácido fosfórico</b>	2,5	5 min
	5	3 min

#### 4.4. Caracterización de las biopelículas por microscopía electrónica

La caracterización de las biopelículas se llevó a cabo utilizando el microscopio FESEM. En las Figuras siguientes se puede observar la morfología de la biopelícula creada en la superficie del *peg* tras 24 horas de incubación a 37 °C. Como se aprecia en la Figura 9, la biopelícula se dispone en capas bacterianas de espesor medio cubiertas de una matriz polimérica extracelular donde las células están embebidas. Además, se observan agrupaciones típicas de diplococos y secreciones poliméricas que interconectan las células; estas secreciones sirven como sostén para la deposición de material extracelular que da lugar a una matriz (Figura 10). Un detalle a mayor aumento puede observarse en la Figura 11.

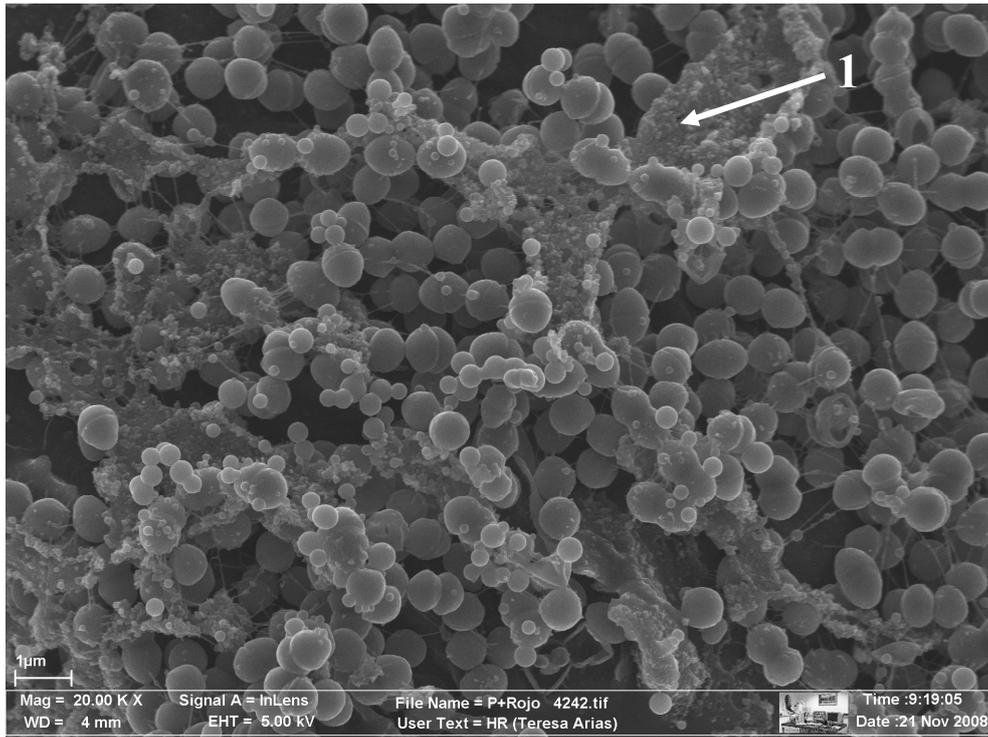


Figura 9. Fotografía al FESEM de la biopelícula de *E. faecalis* formada sobre los pegs tras 24 horas de incubación a 37 °C. Detalle 1: matriz polimérica extracelular.

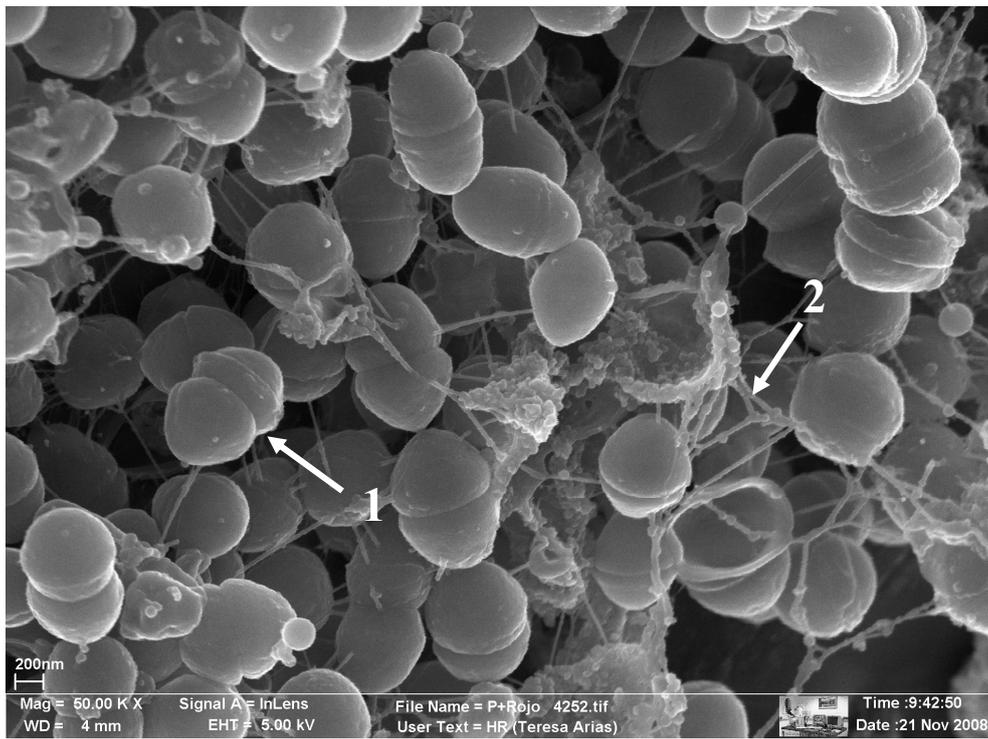


Figura 10. Estructura de la biopelícula de *E. faecalis* observada al FESEM. Detalle 1: agrupaciones típicas en diplococos. Detalle 2: fibras poliméricas.

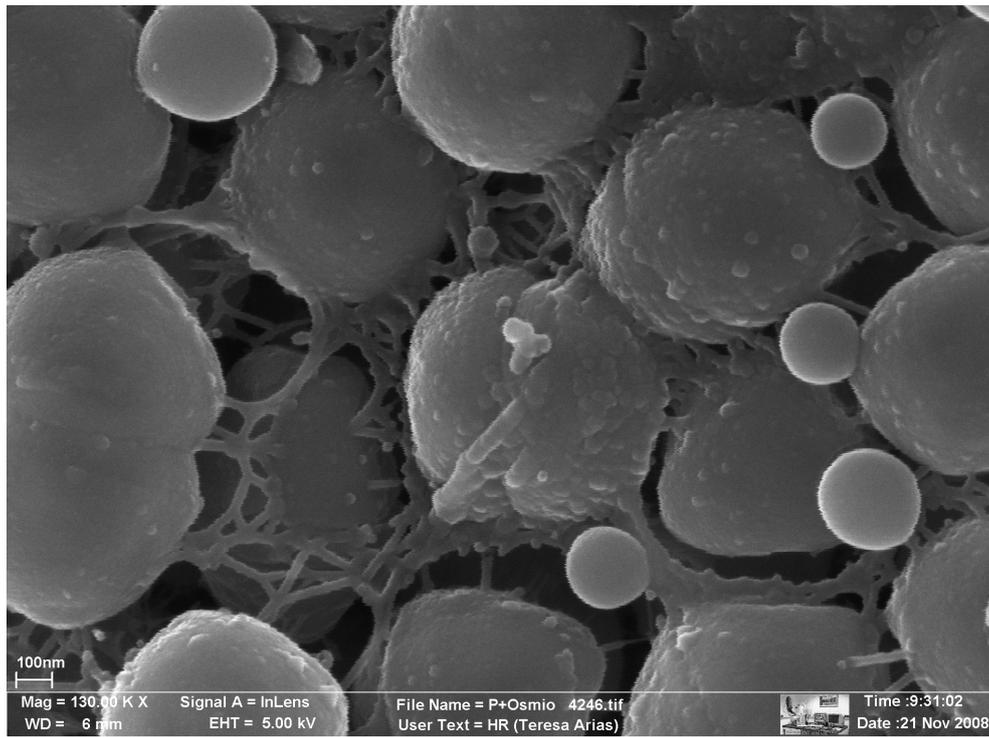


Figura 11. Detalle a mayor aumento de la biopelícula de *E. faecalis* observada al FESEM.

#### 4.5. Curva de crecimiento de la biopelícula de *E. faecalis*

En la Figura 12 se muestra la evolución de la densidad óptica a 650 nm ( $D.O._{650\text{ nm}}$ ) en función del tiempo de las biopelículas de *E. faecalis* resuspendidas en medio BHI. En ella observamos que la fase logarítmica o exponencial, en la que las bacterias alcanzan el ritmo máximo de duplicación, corresponde al intervalo de 5 a 7 horas. A partir de aquí el crecimiento se ralentiza y se equilibra con la muerte celular, es la fase estacionaria. A las 24 horas la bacteria se encuentra en la fase de muerte exponencial ya que no se observa crecimiento y la pendiente de la curva desciende suavemente.

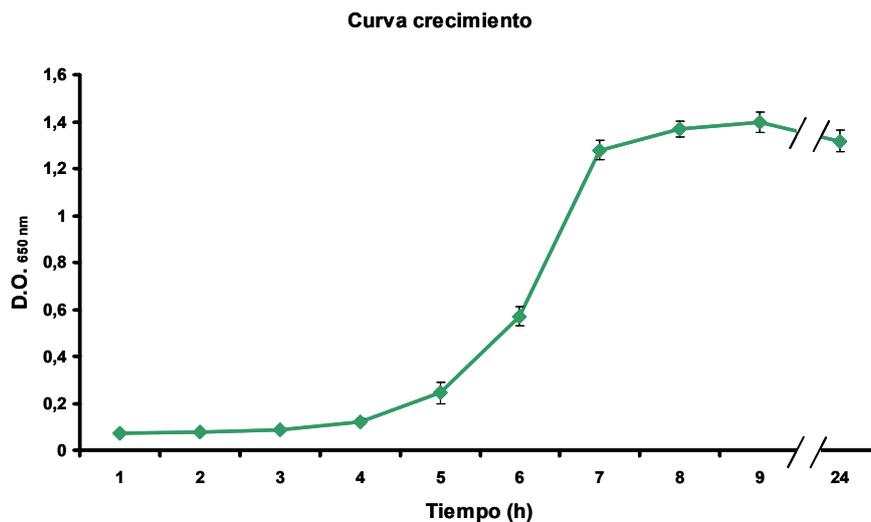


Figura 12. Curva de crecimiento de las biopelículas *E. faecalis* resuspendidas en BHI a 37 °C. Media y desviación estándar de D.O. 650 nm.

#### 4.6. Equivalencia de las biopelículas

En la Figura 13 se muestra la media y desviación estándar del logaritmo de los recuentos de las biopelículas de *E. faecalis*, formadas en la superficie de los *pegs* de las filas A - H, a partir de las determinaciones llevadas a cabo en 4 *peg lids* distintos. No hubo diferencias significativas entre la densidad celular media de las biopelículas formadas en las distintas filas ( $p = 0,8116$ ) usando el análisis de la varianza de una vía (ANOVA).

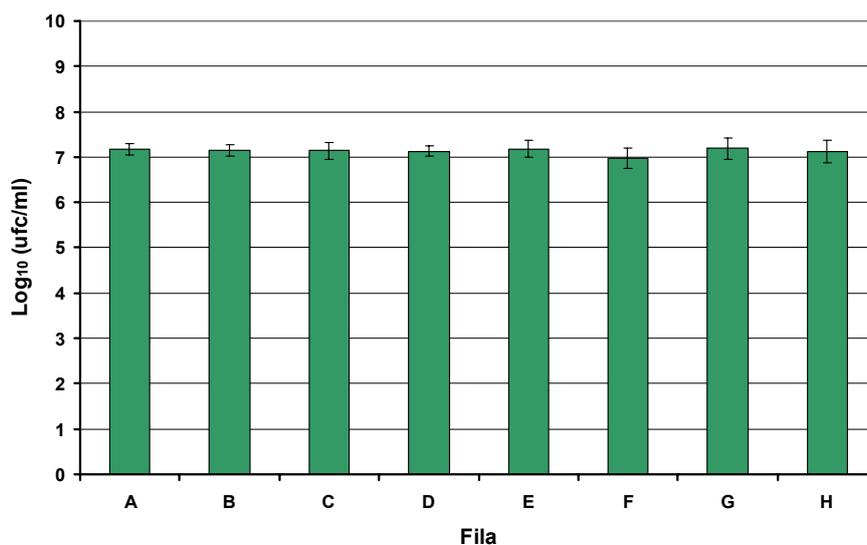


Figura 13. Crecimiento de las biopelículas de *E. faecalis* en el MBEC™ HTP. Media y desviación estándar del logaritmo de los recuentos de las filas A - H de 4 *peg lids*.

#### 4.7. Concentración mínima para erradicar biopelículas de *E. faecalis* de las soluciones irrigadoras: hipoclorito sódico, clorhexidina, edta y ácidos cítrico y fosfórico

La MCEB o menor concentración de las distintas soluciones para reducir en 5 unidades logarítmicas los recuentos bacterianos de las biopelículas, se muestra en las Tablas 14 - 17. El hipoclorito sódico fue la solución más efectiva ya que las erradicó a partir de 1 minuto de exposición a una concentración de 0,0063%. A los 5 minutos ejerció actividad bactericida al 0,0016% y a los 10 minutos al 0,0008% (Tabla 14). A partir de las concentraciones indicadas para cada tiempo, los valores de reducción logarítmica disminuyeron en forma prácticamente paralela. Tras 1 minuto los valores de reducción logarítmica de clorhexidina se mantuvieron por debajo de 5 para cualquiera de las concentraciones utilizadas. La MCEB a los 5 minutos fue del 2% y del 1% a los 10 minutos, descendiendo por debajo de 5 unidades a partir de estas concentraciones de una manera similar. Ver Tabla 15.

En el caso de la solución de EDTA, la reducción logarítmica se mantuvo por debajo de 5 unidades tras 1, 5 y 10 minutos de contacto y a cualquier dilución (datos no mostrados). En cuanto al ácido cítrico, los valores de reducción logarítmica se sitúan por debajo del nivel límite (5 unidades) para cualquiera de los tiempos y concentraciones utilizadas (Tabla 16). Resultados similares se obtuvieron para el ácido fosfórico, con valores ligeramente por debajo de los indicados para el ácido cítrico (Tabla 17).

Tabla 14. Reducción logarítmica de los recuentos de células viables de biopelículas de *E. faecalis* tras 1, 5 y 10 minutos de exposición al hipoclorito sódico. Media  $\pm$  error estándar.

NaOCl (%)	Tiempo (min)		
	1	5	10
0,1	7,02 $\pm$ 0,44	6,77 $\pm$ 1,06	7,49 $\pm$ 0,80
0,05	7,02 $\pm$ 0,44	6,77 $\pm$ 1,06	7,49 $\pm$ 0,80
0,025	7,02 $\pm$ 0,44	6,77 $\pm$ 1,06	7,49 $\pm$ 0,80
0,0125	7,02 $\pm$ 0,44	6,77 $\pm$ 1,06	7,49 $\pm$ 0,80
0,0063	<b>7,02<math>\pm</math>0,44</b>	6,77 $\pm$ 1,06	7,49 $\pm$ 0,80
0,0031	4,54 $\pm$ 0,83	6,77 $\pm$ 1,06	7,49 $\pm$ 0,80
0,0016	3,10 $\pm$ 1,42	<b>6,77<math>\pm</math>1,06</b>	7,49 $\pm$ 0,80
0,0008	2,84 $\pm$ 1,20	3,28 $\pm$ 1,92	<b>7,49<math>\pm</math>0,80</b>
0,0004	2,00 $\pm$ 1,70	3,35 $\pm$ 1,46	4,21 $\pm$ 1,69
0,0002	0,67 $\pm$ 1,10	2,23 $\pm$ 1,40	2,94 $\pm$ 1,26

MCEB: reducción log  $\geq$  5.

Tabla 15. Reducción logarítmica de los recuentos de células viables de biopelículas de *E. faecalis* tras 1, 5 y 10 minutos de exposición a clorhexidina. Media  $\pm$  error estándar.

CLX (%)	Tiempo (min)		
	1	5	10
4	4,13 $\pm$ 0,68	7,30 $\pm$ 0,28	7,13 $\pm$ 0,43
2	4,02 $\pm$ 0,64	<b>7,30<math>\pm</math>0,28</b>	7,13 $\pm$ 0,43
1	3,12 $\pm$ 0,86	4,34 $\pm$ 1,02	<b>7,13<math>\pm</math>0,43</b>
0,5	2,39 $\pm$ 0,63	4,00 $\pm$ 1,64	3,91 $\pm$ 1,76
0,25	2,38 $\pm$ 0,81	2,57 $\pm$ 2,06	3,54 $\pm$ 0,70
0,125	1,92 $\pm$ 0,58	2,50 $\pm$ 1,82	3,01 $\pm$ 1,14
0,0625	2,22 $\pm$ 0,90	2,12 $\pm$ 1,31	2,99 $\pm$ 1,23
0,0313	2,03 $\pm$ 0,67	2,06 $\pm$ 1,40	2,71 $\pm$ 1,50
0,0156	1,87 $\pm$ 1,06	1,96 $\pm$ 0,59	1,92 $\pm$ 1,45
0,0078	1,26 $\pm$ 0,70	1,79 $\pm$ 0,52	1,67 $\pm$ 1,21

MCEB: reducción log  $\geq$  5.

Tabla 16. Reducción logarítmica de los recuentos de células viables de biopelículas de *E. faecalis* tras 1, 5 y 10 minutos de exposición al ácido cítrico. Media  $\pm$  error estándar.

Ácido cítrico (%)	Tiempo (min)		
	1	5	10
25	4,60 $\pm$ 0,60	4,48 $\pm$ 1,90	4,07 $\pm$ 1,17
12,5	4,10 $\pm$ 0,26	5,07 $\pm$ 1,70	4,28 $\pm$ 1,30
6,25	3,90 $\pm$ 0,61	4,31 $\pm$ 1,74	4,34 $\pm$ 1,71
3,125	3,94 $\pm$ 0,09	3,83 $\pm$ 1,50	4,34 $\pm$ 1,65
1,5625	3,86 $\pm$ 0,33	3,76 $\pm$ 1,19	4,37 $\pm$ 1,52
0,7813	3,46 $\pm$ 0,12	3,95 $\pm$ 1,55	4,22 $\pm$ 1,24
0,3906	2,78 $\pm$ 0,55	3,87 $\pm$ 1,78	3,85 $\pm$ 1,43
0,1953	2,87 $\pm$ 0,45	3,76 $\pm$ 1,25	3,57 $\pm$ 1,61
0,0977	1,92 $\pm$ 0,50	3,81 $\pm$ 1,26	3,77 $\pm$ 1,60
0,0488	0,55 $\pm$ 0,13	3,32 $\pm$ 1,18	3,58 $\pm$ 1,56

MCEB: reducción log  $\geq$  5.

Tabla 17. Reducción logarítmica de los recuentos de células viables de biopelículas de *E. faecalis* tras 1, 5 y 10 minutos de exposición al ácido fosfórico. Media  $\pm$  error estándar.

Ácido fosfórico (%)	Tiempo (min)		
	1	5	10
5	3,59 $\pm$ 0,56	3,50 $\pm$ 0,53	3,84 $\pm$ 1,33
2,5	3,36 $\pm$ 0,10	3,13 $\pm$ 3,13	3,51 $\pm$ 1,45
1,25	3,54 $\pm$ 0,64	2,24 $\pm$ 1,16	3,17 $\pm$ 1,68
0,625	2,92 $\pm$ 1,32	2,54 $\pm$ 1,00	3,67 $\pm$ 0,68
0,3125	3,84 $\pm$ 0,62	3,41 $\pm$ 1,06	4,06 $\pm$ 1,79
0,1563	3,67 $\pm$ 0,50	3,36 $\pm$ 1,03	4,18 $\pm$ 1,62
0,0781	2,71 $\pm$ 0,41	3,44 $\pm$ 1,03	3,78 $\pm$ 0,97
0,0391	2,45 $\pm$ 0,24	3,17 $\pm$ 0,68	2,91 $\pm$ 1,00
0,0195	1,74 $\pm$ 0,59	3,35 $\pm$ 0,06	2,96 $\pm$ 1,69
0,0098	1,51 $\pm$ 0,48	1,39 $\pm$ 1,01	1,27 $\pm$ 2,19

MCEB: reducción log  $\geq$  5.

En la Tabla 18 se observan las MCEB de las soluciones irrigadoras después de estar 1, 5 y 10 minutos en contacto con las biopelículas de *E. faecalis*.

Tabla 18. MCEB de las soluciones irrigadoras tras 1, 5 y 10 minutos de exposición a biopelículas de *E. faecalis*.

Solución irrigadora	Tiempo (min)		
	1	5	10
NaOCI	0,0063%	0,0016%	0,0008%
CLX	No detectada	2%	1%
EDTA	No detectada	No detectada	No detectada
Ácido cítrico	No detectada	No detectada	No detectada
Ácido fosfórico	No detectada	No detectada	No detectada

#### 4.7.1. Evolución de las densidades ópticas

En las Figuras 14 - 18 se muestra la evolución de la densidad óptica a 650 nm de las biopelículas de *E. faecalis* resuspendidas en BHI, tras su exposición a las soluciones irrigadoras durante 1, 5 y 10 minutos. Como se observa, en el caso del hipoclorito sódico (Figura 14) la

densidad óptica de la suspensión bacteriana se mantiene constante en su nivel inicial hasta una concentración de 0,0004% a los 5 y 10 minutos. A partir de aquí hay un incremento en la densidad óptica más acentuado a los 5 minutos. Cuando el tiempo de exposición es de 1 minuto, la densidad óptica se mantiene igualmente constante hasta una concentración más elevada (0,0031%) a partir de la cual los valores aumentan notablemente.

En relación a la clorhexidina (Figura 15), la densidad óptica comienza a incrementar de manera progresiva a una concentración del 1% tras 1 minuto de contacto, del 0,5% tras 5 minutos y del 0,125% a los 10 minutos. Los valores de densidad óptica en el caso de la solución de EDTA (Figura 16) se mantienen constantes en su valor inicial (alrededor de D.O. 1,3) con ligeras oscilaciones para los 5 minutos. Por lo que respecta al ácido cítrico, no se aprecia crecimiento bacteriano hasta una concentración de 0,3906% tras 1 minuto de contacto, y a una concentración de 0,0977% tras 5 minutos. Por el contrario, cuando el tiempo de exposición es de 10 minutos no hay crecimiento bacteriano a cualquiera de las concentraciones empleadas. Estos resultados se muestran en la Figura 17.

El comportamiento del ácido fosfórico (Figura 18) es similar al descrito para el ácido cítrico con ligeras variaciones. Así, cuando el tiempo de exposición es de 1 minuto el crecimiento se mantiene inhibido hasta una concentración de 0,0781%; esto mismo ocurre para un tiempo de 5 minutos, pero en este caso, el aumento de densidad óptica es notablemente más lenta. Para un tiempo de 10 minutos, el crecimiento queda estabilizado hasta una concentración de 0,0195%, aumentando ligeramente a partir de la misma.

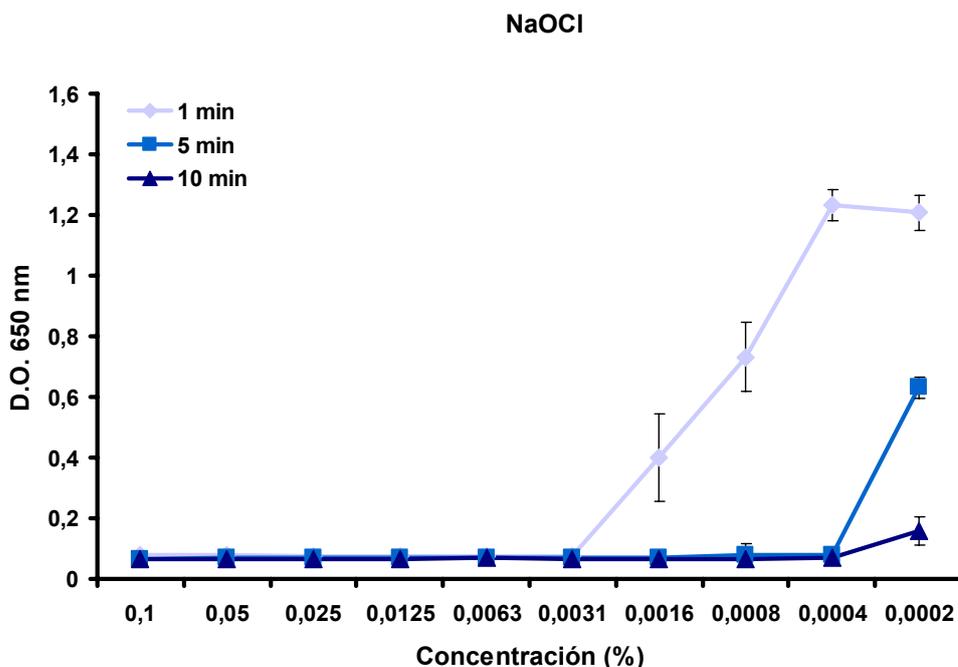


Figura 14. Efecto del hipoclorito sódico sobre biopelículas de *E. faecalis* tras 1, 5 y 10 minutos. Media y desviación estándar de D.O. <sub>650 nm</sub> a las 7 horas.

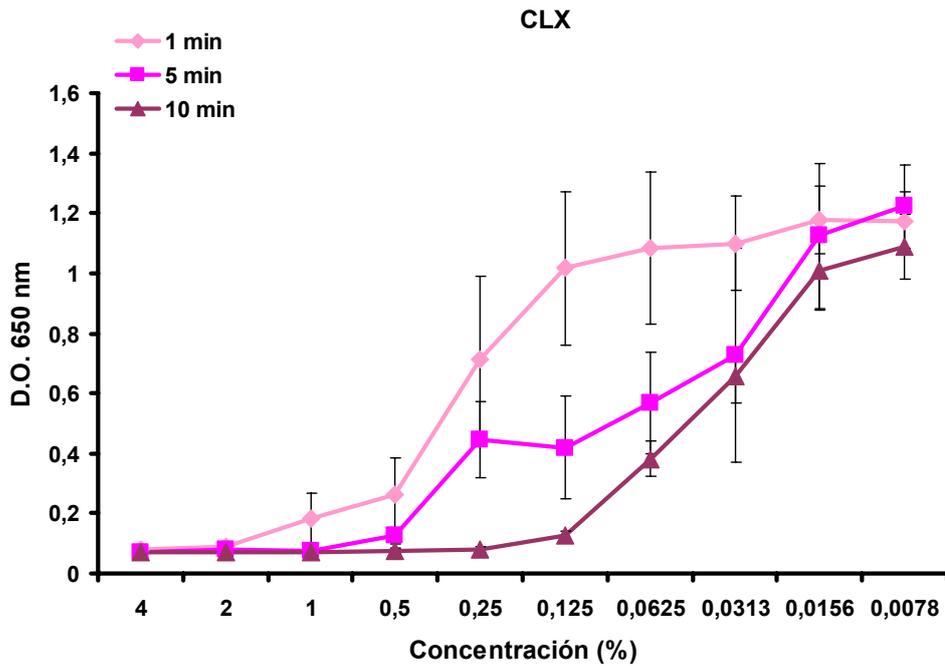


Figura 15. Efecto de clorhexidina sobre biopelículas de *E. faecalis* tras 1, 5 y 10 minutos. Media y desviación estándar de D.O. <sub>650 nm</sub> a las 7 horas.

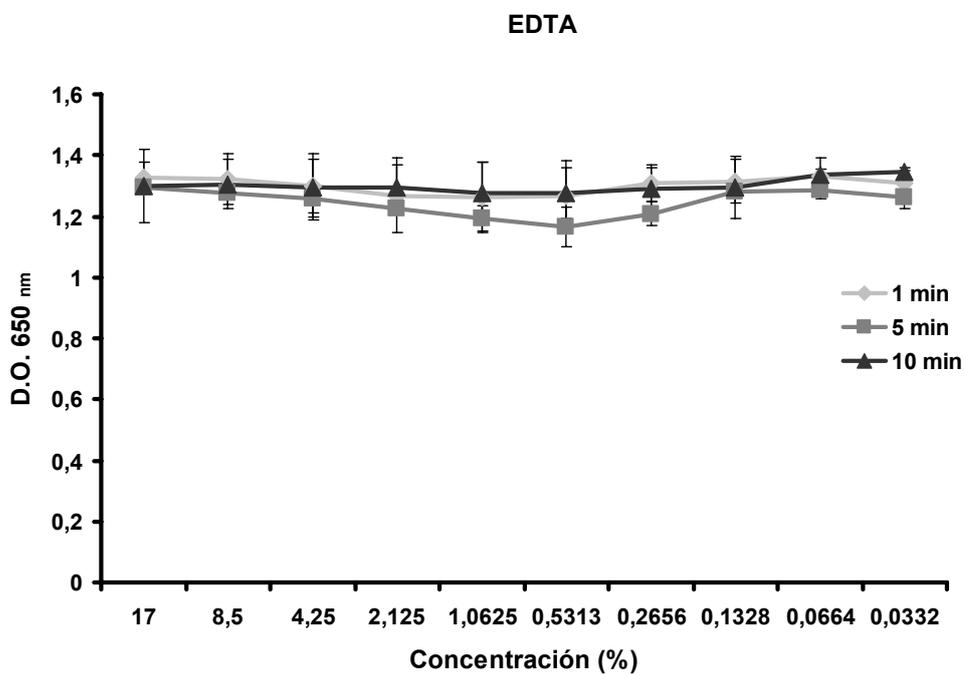


Figura 16. Efecto del EDTA sobre biopelículas de *E. faecalis* tras 1, 5 y 10 minutos. Media y desviación estándar de D.O. <sub>650 nm</sub> a las 7 horas.

Ácido cítrico

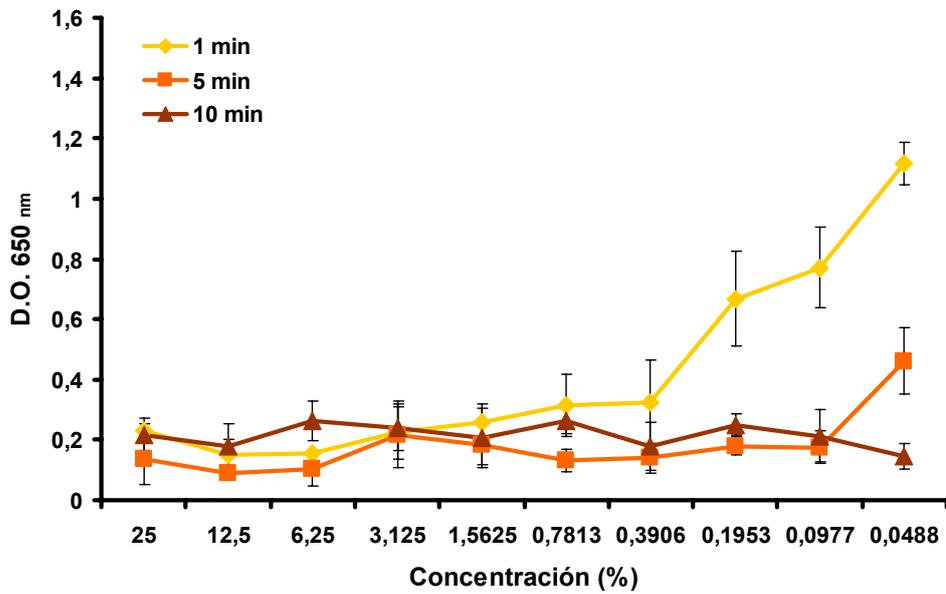


Figura 17. Efecto del ácido cítrico sobre biopelículas de *E. faecalis* tras 1, 5 y 10 minutos. Media y desviación estándar de D.O. <sub>650 nm</sub> a las 7 horas.

Ácido fosfórico

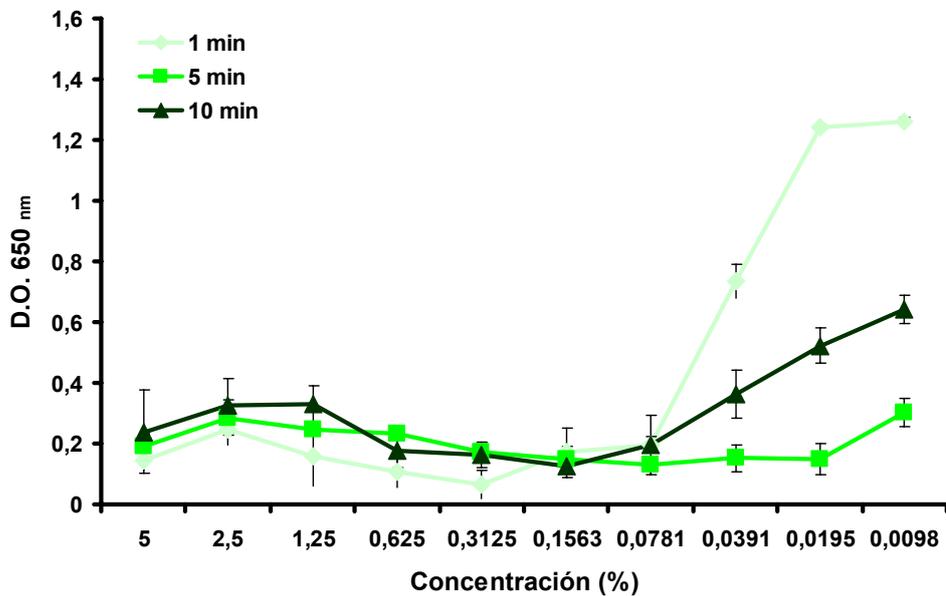


Figura 18. Efecto del ácido fosfórico sobre biopelículas de *E. faecalis* tras 1, 5 y 10 minutos. Media y desviación estándar de D.O. <sub>650 nm</sub> a las 7 horas.

#### 4.8. Concentración mínima para erradicar biopelículas de *E. faecalis* de clorhexidina, cetrimida y las combinaciones de ambos

En las Tablas 19 – 23 se recoge la reducción logarítmica de los recuentos de células viables de las biopelículas de *E. faecalis*, tras exponerlas a las soluciones de clorhexidina, cetrimida y la combinación de ambos durante 30 segundos, 1 y 2 minutos. La clorhexidina no ejerció actividad bactericida a ninguno de los tiempos ni concentraciones probadas (datos no mostrados). La MCEB de cetrimida fue del 0,5% tras 30 segundos, del 0,0312% tras 1 minuto y del 0,0078% tras 2 minutos de contacto con las biopelículas de *E. faecalis* (Tabla 19).

Cuando se combinó clorhexidina con cetrimida al 0,0025% y al 0,005% no se detectó actividad bactericida a los 30 segundos; a un tiempo de contacto de 1 minuto, la MCEB fue CLX 2%/CTR 0,0025% y CLX 1%/CTR 0,005%; a los 2 minutos, las soluciones de cetrimida al 0,0025% y 0,005% ejercieron su acción cuando se combinaron con clorhexidina al 2% (Tablas 20 y 21).

La actividad bactericida a los 30 segundos se observó a partir de combinaciones con cetrimida al 0,01%. Así la MCEB fue CLX 0,5%/CTR 0,01% mientras que a 1 minuto fue de CLX 0,25%/CTR 0,01% y, tras 2 minutos todas las combinaciones ejercieron actividad (Tabla 22). Por otro lado, cuando la concentración de cetrimida fue del 0,02%, la actividad bactericida se detectó junto con clorhexidina 0,5% a los 30 segundos, con clorhexidina 0,0625% al minuto y a cualquier concentración tras dos minutos de exposición (Tabla 23).

Por último, todas las combinaciones de clorhexidina con cetrimida al 0,05% y 0,1% revelaron actividad bactericida frente biopelículas de *E. faecalis* a todas las diluciones y tiempos probados (datos no mostrados).

Tabla 19. Reducción logarítmica de los recuentos de células viables de biopelículas de *E. faecalis* tras 30 segundos, 1 y 2 minutos de exposición a cetrimida. Media  $\pm$  error estándar.

CTR (%)	Tiempo		
	30 sg	1 min	2 min
1	5,47 $\pm$ 0,44	5,91 $\pm$ 0,45	6,82 $\pm$ 0,08
0,5	<b>5,47<math>\pm</math>0,44</b>	5,91 $\pm$ 0,45	6,82 $\pm$ 0,08
0,25	2,71 $\pm$ 0,50	5,91 $\pm$ 0,45	6,82 $\pm$ 0,08
0,125	2,45 $\pm$ 1,05	5,91 $\pm$ 0,45	6,82 $\pm$ 0,08
0,0625	2,64 $\pm$ 0,90	5,91 $\pm$ 0,45	6,82 $\pm$ 0,08
0,0312	1,66 $\pm$ 0,77	<b>5,91<math>\pm</math>0,45</b>	6,82 $\pm$ 0,08
0,0156	1,80 $\pm$ 1,43	2,63 $\pm$ 0,87	6,82 $\pm$ 0,08
0,0078	1,72 $\pm$ 1,51	2,63 $\pm$ 0,87	<b>6,82<math>\pm</math>0,08</b>
0,0039	1,60 $\pm$ 1,11	2,48 $\pm$ 1,10	4,12 $\pm$ 1,04
0,0019	0,21 $\pm$ 0,94	2,34 $\pm$ 2,34	3,54 $\pm$ 0,68

MCEB: reducción  $\log \geq 5$ .

Tabla 20. Reducción logarítmica de los recuentos de células viables de biopelículas de *E. faecalis* tras 30 segundos, 1 y 2 minutos de exposición a combinaciones de clorhexidina/cetrimida 0,0025%. Media  $\pm$  error estándar.

CLX/CTR (%)	Tiempo		
	30 sg	1 min	2 min
4/0,0025	3,25 $\pm$ 1,23	6,70 $\pm$ 0,04	6,25 $\pm$ 0,46
2/0,0025	3,06 $\pm$ 1,42	<b>5,20<math>\pm</math>1,36</b>	<b>5,92<math>\pm</math>0,37</b>
1/0,0025	2,84 $\pm$ 1,25	4,16 $\pm$ 0,25	2,98 $\pm$ 0,36
0,5/0,0025	1,69 $\pm$ 0,66	3,53 $\pm$ 0,15	2,35 $\pm$ 0,26
0,25/0,0025	1,76 $\pm$ 0,99	3,23 $\pm$ 0,22	2,34 $\pm$ 0,31
0,125/0,0025	1,46 $\pm$ 1,01	2,68 $\pm$ 0,44	2,05 $\pm$ 0,50
0,0625/0,0025	1,42 $\pm$ 1,00	2,40 $\pm$ 0,21	2,16 $\pm$ 0,24
0,0313/0,0025	1,29 $\pm$ 0,84	2,44 $\pm$ 0,32	2,27 $\pm$ 0,40
0,0156/0,0025	1,15 $\pm$ 0,69	2,26 $\pm$ 0,62	3,51 $\pm$ 0,83
0,0078/0,0025	1,31 $\pm$ 0,73	2,30 $\pm$ 0,40	1,80 $\pm$ 1,32

MCEB: reducción  $\log \geq 5$ .

Tabla 21. Reducción logarítmica de los recuentos de células viables de biopelículas de *E. faecalis* tras 30 segundos, 1 y 2 minutos de exposición a combinaciones de clorhexidina/cetrimida 0,005%. Media  $\pm$  error estándar.

CLX/CTR (%)	Tiempo		
	30 sg	1 min	2 min
4/0,005	4,02 $\pm$ 1,99	6,70 $\pm$ 0,04	6,82 $\pm$ 0,08
2/0,005	3,42 $\pm$ 1,13	6,70 $\pm$ 0,04	<b>6,82<math>\pm</math>0,08</b>
1/0,005	3,55 $\pm$ 0,01	<b>6,70<math>\pm</math>0,04</b>	3,50 $\pm$ 0,29
0,5/0,005	3,17 $\pm$ 0,86	4,41 $\pm$ 0,53	3,11 $\pm$ 0,48
0,25/0,005	3,13 $\pm$ 1,29	4,00 $\pm$ 0,32	3,50 $\pm$ 0,53
0,125/0,005	2,83 $\pm$ 1,07	3,77 $\pm$ 0,44	2,82 $\pm$ 0,23
0,0625/0,005	2,48 $\pm$ 1,04	3,52 $\pm$ 0,48	2,74 $\pm$ 0,20
0,0313/0,005	2,12 $\pm$ 0,90	2,31 $\pm$ 0,08	2,95 $\pm$ 0,46
0,0156/0,005	2,06 $\pm$ 0,08	2,26 $\pm$ 0,19	2,77 $\pm$ 0,16
0,0078/0,005	2,04 $\pm$ 0,16	2,19 $\pm$ 0,21	3,02 $\pm$ 0,78

MCEB: reducción log  $\geq$  5.

Tabla 22. Reducción logarítmica de los recuentos de células viables de biopelículas de *E. faecalis* tras 30 segundos, 1 y 2 minutos de exposición a combinaciones de clorhexidina/cetrimida 0,01%. Media  $\pm$  error estándar.

CLX/CTR (%)	Tiempo		
	30 sg	1 min	2 min
4/0,01	5,44 $\pm$ 0,78	6,67 $\pm$ 0,34	6,82 $\pm$ 0,08
2/0,01	5,44 $\pm$ 0,78	6,67 $\pm$ 0,34	6,82 $\pm$ 0,08
1/0,01	5,44 $\pm$ 0,78	6,67 $\pm$ 0,34	6,82 $\pm$ 0,08
0,5/0,01	<b>5,44<math>\pm</math>0,78</b>	6,67 $\pm$ 0,34	6,82 $\pm$ 0,08
0,25/0,01	2,38 $\pm$ 1,83	<b>6,67<math>\pm</math>0,34</b>	6,82 $\pm$ 0,08
0,125/0,01	1,80 $\pm$ 1,37	3,89 $\pm$ 0,94	6,82 $\pm$ 0,08
0,0625/0,01	1,96 $\pm$ 1,17	4,19 $\pm$ 0,67	6,82 $\pm$ 0,08
0,0313/0,01	2,03 $\pm$ 1,29	3,17 $\pm$ 1,06	6,82 $\pm$ 0,08
0,0156/0,01	2,03 $\pm$ 1,27	3,48 $\pm$ 0,77	6,82 $\pm$ 0,08
0,0078/0,01	1,78 $\pm$ 1,08	3,24 $\pm$ 1,08	<b>6,82<math>\pm</math>0,08</b>

MCEB: reducción log  $\geq$  5.

Tabla 23. Reducción logarítmica de los recuentos de células viables de biopelículas de *E. faecalis* tras 30 segundos, 1 y 2 minutos de exposición a combinaciones de clorhexidina/cetrimida 0,02%. Media  $\pm$  error estándar.

CLX/CTR (%)	Tiempo		
	30 sg	1 min	2 min
4/0,02	5,55 $\pm$ 0,20	6,51 $\pm$ 0,91	6,82 $\pm$ 0,08
2/0,02	5,55 $\pm$ 0,20	6,51 $\pm$ 0,91	6,82 $\pm$ 0,08
1/0,02	5,55 $\pm$ 0,20	6,51 $\pm$ 0,91	6,82 $\pm$ 0,08
0,5/0,02	<b>5,55<math>\pm</math>0,20</b>	6,51 $\pm$ 0,91	6,82 $\pm$ 0,08
0,25/0,02	3,07 $\pm$ 0,53	6,51 $\pm$ 0,91	6,82 $\pm$ 0,08
0,125/0,02	2,75 $\pm$ 0,91	6,51 $\pm$ 0,91	6,82 $\pm$ 0,08
0,0625/0,02	2,23 $\pm$ 1,19	<b>6,51<math>\pm</math>0,91</b>	6,82 $\pm$ 0,08
0,0313/0,02	2,36 $\pm$ 0,52	3,21 $\pm$ 1,35	6,82 $\pm$ 0,08
0,0156/0,02	1,58 $\pm$ 0,52	3,47 $\pm$ 1,06	6,82 $\pm$ 0,08
0,0078/0,02	0,71 $\pm$ 0,48	3,31 $\pm$ 1,19	<b>6,82<math>\pm</math>0,08</b>

MCEB: reducción log  $\geq$  5.

En la Tabla 24 se muestran las MCEB de clorhexidina, cetrimida y las combinaciones de ambas tras 10 segundos, 1 y 2 minutos de contacto con biopelículas de *E. faecalis*.

Tabla 24. MCEB de las soluciones irrigadoras tras 30 segundos, 1 y 2 minutos de exposición a biopelículas de *E. faecalis*.

Solución irrigadora	Tiempo		
	30 sg	1 min	2 min
CLX	No detectada	No detectada	No detectada
CTR	0,5%	0,0312%	0,0078%
CLX/CTR 0,0025%	No detectada	CLX 2%/CTR 0,0025%	CLX 2%/CTR 0,0025%
CLX/CTR 0,005%	No detectada	CLX 1%/CTR 0,005%	CLX 2%/CTR 0,005%
CLX/CTR 0,01%	CLX 0,5%/CTR 0,01%	CLX 0,25%/CTR 0,01%	< CLX 0,0078%/CTR 0,01%
CLX/CTR 0,02%	CLX 0,5%/CTR 0,02%	CLX 0,0625%/CTR 0,02%	< CLX 0,0078%/CTR 0,02%
CLX/CTR 0,05 %	< CLX 0,0078%/CTR 0,05%	< CLX 0,0078%/CTR 0,05%	< CLX 0,0078%/CTR 0,05%
CLX/CTR 0,1%	< CLX 0,0078%/CTR 0,1%	< CLX 0,0078%/CTR 0,1%	< CLX 0,0078%/CTR 0,1%

## **5. DISCUSIÓN**



## 5.1. *Enterococcus faecalis*

La bacteria seleccionada fue *E. faecalis*, coco grampositivo anaerobio facultativo, por estar muy implicada en las infecciones persistentes de los conductos radiculares<sup>229,230</sup>. Su capacidad para sobrevivir al tratamiento endodóntico, subsistiendo como patógeno en los túbulos dentinarios, así como su alta resistencia a los agentes antimicrobianos, hacen de él uno de los microorganismos más utilizados para estudiar la actividad antimicrobiana de las soluciones irrigadoras en endodoncia. En este trabajo de investigación se ha seleccionado la cepa CECT 795 (ATCC 29212) de *E. faecalis*, por ser una cepa de referencia utilizada en la mayoría de los trabajos publicados.

## 5.2. Soluciones irrigadoras

Uno de los requisitos importantes de una solución irrigadora ideal es que sea capaz de eliminar los microorganismos del sistema de conductos radiculares, es decir, que tenga capacidad antiséptica. Los antisépticos son sustancias químicas que, aplicadas sobre material vivo, eliminan microorganismos patógenos. Para que sean eficaces deben ejercer su acción en un breve período de tiempo y, además, ser bactericidas. Valorar la actividad bactericida de un antiséptico requiere, por tanto, determinar la CMB frente a bacterias en suspensión y la MCEB frente a biopelículas.

En este trabajo de investigación se han seleccionado tres soluciones irrigadoras cuya capacidad antiséptica es conocida, hipoclorito sódico, clorhexidina y cetrimida. El hipoclorito es la más utilizada, a pesar de no existir aún acuerdo universal sobre su concentración óptima, seguida de clorhexidina. La clorhexidina combinada con cetrimida ha demostrado una alta actividad antimicrobiana<sup>231</sup> sobre suspensiones de *E. faecalis*, lo que nos llevó a estudiar su acción bactericida frente a biopelículas.

Además, se escogieron tres agentes quelantes, EDTA, ácido cítrico y ácido fosfórico. Su efecto antimicrobiano, en un principio, podría ser indirecto mediante la eliminación del barrillo dentinario facilitando la penetración intratubular del hipoclorito sódico y, permitiendo la eliminación de bacterias y biopelículas adheridas a la pared dentinaria<sup>232</sup>. Sin embargo, el uso recomendado de

<sup>229</sup> Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998;31:1-7.

<sup>230</sup> Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004;30:315-20.

<sup>231</sup> Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. *J Endod* 2006;32:138-41.

<sup>232</sup> Yoshida T, Shibata T, Shinohara T, Gomyo S, Sekine I. Clinical evaluation of the efficacy of EDTA solution as an endodontic irrigant. *J Endod* 1995;21:592-3.

estos agentes como soluciones irrigadoras y los escasos y controvertidos resultados sobre su actividad antimicrobiana frente a ambas formas de crecimiento, nos llevaron a incluirlos en el presente estudio.

### 5.3. Estudio de la CMB

#### 5.3.1. Validez interna del estudio

En este trabajo de investigación se ha determinado la CMB de cinco soluciones irrigadoras, utilizando el método de dilución-neutralización para la valoración de antisépticos y desinfectantes, de acuerdo con la norma AFNOR NF T 72-150<sup>233</sup> en un tiempo de contacto con *E. faecalis* de 5 min<sup>234</sup>. Basándonos en la misma, se ha evaluado el tiempo que requieren estas soluciones para ejercer su actividad bactericida, a distintas concentraciones de uso en endodoncia. La CMB es la mínima concentración de antiséptico ensayada capaz de reducir en 5 unidades logarítmicas ( $10^{-5}$ ) una suspensión de bacterias en un tiempo de contacto establecido con el antiséptico<sup>235</sup>. Los procedimientos más utilizados para evaluar la actividad bactericida de un antiséptico son los ensayos *in vitro* cuantitativos con microorganismos en suspensión y entre ellos el de dilución-neutralización<sup>236</sup>.

La mayor parte de los estudios *in vitro* sobre la capacidad antiséptica de las soluciones irrigadoras utilizan el test de difusión en agar (TDA)<sup>237,238,239</sup> y el test de contacto directo (TCD) cualitativo<sup>240</sup> o cuantitativo<sup>241</sup>.

En este estudio no se ha utilizado el test de difusión en agar porque los resultados pueden estar condicionados, además de por la mayor o menor sensibilidad del antimicrobiano, por múltiples factores que enmascararían los resultados: el pH del medio, la capacidad de difusión de la

---

<sup>233</sup> AFNOR. Antiseptiques et désinfectants. AFNOR NF T 72-150, Paris, 1995;17-39.

<sup>234</sup> Espigares E, Bueno A, Espigares M, Gálvez R. Isolation of *Salmonella* serotypes in wastewater and effluent: Effect of treatment and potential risk. *Int J Hyg Environ-Health* 2006;2009:103-7.

<sup>235</sup> Russel AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ. Evaluation of antibacterial and antifungal efficacy. *En: Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*. 3ª ed. Blackwell Science LTD. Oxford;1999:124-48.

<sup>236</sup> AFNOR. Antiseptiques et désinfectants. AFNOR NF T 72-150, Paris, 1995;17-39.

<sup>237</sup> Siqueira JF Jr, Batista MM, Fraga RC, de Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod* 1998;24:414-6.

<sup>238</sup> Estrela C, Ribeiro RG, Estrela CRA, Pecora JD, Sousa-Neto MD. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Braz Dent J* 2003;14:58-62.

<sup>239</sup> Torabinejad M, Shabahang S, Aprecio RM, Kettering JD. The antimicrobial effect of MTAD: an *in vitro* investigation. *J Endod* 2003;29:400-3.

<sup>240</sup> Gomes BPPA, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2001;34:424-8.

<sup>241</sup> Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, Hababeh N, Qualtrough A, Worthington H, Drucker DB. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2004;37:438-46.

solución irrigadora así como la interacción de dichas soluciones con alguno de los componentes del medio de cultivo<sup>242,243,244</sup>.

Los ensayos de exposición directa pueden ser cualitativos o cuantitativos. Los test cualitativos no se han usado porque poseen una desventaja para los objetivos establecidos en el presente trabajo. Basta que sobreviva una sola célula bacteriana para que aparezca turbidez en el medio, por tanto el resultado macroscópico sería el mismo que si sobreviviera casi toda la población bacteriana, denotando una falta de actividad del desinfectante sobre el inóculo. Los resultados serían reproducibles siempre que el efecto bactericida fuese total y no sobreviviera ninguna bacteria<sup>245</sup>.

En los ensayos cuantitativos se realiza el recuento de las bacterias que sobreviven tras la exposición al agente probado, y se compara con el tamaño del inóculo inicial. Entre los distintos métodos que utilizan estos test se encuentra el método de dilución-neutralización. Este método requiere el uso de un agente neutralizante para frenar la acción de la solución irrigadora y permitir valorar su actuación en función del tiempo. Otros métodos cuantitativos son poco precisos ya que, en vez de neutralizar, diluyen la mezcla antiséptico-suspensión bacteriana pudiendo mantener concentraciones efectivas del antiséptico<sup>246</sup>.

En el presente estudio se ha utilizado el método descrito por la norma AFNOR NF T 72-150<sup>247</sup>, por ser una técnica validada, fiable y que permite determinar la actividad bactericida básica de un antiséptico en las condiciones experimentales definidas en la misma. Siguiendo los pasos indicados en dicha norma, nuestras primeras experiencias han consistido en la búsqueda de neutralizantes para cada una de las soluciones irrigadoras. La neutralización de estas soluciones puede permitir controlar su actividad, de acuerdo con los tiempos seleccionados, en cada una de las experiencias. La efectividad de los neutralizantes sobre las soluciones irrigadoras utilizadas así como su posible toxicidad sobre *E. faecalis* fue comprobada en ensayos previos.

### 5.3.2. Capacidad bactericida de las soluciones irrigadoras frente a *E. faecalis* en suspensión

<sup>242</sup> Siqueira JF Jr, Batista MM, Fraga RC, de Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod* 1998;24:414-6.

<sup>243</sup> Estrela C, Ribeiro RG, Estrela CRA, Pecora JD, Sousa-Neto MD. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Braz Dent J* 2003;14:58-62.

<sup>244</sup> Torabinejad M, Shabahang S, Apicco RM, Kettering JD. The antimicrobial effect of MTAD: an in vitro investigation. *J Endod* 2003;29:400-3.

<sup>245</sup> Russel AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ. Evaluation of antibacterial and antifungal efficacy. *En: Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*. 3ª ed. Blackwell Science LTD. Oxford;1999:124-48.

<sup>246</sup> Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T. Chelation in root canal therapy reconsidered. *J Endod* 2005;31:817-20.

<sup>247</sup> AFNOR. Antiseptiques et désinfectants. AFNOR NF T 72-150, Paris, 1995;17-39.

El **hipoclorito sódico** es, hasta la fecha, la solución antiséptica más empleada para la irrigación del conducto radicular. Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación indican que posee actividad bactericida a concentraciones muy bajas del 0,0063%. No hemos encontrado en la revisión bibliográfica estudios que evalúen la CMB del hipoclorito sódico frente a *E. faecalis*. Torabinejad y cols.<sup>248</sup> estudiaron la actividad del hipoclorito evaluando su concentración mínima inhibitoria (CMI). Obtuvieron la CMI a una dilución 1/32 de la solución de hipoclorito al 5,25%; estos resultados son poco reveladores dado que se limitan al efecto bacteriostático sin tener en cuenta la viabilidad de los cultivos bacterianos tras la adición del hipoclorito sódico. Zehnder y cols.<sup>249</sup>, utilizando el test de contacto directo, encontraron que diluciones del 1/10 y 1/100 de hipoclorito sódico al 1% tenían la misma eficacia para eliminar *E. faecalis*, no detectando crecimiento bacteriano tras 15 minutos de contacto con la solución. Resultados que se aproximan a los obtenidos en este trabajo, donde la concentración mínima bactericida fue de 0,0063%.

Las concentraciones de uso del hipoclorito de sodio en endodoncia oscilan entre el 0,5% y 6%. En nuestro trabajo hemos valorado su eficacia bactericida en relación con el tiempo a distintas concentraciones: 0,5%, 1%, 2,5% y 5,25%, y hemos obtenido que cualquiera de estas concentraciones requiere menos de 30 segundos para ejercer una actividad bactericida frente a *E. faecalis* en suspensión. Nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos por Sassone y cols.<sup>250,251,252</sup> quienes encontraron que soluciones de hipoclorito al 1% y 5% poseen una eficacia inmediata frente a las bacterias anaerobias estrictas y facultativas seleccionadas, entre ellas el *E. faecalis*. Similares resultados obtuvieron Vianna y cols.<sup>253</sup> para una concentración de hipoclorito al 5,25%. Sin embargo, concentraciones más bajas de este agente necesitaron tiempos de contacto mayores.

Radcliffe y cols.<sup>254</sup> señalaron que el hipoclorito sódico al 0,5%, 1%, 2,5% y 5,25% precisaron tiempos de exposición de 30, 10, 5 y 2 minutos, respectivamente, para dar recuentos negativos de *E. faecalis*. Estos tiempos se aproximan a los obtenidos por Gomes y cols.<sup>255</sup> al exponer las mismas concentraciones de hipoclorito a una suspensión de *E. faecalis*. Las discrepancias con

---

<sup>248</sup> Torabinejad M, Shabahang S, Apécio RM, Kettering JD. The antimicrobial effect of MTAD: an in vitro investigation. J Endod 2003;29:400-3.

<sup>249</sup> Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T. Chelation in root canal therapy reconsidered. J Endod 2005;31:817-20.

<sup>250</sup> Sassone LM, Fidel RA, Murad CF, Fidel SR, Hirata R Jr. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine by two different tests. Aust Endod J 2008;34:19-24.

<sup>251</sup> Sassone LM, Fidel RA, Fidel SR, Dias M, Hirata RJ. Antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine using a contact test. Braz Dent J 2003;14:99-102.

<sup>252</sup> Sassone LM, Fidel R, Fidel S, Vieira M, Hirata R Jr. The influence of organic load on the antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine *in vitro*. Int Endod J 2003;36:848-52.

<sup>253</sup> Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, 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;97:79-84.

<sup>254</sup> Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, Hababeh N, Qualtrough A, Worthington H, Drucker DB. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. Int Endod J 2004;37:438-46.

<sup>255</sup> Gomes BPF, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. Int Endod J 2001;34:424-8.

respecto a nuestros resultados podemos encontrarlas en la diferente metodología empleada. Gomes y cols. utilizaron un test de exposición directa cualitativo basado en la medida de turbidez, lo cual no es comparable con el método cuantitativo que es mucho más fiable y discriminativo. Por su parte, Radcliffe y cols. emplearon un test de exposición directa cuantitativo similar al nuestro; entre las diferencias con nuestra técnica, en su trabajo expusieron un mayor volumen de hipoclorito a la suspensión de *E. faecalis*, utilizaron otro medio de cultivo así como cepas de *E. faecalis* distintas, NCTC 775 y E10e. Sin embargo, apreciamos una contradicción en los resultados puesto que, utilizando una cantidad muy superior de hipoclorito en la mezcla, necesitaron un tiempo significativamente mayor de exposición para ejercer su acción.

Los resultados de los estudios que utilizan el test de difusión en agar indican que el hipoclorito sódico a concentraciones bajas, del 0,5%, no ejerce actividad antimicrobiana frente a *E. faecalis*. Así, Grawher y cols.<sup>256</sup> observaron que los halos de inhibición de hipoclorito al 0,5% eran menores que los de la solución de EDTA al 8,5% con o sin la adición de hipoclorito al 0,5%. Otros autores<sup>257,258,259</sup> demostraron que el hipoclorito sódico al 0,5% era menos efectivo que diversas soluciones, entre ellas clorhexidina al 2%. Esta discrepancia con nuestros resultados podría ser debida a los obstáculos que ofrece el test de difusión en agar como son, la capacidad de difusión de la solución irrigadora, y de la interacción de las soluciones con alguno de los componentes del medio de cultivo.

La CMB de la **clorhexidina** se obtuvo con una concentración del 0,5% a los 5 minutos. Bulacio y cols.<sup>260</sup> encontraron que la CMI de clorhexidina era del 0,2%. En su estudio utilizaron un método de dilución seriada similar al que se usa para determinar la susceptibilidad a los antibióticos. Sin embargo, estos test evalúan la capacidad bacteriostática del antiséptico en lugar de la capacidad bactericida requerida para los agentes<sup>261</sup>. Por otro lado, la CMI de la clorhexidina fue del 0,05%<sup>262</sup> y de 3,33 µg/ml<sup>263</sup> cuando se midieron los halos de inhibición en el test de difusión en agar.

Hemos seleccionado concentraciones del 0,12%, 0,2% y 2% por ser las más utilizadas. La concentración del 0,12% no ha resultado muy efectiva frente a una suspensión de *E. faecalis* ya

---

<sup>256</sup> Grawher M, Sener B, Waltimo T, Zehnder M. Interactions of ethylenediamine tetraacetic acid with sodium hypochlorite in aqueous solutions. *Int Endod J* 2003;36:411-7.

<sup>257</sup> Leonardo MR, da Silva LA, Filho MT, Bonifácio KC, Ito IY. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a castor oil-based irrigant. *J Endod*. 2001;27:717-9.

<sup>258</sup> Ayhan H, Sultan N, Cirak M, Ruhi MZ, Bodur H. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. *Int Endod J* 1999;32:99-102.

<sup>259</sup> Siqueira JF Jr, Batista MM, Fraga RC, de Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod* 1998;24:414-6.

<sup>260</sup> Bulacio M de L, Cangemi R, Cecilia M, Raiden G. In vitro antibacterial effect of different irrigating solutions on *Enterococcus faecalis*. *Acta Odontol Latinoam* 2006;19:75-80.

<sup>261</sup> Russel AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ. Evaluation of antibacterial and antifungal efficacy. *En: Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*. 3ª ed. Blackwell Science LTD. Oxford;1999:124-48.

<sup>262</sup> Shurrab MY. Antimicrobial efficiency of some antiseptic products on endodontic microflora isolated from gangrenous pulp tissue. *J Contemp Dent Pract* 2006;7:53-62.

<sup>263</sup> do Amorim CV, Aun CE, Mayer MP. Susceptibility of some oral microorganisms to chlorhexidine and paramonochlorophenol. *Braz Oral Res* 2004;18:242-6.

que para ejercer una actividad bactericida *in vitro*, tiene que actuar al menos durante 25 minutos. Sassone y cols.<sup>264,265,266</sup>, en sus trabajos usando el test de contacto directo cuantitativo, afirmaron que eran necesarios 30 minutos, como mínimo, para que la solución de clorhexidina al 0,12% eliminara *E. faecalis*. Concentraciones mayores, del 0,5% y 1%, necesitaron un tiempo de contacto por debajo de 5 minutos. En nuestro trabajo concentraciones del 0,2% y 2% de clorhexidina mostraron capacidad bactericida frente a *E. faecalis* a los 10 y 3 minutos, respectivamente.

Los resultados del presente trabajo discrepan con los obtenidos por Portenier y cols.<sup>267</sup>. Estos autores, utilizando el test de contacto directo cuantitativo, encontraron que una concentración de clorhexidina al 0,2% necesitaba estar en contacto al menos 5 minutos para ejercer su acción antimicrobiana sobre *E. faecalis*. No obstante, para comprobar la eficacia antibacteriana, depositaban gotas de la mezcla del cultivo bacteriano con la clorhexidina directamente en placas de TSA sin neutralizar previamente, con lo cual el antiséptico podría seguir ejerciendo su acción antibacteriana.

Estrela y cols.<sup>268</sup> refieren que una solución de clorhexidina al 2% resulta efectiva tras 5 minutos de contacto con un cultivo de *E. faecalis*. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este trabajo. No obstante, en su estudio solamente prueban tiempos de 5, 10 y 30 minutos, y nunca por debajo de 5 minutos donde nosotros encontramos la actividad bactericida para una concentración del 2%. Por otro lado, resulta llamativo el resultado descrito por Vianna y cols.<sup>269</sup>, quienes, utilizando el test de contacto directo cuantitativo, obtuvieron que la clorhexidina al 0,2%, 1% y 2% necesitó 30, 15 y 15 segundos, respectivamente, para producir cultivos negativos. Algo similar ocurre con el trabajo publicado por Gomes y cols.<sup>270</sup>, quienes demostraron que la clorhexidina ejerce su acción antimicrobiana a los 30 segundos con todas las concentraciones empleadas (0,2%, 1% y 2%). Revisando la metodología de ambos estudios, las diferencias con respecto a nuestros resultados podrían ser debidas a que no realizan ensayos del neutralizante empleado, pudiendo no ser del todo eficaz en la neutralización de la clorhexidina.

Respecto a la solución de **EDTA** existe cierta controversia sobre su capacidad antibacteriana y poder bactericida. Algunos autores han demostrado que posee propiedades antimicrobianas.

---

<sup>264</sup> Sassone LM, Fidel RA, Murad CF, Fidel SR, Hirata R Jr. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine by two different tests. *Aust Endod J* 2008;34:19-24.

<sup>265</sup> Sassone LM, Fidel RA, Fidel SR, Dias M, Hirata RJ. Antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine using a contact test. *Braz Dent J* 2003;14:99-102.

<sup>266</sup> Sassone LM, Fidel R, Fidel S, Vieira M, Hirata R Jr. The influence of organic load on the antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine *in vitro*. *Int Endod J* 2003;36:848-52.

<sup>267</sup> Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. *J Endod* 2006;32:138-41.

<sup>268</sup> Estrela C, Ribeiro RG, Estrela CRA, Pecora JD, Sousa-Neto MD. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Braz Dent J* 2003;14:58-62.

<sup>269</sup> Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, 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;97:79-84.

<sup>270</sup> Gomes BPF, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2001;34:424-8.

Patterson<sup>271</sup> afirmó que, aunque limitada, posee cierta actividad antibacteriana frente a un *Streptococcus* alfa hemolítico y *S. aureus* a concentraciones del 10% y 3%. Otros autores<sup>272,273</sup>, utilizando el test de difusión en agar, encontraron que los halos de inhibición de las soluciones de EDTA al 8,5% y EDTA al 17% combinado con hipoclorito al 0,5% eran mayores que los del hipoclorito al 0,5%, cuando se expusieron a bacterias anaerobias estrictas y facultativas, entre ellas *E. faecalis*. Esta mayor efectividad de la solución de EDTA frente a la del hipoclorito sódico al 0,5% resulta incongruente y no tiene consistencia con otros estudios. Posiblemente sea consecuencia de la interferencia de algún componente del medio de cultivo con el hipoclorito. Por su parte, Zehnder y cols.<sup>274</sup>, utilizando el test de contacto directo cualitativo, mostraron que una solución de EDTA al 17% inhibía el crecimiento bacteriano de *E. faecalis* a diluciones 1/1 y 1/10, pero no a una dilución de 1/100. En este trabajo, EDTA mostró actividad inhibitoria basándose en la turbidez de la mezcla solución irrigadora-suspensión bacteriana, pero no actividad bactericida.

También Yamaguchi y cols.<sup>275</sup> encontraron que una solución de EDTA 0,5 M tenía actividad antimicrobiana frente a 12 cepas bacterianas anaerobias estrictas y facultativas, aunque ninguna de ellas fue *E. faecalis*.

Nuestros resultados demuestran que una solución de EDTA al 17% no posee actividad antibacteriana frente a *E. faecalis* en suspensión. No hemos obtenido la CMB, ni demostrado actividad bactericida alguna del EDTA al 17% después de 60 minutos de exposición. Estos hallazgos están de acuerdo con los resultados de investigaciones previas que ponen en duda la eficacia antibacteriana de las soluciones de EDTA. Así, Bulacio y cols.<sup>276</sup> no encontraron la CMI de las diluciones de EDTA desde el 5% hasta el 25%. Ørstavik y cols.<sup>277</sup> cuestionaron la actividad antibacteriana y la desinfección de los túbulos dentinarios con una solución de EDTA al 17%; a diferencia del hipoclorito, que redujo el número de *Streptococcus sanguis* presente en los túbulos dentinarios después de 5 minutos, la solución de EDTA no causó desinfección alguna. Torabinejad y cols.<sup>278</sup>, utilizando el test de difusión en agar, demostraron escasa actividad antibacteriana de este agente frente a *E. faecalis*. Además, en su estudio no encontraron la CMI de soluciones de EDTA. Tampoco encontraron actividad antibacteriana de EDTA al 17%, los

<sup>271</sup> Patterson SS. *In vivo* and *in vitro* studies of the effect of the disodium salt of the ethylenediamine tetra-acetate on human dentine and its endodontic implications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1963;16:83-103.

<sup>272</sup> Siqueira JF Jr, Batista MM, Fraga RC, de Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod* 1998;24:414-6.

<sup>273</sup> Grawehr M, Sener B, Waltimo T, Zehnder M. Interactions of ethylenediamine tetraacetic acid with sodium hypochlorite in aqueous solutions. *Int Endod J* 2003;36:411-7.

<sup>274</sup> Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T. Chelation in root canal therapy reconsidered. *J Endod* 2005;31:817-20.

<sup>275</sup> Yamaguchi M, Yoshida K, Suzuki R, Nakamura H. Root canal irrigation with citric acid solution. *J Endod* 1996;22:27-9.

<sup>276</sup> Bulacio M de L, Cangemi R, Cecilia M, Raiden G. *In vitro* antibacterial effect of different irrigating solutions on *Enterococcus faecalis*. *Acta Odontol Latinoam* 2006;19:75-80.

<sup>277</sup> Ørstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 1990;6:142-9.

<sup>278</sup> Torabinejad M, Shabahang S, Apresio RM, Kettering JD. The antimicrobial effect of MTAD: an *in vitro* investigation. *J Endod* 2003;29:400-3.

autores Heling y cols.<sup>279</sup> en su trabajo *ex vivo* sobre conductos radiculares infectados, tras estar 10 minutos en contacto con *E. faecalis*.

En un estudio *in vivo*<sup>280</sup>, la solución de EDTA al 15% redujo significativamente las bacterias presentes en conductos radiculares necróticos al compararlo con la reducción obtenida por la solución salina. Esta disminución podría ser debida a que el EDTA elimina el componente inorgánico del barrillo dentinario contaminado presente en los túbulos dentinarios<sup>281</sup>, obteniendo un efecto desinfectante por el arrastre mecánico que origina.

Steinberg y cols.<sup>282</sup> investigaron el efecto bactericida y bacteriostático de los componentes de RC-Prep® (EDTA, 15%; peróxido de urea al 10%; y glicol) por separado, frente a *S. sobrinus*. La CMI del EDTA fue 0,125%, del peróxido de urea 0,25% y del glicol un 30%, mientras que la CMB fue 0,25% para el EDTA, 0,5% para el peróxido de urea y 50% para el glicol. Estos resultados difieren de los obtenidos en nuestra investigación, probablemente, porque ellos utilizan *S. sobrinus*, y en nuestro caso se ha utilizado *E. faecalis*, una bacteria más resistente en las infecciones endodónticas<sup>283</sup>. Además, la CMB era obtenida por el método de las diluciones seriadas sin utilizar un agente neutralizante de cada producto<sup>284</sup>, como se ha empleado en nuestro trabajo. Como consecuencia de ello, el tiempo de actuación del EDTA fue mucho mayor, aproximadamente unas 16 horas, muy diferente al de nuestro estudio en el que se dejó actuar un tiempo máximo de 60 minutos.

El **ácido cítrico** es un agente capaz de eliminar el barrillo dentinario de las paredes de los conductos radiculares instrumentados. Nuestros resultados encontraron la CMB del ácido cítrico frente a *E. faecalis* a una concentración del 20%. El tiempo de exposición requerido para concentraciones del 10% y 25% fue de 10 y 3 minutos, respectivamente.

Resultados similares fueron obtenidos por Zehnder y cols.<sup>285</sup> tras 15 minutos de contacto del ácido cítrico al 10% con la suspensión bacteriana de *E. faecalis*; obteniendo una eficacia del 99,9%. A pesar de la diferente metodología empleada por Zehnder y cols. (test de contacto directo cualitativo) y la realizada en nuestro trabajo de investigación (método de dilución-neutralización), los resultados obtenidos han sido prácticamente idénticos, encontrando una eficacia antimicrobiana del ácido cítrico próxima al 100% en tiempos de 10 y 15 minutos de

---

<sup>279</sup> Heling I, Chandler NP. Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. *Int Endod J* 1998;31:8-14.

<sup>280</sup> Yoshida T, Shibata T, Shinohara T, Gomyo S, Sekine I. Clinical evaluation of the efficacy of EDTA solution as an endodontic irrigant. *J Endodon* 1995;21:592-3.

<sup>281</sup> Goldman LB, Goldman M, Kronman JH, Lin PS. The efficacy of several irrigating solutions for endodontics: a scanning electron microscopic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1981;52:197-204.

<sup>282</sup> Steinberg D, Abid-el-Raziq D, Heling I. In vitro antibacterial effect of RC-Prep components on *Streptococcus sobrinus*. *Endod Dent Traumatol* 1999;15:171-4.

<sup>283</sup> Siqueira JF Jr, Batista MM, Fraga RC, de Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod* 1998;24:414-6.

<sup>284</sup> Steinberg D, Abid-el-Raziq D, Heling I. In vitro antibacterial effect of RC-Prep components on *Streptococcus sobrinus*. *Endod Dent Traumatol* 1999;15:171-4.

<sup>285</sup> Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T. Chelation in root canal therapy reconsidered. *J Endod* 2005;31:817-20.

exposición. Igualmente, Smith y Wayman<sup>286</sup> encontraron efectivo al ácido cítrico ya que al 50% mostró actividad antimicrobiana en el 80% de los casos tras 15 minutos de exposición a una suspensión de *E. faecalis*.

Siqueira y cols.<sup>287</sup> compararon la actividad antibacteriana de varias soluciones irrigadoras frente a bacterias anaerobias estrictas y facultativas, entre ellas *E. faecalis*. A diferencia de nuestros resultados demostraron que los halos de inhibición del ácido cítrico al 10% eran mayores que los del hipoclorito sódico al 0,5% y menores que los del EDTA al 17%. Esta discrepancia de resultados podemos relacionarla, como se ha comentado anteriormente, con la distinta metodología empleada ya que ellos utilizaron el test de difusión en agar frente al test de contacto directo usado en el presente trabajo.

Otros autores han demostrado que el ácido cítrico ejerce actividad antimicrobiana frente a microorganismos anaerobios estrictos y facultativos, distintos de *E. faecalis*. Así, Nikolaus<sup>288</sup> evaluó la eficacia de soluciones de ácido cítrico al 50% y de hipoclorito al 5,25% sobre microorganismos anaerobios. Las dos soluciones eliminaron todas las cepas bacterianas tras 15 minutos de exposición a dichos agentes. Yamaguchi y cols.<sup>289</sup> compararon el efecto descalcificante y antimicrobiano frente a bacterias anaerobias estrictas y facultativas, de distintas soluciones de ácido cítrico (0,1, 0,5, 1 y 2 M) con una solución acuosa de EDTA (0,5 M), concluyendo que el ácido cítrico al 0,5, 1 y 2 M muestra una mayor capacidad antibacteriana y quelante que el EDTA.

El **ácido fosfórico** es un agente desmineralizante que se utiliza como acondicionador de los tejidos dentarios duros. Pocos estudios han demostrado su capacidad para eliminar la capa de barrillo dentinario originada durante la instrumentación. Garberoglio y Becce<sup>290</sup> obtuvieron resultados similares en la limpieza del conducto radicular con una combinación de ácido fosfórico al 24% y ácido cítrico al 10%, EDTA al 17% y EDTA al 3%. Ayad<sup>291</sup> encontró que tras 10 segundos de aplicación del ácido fosfórico al 10% o del ácido cítrico al 10% se producía una eliminación parcial del barrillo dentinario. La eliminación total se conseguía cuando se aplicaba ácido fosfórico al 32%. Pérez-Heredía y cols.<sup>292</sup>, demostraron que el ácido fosfórico al 5%, EDTA al 15% y ácido cítrico al 15%, utilizados de forma alternada con una solución de hipoclorito

---

<sup>286</sup> Smith JJ, Wayman BE. An evaluation of the antimicrobial effectiveness of citric acid as a root canal irrigant. J Endod 1986;12:54-8.

<sup>287</sup> Siqueira JF Jr, Batista MM, Fraga RC, de Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. J Endod 1998;24:414-6.

<sup>288</sup> Nikolaus BE, Wayman BE, Encinas E. The bactericidal effect of citric acid and sodium hypochlorite on anaerobic bacteria. J Endod 1988;14:31-4.

<sup>289</sup> Yamaguchi M, Yoshida K, Suzuki R, Nakamura H. Root canal irrigation with citric acid solution. J Endod 1996;22:27-9.

<sup>290</sup> Garberoglio R, Becce C. Smear layer removal by root canal irrigants. A comparative scanning electron microscopic study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1994;78:359-67.

<sup>291</sup> Ayad MF. Effects of rotary instrumentation and different etchants on removal of smear layer on human dentin. J Prosthet Dent 2001;85:67-72.

<sup>292</sup> Pérez-Heredía M, Ferrer-Luque CM, González Rodríguez MP. The effectiveness of different acid irrigating solutions in root canal cleaning after hand and rotary instrumentation. J Endod 2006;32:993-7.

sódico al 2,5%, son eficaces para eliminar el barrillo dentinario de los conductos radiculares instrumentados.

No hemos encontrado, en la literatura científica, trabajos acerca de la capacidad antibacteriana del ácido fosfórico sobre la microbiota del conducto radicular. Sin embargo, Settembrini y cols.<sup>293</sup> estudiaron la eficacia de 8 tipos de ácido fosfórico comercializados, cuyas concentraciones oscilaban entre un 27% y un 37,5%, frente a bacterias comúnmente encontradas en la cavidad oral: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Actinobacillus actinomycetecomitans*. Sus resultados demostraron la eficacia antimicrobiana del ácido ortofosfórico frente a todas las bacterias probadas. En nuestro estudio hemos comprobado que el ácido fosfórico en solución acuosa tiene actividad bactericida frente a *E. faecalis* en suspensión. La CMB encontrada para este agente fue del 2,5%. Además se probó la actividad bactericida de dos concentraciones de ácido fosfórico, 5% y 2,5%, a diferentes tiempos de contacto y se obtuvo que el tiempo necesario para ejercer esta actividad era de 5 minutos para una solución al 2,5%, y de 3 minutos para una solución al 5%.

## 5.2. Estudio de la MCEB

### 5.2.1. Validez interna del estudio

La efectividad de las soluciones irrigadoras frente a biopelículas de *E. faecalis* se llevó a cabo mediante el dispositivo MBEC™ HTP el cual no había sido utilizado previamente con esta bacteria. Este dispositivo fue desarrollado en el año 2000 por el equipo de Ceri y cols. para llevar a cabo estudios de alto rendimiento sobre la susceptibilidad de biopelículas microbianas a antibióticos<sup>294</sup>, desinfectantes y metales<sup>295,296</sup>. Además, ha sido validado como una herramienta para estudiar la estructura de las biopelículas a través del microscopio electrónico y láser confocal, entre otros<sup>297</sup>. La fuerza de cizalla que origina el movimiento del agitador de balanceo, facilita la formación simultánea de 96 biopelículas que, coincidiendo con estudios previos<sup>298,299</sup>, han demostrado ser estadísticamente equivalentes. De este modo, permite testar varios agentes antimicrobianos y concentraciones en un mismo ensayo consiguiéndose resultados muy

---

<sup>293</sup> Settembrini L, Boylan R, Strassler H, Scherer W. A comparison of antimicrobial activity of etchants used for a total etch technique. *Oper Dent* 1997;22:84-8.

<sup>294</sup> Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 1999;37:1771-6.

<sup>295</sup> Harrison JJ, Ceri H, Stremick C, Turner RJ. Biofilm susceptibility to metal toxicity. *Environ Microbiol* 2004;6:1220-7.

<sup>296</sup> Harrison JJ, Turner RJ, Ceri H. High-throughput metal susceptibility testing of microbial biofilms. *BMC Microbiol* 2005;5:53.

<sup>297</sup> Harrison JJ, Ceri H, Yerly J, Stremick CA, Hu Y, Martinuzzi R, Turner RJ. The use of microscopy and three-dimensional visualization to evaluate the structure of microbial biofilms cultivated in the Calgary Biofilm Device. *Biol Proced Online* 2006;8:194-215.

<sup>298</sup> Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 1999;37:1771-6.

<sup>299</sup> Harrison JJ, Turner RJ, Ceri H. High-throughput metal susceptibility testing of microbial biofilms. *BMC Microbiol* 2005;5:53.

válidos<sup>300</sup>. Es, por tanto, un método rápido, fiable y permite controlar múltiples variables a la vez tales como, medios de cultivo, concentración de agentes y tiempo de exposición.

Se han desarrollado diversas técnicas para estudiar el efecto antimicrobiano de las soluciones irrigadoras frente a biopelículas. Entre ellas, la descrita por Spratt y cols.<sup>301</sup>, la cual se basa en la formación de biopelículas en filtros de membrana de nitrato de celulosa inoculados con una suspensión bacteriana y, posteriormente expuestos a los irrigantes. Este método, a pesar de ser uno de los más utilizados, tiene la desventaja de formar biopelículas de manera estática. Por el contrario, el movimiento del caldo inoculado en la base del MBEC™ HTP cuando se coloca sobre el agitador de balanceo, se considera determinante en la estructura de la biopelícula<sup>302</sup> ya que influye en la densidad celular<sup>303</sup>, la fuerza de adhesión<sup>304</sup> así como en la distribución de nutrientes y señales celulares a través de la misma<sup>305</sup>. Además, se aproxima a las condiciones en las que una biopelícula se forma en el diente. De este modo, la periodontitis periapical persistente origina un exudado que circula hacia dentro y fuera del conducto radicular y que, no sólo provee una fuente de nutrientes sino que ejerce una fuerza de cizalla en la biopelícula.

Otro método es el descrito por Dunavant y cols.<sup>306</sup>. Generaron biopelículas en un dispositivo de fluido continuo inoculado con un cultivo de *E. faecalis*. Es un método similar al nuestro con la desventaja de que crea 8 biopelículas simultáneas a diferencia de las 96 del MBEC™ HTP, que permite un mayor número de exposiciones en un mismo ensayo. Duggan y Sedgley<sup>307</sup> desarrollaron biopelículas en los pocillos de placas de microtiter (8 × 12) inoculadas con una suspensión bacteriana. A pesar de ser un método válido para la formación de la biopelícula, como se comprobó en estudios preliminares, (datos no mostrados), no se seleccionó ya que el procedimiento para eliminar el contenido de los pocillos puede favorecer posibles alteraciones de la biopelícula, así como la mezcla de los antisépticos originando resultados falsos.

El tiempo de incubación para la formación de las biopelículas fue de 24 h ya que se obtuvo una densidad bacteriana adecuada para los recuentos de células viables. Además, estudios previos que utilizaron distintas metodologías, indicaron que las biopelículas de *E. faecalis* de 1 día de

---

<sup>300</sup> Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 1999;37:1771-6.

<sup>301</sup> Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K. An *in vitro* evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *Int Endod J* 2001;34:300-7.

<sup>302</sup> Purevdorj B, Costerton JW, Stoodley P. Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2002;68: 4457-64.

<sup>303</sup> Vieira MJ, Melo LF, Pinheiro MM. Biofilm formation: hydrodynamic effects on internal diffusion and structure. *Biofouling* 1993;7:67-80.

<sup>304</sup> Stoodley P, Jacobsen A, Dunsmore BC, Purevdorj B, Wilson S, Lappin-Scott HM, Costerton JW. The influence of fluid shear and AlCl<sub>3</sub> on the material properties of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and *Desulfovibrio* sp. EX265 biofilms. *Water Sci. Technol.* 2001;43:113-120.

<sup>305</sup> Stoodley P, Dodds I, Boyle JD, Lappin-Scott H. Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *J Appl Microbiol* 1999;85:19S-28S.

<sup>306</sup> Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod* 2006;32:527-31.

<sup>307</sup> Duggan JM, Sedgley CM. Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2007;33:815-8.

incubación son más apropiadas para comparar la eficacia antimicrobiana de las soluciones irrigadoras<sup>308</sup>.

En cuanto a la neutralización, se decidió no usar los neutralizantes descritos en el apartado de CMB ya que la mayor parte de ellos contienen componentes tales como Tween 80, un agente surfactante, que podría ejercer cierto efecto antimicrobiano sobre la matriz de polisacáridos de las biopelículas. En su lugar y, como recomiendan Dunavant y cols.<sup>309</sup>, el *peg lig* se sumergió dos veces en solución salina durante 2 min con el fin de eliminar el agente antimicrobiano residual. Además, este modo de retirar el antimicrobiano se aproxima bastante a la situación que se produce en la práctica clínica odontológica.

Por otro lado, en estudios pilotos previos medimos la densidad óptica después de resuspender las biopelículas en la *placa de recuperación* (que correspondería a 0 h), sin obtener diferencias significativas en las lecturas de absorbancia en los pocillos control de esterilidad y de crecimiento. Por ello, en las siguientes experiencias se dejó incubar la placa de recuperación 7 h, momento en el que la bacteria se encuentra en fase de crecimiento logarítmico.

### 5.2.3. Capacidad bactericida de las soluciones frente a biopelículas de *E. faecalis*

En este estudio, el **hipoclorito sódico** fue la solución irrigadora más eficaz, ya que erradicó las biopelículas de *E. faecalis* desde 1 minuto de exposición a una concentración del 0,0063%. Por su parte, la MCEB de la solución de **clorhexidina** fue del 2% tras 5 minutos y del 1% tras 10 minutos. A 1 minuto de contacto, clorhexidina no ejerció actividad bactericida frente a biopelículas de *E. faecalis* ya que la reducción logarítmica fue menor de 5 unidades. Estos resultados son consistentes con los trabajos publicados que, a pesar de utilizar metodologías diferentes, coinciden en que el hipoclorito sódico es mejor que el resto de las soluciones para eliminar biopelículas de *E. faecalis*<sup>310,311,312,313</sup>. Entre ellos, Dunavant y cols.<sup>314</sup> obtuvieron un mayor porcentaje de muerte con hipoclorito al 1% y 6% que con clorhexidina al 2% tras 1 y 5

---

<sup>308</sup> Lima KC, Fava LR, Siqueira JF Jr. Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* biofilms to some antimicrobial medications. J Endod 2001;27:616-9.

<sup>309</sup> Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. J Endod 2006;32:527-31.

<sup>310</sup> Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. J Endod 2006;32:527-31.

<sup>311</sup> Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms *in vitro*. J Endod 2006;32:434-7.

<sup>312</sup> Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, Moles DR, Spratt DA. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. J Endod 2005;31:30-6.

<sup>313</sup> Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K. An *in vitro* evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. Int Endod J 2001;34:300-7.

<sup>314</sup> Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. J Endod 2006;32:527-31.

minutos de exposición a las biopelículas. Otros autores, que cultivaron biopelículas en filtros de membrana de nitrato de celulosa, demostraron que el hipoclorito al 3% y 2,5% redujo el 100% de las biopelículas tras 2 minutos de exposición mientras que la clorhexidina al 0,2% fue poco efectiva después de 60 min de exposición<sup>315,316</sup>.

Igualmente, Williamson y cols.<sup>317</sup> indicaron que el hipoclorito al 6%, con y sin la adición de modificadores de superficie, fue significativamente mejor que la clorhexidina al 2% tras 1, 3 y 5 minutos de contacto con biopelículas de *E. faecalis*. La solución de clorhexidina redujo el número ufc/ml en 3 unidades logarítmicas lo cual difiere de los resultados obtenidos en nuestro estudio, en el que la reducción de clorhexidina al 2% fue mayor de 5 unidades, tras 5 minutos. Estas discrepancias podrían deberse a la metodología empleada. Frente a las 24 horas de incubación de las biopelículas en el MBEC™ HTP, en su trabajo las incubaron durante 48 horas sobre portas de cristal, siendo más maduras, lo cual podría explicar la mayor resistencia a los antimicrobianos.

Por otro lado, la clorhexidina al 2% dio recuentos negativos frente a biopelículas de especies simples de microorganismos anaerobios estrictos y facultativos, entre ellos *E. faecalis*, tras 30 segundos de exposición<sup>318</sup>. Estos resultados difieren bastante de los obtenidos en este trabajo, lo que podría ser debido a que utilizaron biopelículas de 10 días de incubación, pudiendo haber una alta concentración de bacterias no viables.

Cuando se probó la capacidad antibacteriana y de remoción de biopelículas polimicrobianas cultivadas en el interior de conductos radiculares, el hipoclorito sódico al 6% fue la única solución capaz de no dejar bacterias viables y de eliminar físicamente las biopelículas<sup>319</sup>. A su vez, la clorhexidina al 2% y el hipoclorito al 1% seguido del BioPure MTAD®, no dejaron células vivas pero no fueron capaces de romper la estructura de las biopelículas. Esto probablemente sea debido a que el hipoclorito a una concentración mayor o igual al 1% puede disolver tejido orgánico y, posiblemente, esté menos inhibido por la matriz polimérica que forma parte fundamental de la biopelícula<sup>320</sup>.

---

<sup>315</sup> Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K. An *in vitro* evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *Int Endod J* 2001;34:300-7.

<sup>316</sup> Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, Moles DR, Spratt DA. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *J Endod* 2005;31:30-6.

<sup>317</sup> Williamson AE, Cardon JW, Drake DR. Antimicrobial susceptibility of monoculture biofilms of a clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2009;35:95-7.

<sup>318</sup> Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J* 2006;39:878-85.

<sup>319</sup> Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms *in vitro*. *J Endod* 2006;32:434-7.

<sup>320</sup> Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, Moles DR, Spratt DA. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *J Endod* 2005;31:30-6.

Hems y cols.<sup>321</sup> demostraron que la solución de hipoclorito al 2,5% fue más efectiva que incluso el ozono (0,69 mg/l) frente a biopelículas de *E. faecalis* generadas en filtros de membrana de nitrato de celulosa tras 120 segundos, lo que reafirma su validez como irrigante de elección del conducto radicular.

Si observamos los resultados del presente estudio a cerca de la actividad bactericida de hipoclorito sódico sobre *E. faecalis* en suspensión y en biopelículas, la CMB tras 5 minutos y la MCEB tras 1 minuto fue del 0,0063%. Esto podría considerarse un resultado paradójico, ya que las bacterias en biopelículas suelen ser más resistentes que en solución. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la metodología empleada fue diferente y, que en la determinación de la CMB se neutralizaron los antisépticos, lo que no se hizo en la determinación de la MCEB; esto ha podido prolongar el efecto antimicrobiano aumentando a eficacia del hipoclorito.

Por otro lado, se puede pensar que el hipoclorito sódico es tan efectivo que mata sin distinguir la forma de crecimiento de la bacteria gracias a su capacidad oxidante. Dicha capacidad le permite eliminar materia orgánica entre la que se encuentra la biopelícula, en general, y la matriz polimérica, en particular. Aún así, el intervalo de diluciones en las que el hipoclorito sódico fue eficaz frente a bacterias en suspensión y en biopelículas fue pequeño. Esta situación no ha ocurrido con la clorhexidina la cual es menos efectiva que el hipoclorito sódico como solución antiséptica. Ello se evidencia en que fue necesaria una concentración del 2% para erradicar *E. faecalis* en biopelículas, a diferencia de cuando creció en suspensión que se requirió una concentración del 0,5%, ambas tras 5 minutos.

En cuanto a las soluciones ácidas, los resultados de este trabajo revelan que **EDTA** no ejerce efecto bactericida sobre biopelículas de *E. faecalis* en ninguno de los tiempos ni diluciones probadas. Estos hallazgos están en consonancia con el estudio de Abdullah y cols.<sup>322</sup> en el que EDTA exhibió mínima actividad sobre biopelículas de *E. faecalis*, incluso tras 60 minutos de contacto.

Igualmente, no se consiguió erradicar la biopelícula de *E. faecalis* con las soluciones de **ácido cítrico y fosfórico** en los tiempos ensayados. Esto contrasta con la actividad bactericida de estos ácidos frente a *E. faecalis* en suspensión, a partir de concentraciones del 20% para el ácido cítrico y del 2,5% para el ácido fosfórico, tras 5 minutos. La diferente susceptibilidad frente a ambas formas de crecimiento, pone de manifiesto que cuando los microorganismos crecen en biopelículas son más resistentes que cuando lo hacen en forma planctónica. No obstante, se observó cierto efecto de los ácidos cítrico y fosfórico sobre la biopelícula, de forma que, aunque no se consiguiera una reducción de 5 unidades logarítmicas, se alcanzaron reducciones por

---

<sup>321</sup> Hems RS, Gulabivala K, Ng YL, Ready D, Spratt DA. An *in vitro* evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. Int Endod J 2005;38:22-9.

<sup>322</sup> Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, Moles DR, Spratt DA. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. J Endod 2005;31:30-6.

encima de 4 unidades (Tablas 16 y 17). La solución de EDTA fue la menos eficaz sobre la biopelícula ya que ni siquiera se alcanzaron reducciones logarítmicas de 2 unidades.

Si observamos las gráficas de las densidades ópticas que reflejan el efecto de los ácidos (Figuras 16 - 18), los valores de absorbancia de la solución de EDTA son muy elevados desde una concentración del 17% en todos los tiempos de exposición. Además, son similares a los valores de absorbancia de la curva de crecimiento a las 7 horas (alrededor de 1,2), lo que indica que la solución de EDTA no afecta, en ninguna medida, el crecimiento de las biopelículas de *E. faecalis*. Sin embargo, en el caso de los ácidos cítrico y fosfórico, los valores se mantienen por debajo de 0,4 de absorbancia, excepto en las concentraciones más bajas y 1 min de exposición. Esto quiere decir que los ácidos ejercen cierta actividad antimicrobiana pero no la suficiente para erradicar biopelículas de *E. faecalis*. Los resultados de las densidades ópticas confirman los datos obtenidos mediante los recuentos de células viables. El bajo pH de estas soluciones, entre 1 y 2, provocaría su disociación en hidrogeniones ( $H^+$ ), dando lugar a la desnaturalización de proteínas y, por tanto, a la muerte de parte de las bacterias.

Los estudios *ex vivo*<sup>323,324</sup>, que utilizaron el modelo del diente infectado, encontraron que soluciones de EDTA a concentraciones del 15% y 0,2% eliminaron parte de los microorganismos presentes en conductos radiculares infectados. Estos resultados no se pueden achacar a la actividad antibacteriana de EDTA, sino al arrastre mecánico que originan las soluciones ácidas al eliminar la capa de barrillo de los túbulos dentinarios. Sin embargo, este efecto es su principal ventaja y no es desdeñable desde el punto de vista de conseguir la limpieza y desinfección de conductos.

La **cetrimida** es un surfactante catiónico que, al igual que la clorhexidina, actúa sobre la pared celular de las bacterias. La actividad bactericida se atribuye, principalmente, a que su carga positiva forma uniones electrostáticas con los elementos cargados negativamente<sup>325</sup> como la superficie bacteriana; además, su unión a la matriz exopolimérica de naturaleza aniónica desestabiliza las fuerzas cohesivas de la biopelícula, promoviendo la eliminación de la misma.

En la práctica odontológica, cetrimida suele usarse combinada con otras soluciones como EDTA y clorhexidina. En este trabajo se seleccionó la clorhexidina por ser una molécula bicatiónica que había obtenido buenos resultados con cetrimida<sup>326,327,328</sup> y por que no se ha investigado la acción

<sup>323</sup> Yoshida T, Shibata T, Shinohara T, Gomyo S, Sekine I. Clinical evaluation of the efficacy of EDTA solution as an endodontic irrigant. J Endod 1995;21:592-3.

<sup>324</sup> Buck RA, Eleazer PD, Staat RH, Scheetz JP. Effectiveness of three endodontic irrigants at various tubular depths in human dentin. J Endod 2001;27:206-8.

<sup>325</sup> Cloete TE, Jacobs L, Brözel VS. The chemical control of biofouling in industrial water systems. Biodegradation 1998;9:23-37.

<sup>326</sup> D'Arcangelo C, Varvara G, De Fazio P. An evaluation of the action of different root canal irrigants on facultative aerobic-anaerobic, obligate anaerobic, and microaerophilic bacteria. J Endod 1999;25:351-3.

<sup>327</sup> Onçağ O, Hoşgör M, Hilmioglu S, Zekioğlu O, Eronat C, Burhanoglu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. Int Endod J 2003;36:423-32.

<sup>328</sup> Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. J Endod 2006;32:138-41.

combinada de ambas sobre biopelículas. Previo al estudio de la actividad bactericida de diferentes combinaciones, de cetrimida y clorhexidina, se determinó la actividad bactericida y las concentraciones efectivas de cada una de ellas, por separado, sobre las biopelículas de *E. faecalis*. Los tiempos de contacto con las biopelículas se modificaron con el fin de aproximarse a los de uso clínico (30 segundos, 1 y 2 minutos). De la experiencia anterior se pudo concluir que los recuentos son muchos más exactos a la hora de establecer la MCEB; por ello, en esta sección no se incluyeron medidas de densidad óptica.

Los resultados de este estudio revelaron que cetrimida ejerció actividad bactericida sobre biopelículas de *E. faecalis* a partir de 30 segundos de exposición a una concentración de 0,5%. Los estudios que evalúan los efectos de cetrimida sobre *E. faecalis* son muy escasos. Tan sólo Bryce y cols.<sup>329</sup> demostraron que cetrimida eliminó y rompió la estructura de biopelículas creadas sobre filtros de membrana de nitrato de celulosa. Por el contrario y, coincidiendo con estudios previos<sup>330,331</sup>, en este estudio la solución de clorhexidina no ejerció actividad bactericida frente a las biopelículas de *E. faecalis* en ninguna de las diluciones y tiempos probados, lo cual es un resultado interesante teniendo en cuenta que la concentración inicial ensayada fue del 4%. Si en una situación *in vitro* esta concentración no erradicó biopelícula, no puede esperarse que lo haga en situación clínica.

Frente a la falta de efectividad de clorhexidina sola, al combinarla con cetrimida, los resultados, observados globalmente, muestran un alto grado de sinergismo en cuanto a la capacidad de erradicar biopelículas de *E. faecalis*. Para proceder a realizar una interpretación y discusión de estos resultados, se ha diseñado la Figura 19, la cual muestra de forma ilustrada la MCEB de cada una de las combinaciones en los tres tiempos de exposición así como de la solución de cetrimida.

Cuando cetrimida se asoció a clorhexidina fueron efectivas concentraciones 5 e incluso 10 veces más diluidas para erradicar los biofilms (0,01% y 0,05%) en un tiempo de exposición de 30 segundos. Este sinergismo se vuelve a confirmar con los resultados obtenidos tras 1 minuto de exposición; cetrimida sola erradicó las biopelículas a partir de una concentración del 0,0312% y a partir de concentraciones 3 veces inferiores cuando se asoció a clorhexidina al 0,125%.

---

<sup>329</sup> Bryce G, Ready D, Donnell DO, Ng P, Pratten J, Gulabivala K. Biofilm disruption by root canal irrigants and potential irrigants [abstract]. Int Endod J 2008;41:814-5.

<sup>330</sup> Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K. An *in vitro* evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. Int Endod J 2001;34:300-7.

<sup>331</sup> Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, Moles DR, Spratt DA. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. J Endod 2005;31:30-6.

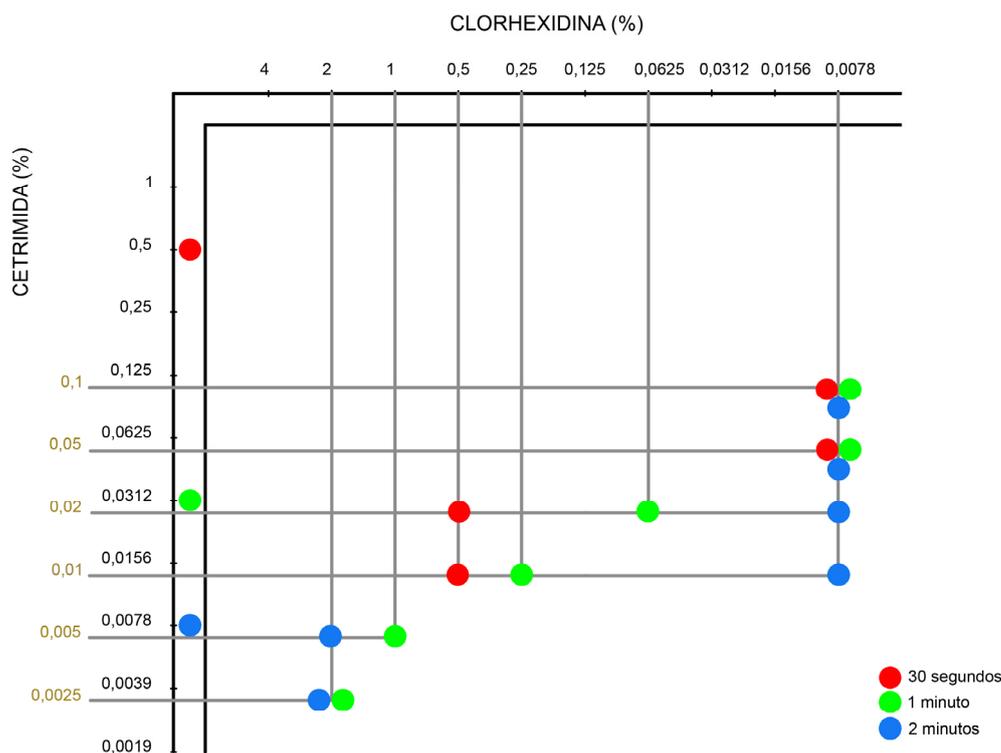


Figura 19. MCEB de cetrimida y combinaciones de cetrimida con clorhexidina tras 30 segundos, 1 y 2 minutos de contacto con las biopelículas de *E. faecalis*.

En un tiempo de 2 minutos, una solución única de cetrimida, ejerció su acción desde 0,0078% y, cuando se combinó con clorhexidina, fueron efectivas concentraciones iguales o superiores a 0,01% de cetrimida con todas las concentraciones probadas de clorhexidina. No obstante, combinaciones de cetrimida iguales o inferiores a 0,005% requirieron una concentración de clorhexidina de al menos un 2%. Por otra parte, al comparar el efecto en función del tiempo de exposición entre 1 y 2 minutos resultó paradójico encontrar que la efectividad era igual para combinaciones de CLX 2%/CTR 0,005% y CLX 2%/CTR 0,0025%. Estos resultados ponen de manifiesto que, en ningún caso, el uso de cetrimida debería ser inferior a concentración del 0,005%.

Revisando la bibliografía, no hemos encontrado artículos que ensayen la actividad bactericida de combinaciones de clorhexidina y cetrimida frente a biopelículas de *E. faecalis*.

Frente a *E. faecalis* en suspensión, D'Arcangelo y cols.<sup>332</sup> demostraron el efecto sinérgico entre la clorhexidina y cetrimida. Utilizaron el test de contacto directo cuantitativo para comparar la actividad antimicrobiana de soluciones de hipoclorito sódico desde 0,5% hasta 5% y distintas combinaciones de cetrimida y clorhexidina (CTR/CLX 0,2%/0,2%, 0,2%/1%, 0,2%/0,5%, 0,2%/0,4%, 0,2%/0,3%, 0,2%/0,4%, 0,3%/0,2%). Todos los antisépticos probados tuvieron efecto

<sup>332</sup> D'Arcangelo C, Varvara G, De Fazio P. An evaluation of the action of different root canal irrigants on facultative aerobic-anaerobic, obligate anaerobic, and microaerophilic bacteria. J Endod 1999;25:351-3.

bactericida sobre las cepas ensayadas sin diferencias. En la misma línea está el trabajo de Portenier y cols.<sup>333</sup> quienes encontraron que, frente a *E. faecalis* en suspensión, todas las combinaciones de clorhexidina con cetrimida (CLX/CTR 0,1%/0,1% y 0,01%/0,01%) fueron efectivas tras 30 segundos.

De los compuestos comerciales que combinan distintas soluciones, Cetrexidin<sup>®</sup> incluye clorhexidina y cetrimida. Onçağ y cols.<sup>334</sup>, compararon las propiedades antibacterianas de hipoclorito sódico al 5,25%, clorhexidina 2% y Cetrexidin<sup>®</sup>. En su estudio *ex vivo*, encontraron que las soluciones tanto de clorhexidina al 2% como de Cetrexidin<sup>®</sup> fueron más efectivas que el hipoclorito al 5,25%, lo que podría estar relacionado con la presencia de cetrimida en su composición que actúa como un detergente disminuyendo la tensión superficial. Los resultados de este estudio indicarían que cuando se añade cetrimida a la clorhexidina, ambos penetrarían con más facilidad que el hipoclorito en el conducto radicular y en los túbulos dentinarios, ejerciendo por tanto, mayor actividad bactericida. Por otra parte, estos resultados pueden ser debidos a la influencia de una técnica *ex vivo* en la que hay muchos factores, a veces imponderables, que pueden influir en los resultados.

Se debe tener en cuenta que el objetivo es eliminar las bacterias en biopelículas, de forma que, además del efecto bactericida, influyen otras propiedades de las soluciones irrigadoras, entre las que destacaría la capacidad de actuación sobre la matriz polimérica. Los surfactantes, entre los que se encuentra la cetrimida, son agentes que disminuyen la tensión superficial y favorecen la penetración y desestabilización de las fuerzas que mantienen unida la biopelícula, provocando la ruptura de la misma. Permitirían, por tanto, la difusión de clorhexidina en el interior de la biopelícula que tendría vía libre para ejercer su acción bactericida *per se*. Ello explicaría el efecto sinérgico tan elevado que se ha encontrado con la combinación de ambas soluciones. Según nuestros resultados, clorhexidina ejerce actividad bactericida frente a *E. faecalis* en suspensión (CMB 0,5%). Sin embargo, su efectividad ha sido inferior frente a biopelículas requiriendo la presencia de un surfactante que le permite penetrar en la biopelícula.

El modelo de biopelículas desarrollado en este trabajo de investigación, debe considerarse una técnica adecuada para determinar la sensibilidad de una biopelícula ante sustancias antimicrobianas. La excepcional resistencia de las bacterias, demostrada en el caso de clorhexidina, la solución de EDTA y los ácidos cítrico y fosfórico, surge en parte, de la baja tasa de crecimiento que tienen las bacterias dentro de las biopelículas, que las hace menos susceptibles a muchos antimicrobianos<sup>335</sup>. Además, esta resistencia es afectada por el estado nutricional de las bacterias y, como se ha indicado anteriormente, por la presencia de la matriz

---

<sup>333</sup> Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. *J Endod* 2006;32:138-41.

<sup>334</sup> Onçağ O, Hoşgör M, Hilmiöğlü S, Zekiöğlü O, Eronat C, Burhanoğlu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *Int Endod J* 2003;36:423-32.

<sup>335</sup> Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284:1318-22.

polimérica que al estar dotada de carga negativa, restringe la entrada de sustancias dotadas de carga positiva como es el caso de clorhexidina.

A pesar de que las soluciones ácidas no hayan demostrado capacidad para erradicar biopelículas de *E. faecalis*, a diferencia del hipoclorito y clorhexidina que poseen un efecto químico directo, esto no implica que carezcan de capacidad de desinfección mecánica mediante la expulsión de los detritus acumulados durante la instrumentación<sup>336</sup> así como la eliminación del barrillo dentinario<sup>337</sup>. No obstante, siguen quedando bacterias residuales en el sistema de conductos radiculares requiriendo la aplicación de una solución con actividad antimicrobiana frente a las biopelículas<sup>338</sup>.

La irrigación del sistema de conductos tiene como objetivos, además de eliminar los microorganismos, remover el barrillo dentinario y disolver restos de tejido pulpar. Hasta la fecha, no se ha encontrado una solución irrigadora única que los cumpla todos. Ante esta carencia y la necesidad de simplificar las técnicas de irrigación, son cada vez más los compuestos irrigadores que incluyen diversas sustancias con propiedades distintas. En el caso de clorhexidina y cetrimida, hemos obtenido que el efecto de ambas se potencia, aunque más bien podría decirse que cetrimida favorece el efecto de la clorhexidina, ya que ésta sola no tiene poder para erradicar biopelículas. No obstante, se desconoce qué ocurriría si se aplicaran de forma alternada en vez de combinada, lo que constituye la continuación de esta línea de trabajo.

En la actualidad existen diversas soluciones irrigadoras con propiedades antimicrobianas, quelantes, surfactantes, así como, otras de probado efecto a nivel sistémico como los antibióticos, e incluso productos de origen natural como el chitosán y própolis, cuya efectividad frente a biopelículas de *E. faecalis* es desconocida. Un mejor conocimiento de todos ellos permitirá incrementar la eficacia de la limpieza y desinfección de los conductos radiculares y, por ende, mejorar el pronóstico de la terapéutica endodóntica. En definitiva aumentar la vida media de los dientes.

Los resultados del presente trabajo no se pueden extrapolar a la situación clínica real. Por ello se requieren investigaciones que simulen las condiciones endodónticas (*ex vivo*) e *in vivo* para reproducir las circunstancias en que las bacterias crecen en el interior del sistema de conductos. Sin embargo, este tipo de estudios deberán estar basados en resultados previos obtenidos de ensayos *in vitro*.

<sup>336</sup> El Karim I, Kennedy J, Hussey D. The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2007;103:560-9.

<sup>337</sup> Pérez-Heredía M, Ferrer-Luque CM, González Rodríguez MP. The effectiveness of different acid irrigating solutions in root canal cleaning after hand and rotary instrumentation. J Endod 2006;32:993-7.

<sup>338</sup> Kishen A, Sum CP, Mathew S, Lim CT. Influence of irrigation regimens on the adherence of *Enterococcus faecalis* to root canal dentin. J Endod 2008;34:850-4.



## **6. CONCLUSIONES**



1. Todas las soluciones irrigadoras evaluadas, excepto EDTA, mostraron actividad bactericida frente a *Enterococcus faecalis* en suspensión.
2. El tiempo necesario para ejercer la actividad bactericida de las soluciones irrigadoras fue de 30 segundos para concentraciones de hipoclorito sódico desde 0,5% al 5,25%; de 3, 10 y 25 minutos para soluciones de clorhexidina al 0,12%, 0,2% y 2% respectivamente; de 10 y 3 minutos para soluciones de ácido cítrico al 10% y 25% respectivamente; y de 5 y 3 minutos para el ácido fosfórico al 2,5% y 5% respectivamente.
3. El MBEC™ HTP es un método adecuado para la creación de 96 biopelículas estadísticamente equivalentes permitiendo controlar múltiples variables en un mismo ensayo: condiciones de formación de biopelículas, concentraciones de antimicrobianos y tiempos de exposición.
4. El hipoclorito sódico fue la solución más efectiva para erradicar las biopelículas de *E. faecalis* seguida de clorhexidina. Las soluciones ácidas no erradicaron las biopelículas a ninguna de las concentraciones y tiempos ensayados.
5. Ceftriaxona erradicó las biopelículas de *E. faecalis* a partir de 30 segundos de exposición. Cuando se combinó con clorhexidina se potenció la capacidad para erradicar biopelículas.
6. La forma de crecimiento en suspensión ha resultado ser más vulnerable a la acción de todas las soluciones ensayadas a excepción del hipoclorito sódico, que ha sido efectivo frente a bacterias planctónicas y frente a biopelículas.



## **7. BIBLIOGRAFÍA**



- Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, Moles DR, Spratt DA. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. J Endod 2005;31:30-6.
- AFNOR. Antiseptiques et désinfectants. AFNOR NF T 72-150, Paris, 1995;17-39.
- Al-Adham IS, Al-Hmoud ND, Khalil E, Kierans M, Collier PJ. Microemulsions are highly effective anti-biofilm agents. Lett Appl Microbiol 2003;36:97-100.
- Anderson TF. Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. Trans NY Acad Sci 1951;13:130-3.
- Andrewes FW, Horder TJ. A study of the streptococci pathogenic for man. Lancet 1906;11:708-13.
- APHA (American Public Health Association). Standard methods for the examination of water and wastewater. 7<sup>a</sup> ed. APHA. Washington;1989:4-51.
- Ates M, Akdeniz BG, Sen BH. The effect of calcium chelating or binding agents on *Candida albicans*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2005;100:626-30.
- Ayad MF. Effects of rotatory instrumentation and different etchants on removal of smear layer on human dentin. J Prosthet Dent 2001;85:67-72.
- Ayhan H, Sultan N, Cirak M, Ruhi MZ, Bodur H. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. Int Endod J 1999;32:99-102.
- Baumgartner JC, Cuenin PR. Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. J Endod 1992;18:605-12.
- Bryce G, Ready D, Donnell DO, Ng P, Pratten J, Gulabivala K. Biofilm disruption by root canal irrigants and potential irrigants [abstract]. Int Endod J 2008;41:814-5.
- Buck RA, Eleazer PD, Staat RH, Scheetz JP. Effectiveness of three endodontic irrigants at various tubular depths in human dentin. J Endod 2001;27:206-8.
- Bulacio M de L, Cangemi R, Cecilia M, Raiden G. In vitro antibacterial effect of different irrigating solutions on *Enterococcus faecalis*. Acta Odontol Latinoam 2006;19:75-80.
- Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. J Dent Res 1955;34:849-53.
- Byström A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. Int Endod J 1985;18:35-40.
- Campanhã MTN, Mamizuka EM, Carmona-Ribeiro AM. Interactions between cationic liposomes and bacteria: the physical-chemistry of the bactericidal action. J Lipid Res 1999;40:1495-500.
- Carson KR, Goodell GG, McClanahan SB. Comparison of the antimicrobial activity of six irrigants on primary endodontic pathogens. J Endod 2005;31:471-3.

Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 1999;37:1771-6.

Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms *in vitro*. *J Endod* 2006;32:434-7.

Cloete TE, Jacobs L, Brözel VS. The chemical control of biofouling in industrial water systems. *Biodegradation* 1998;9:23-37.

Cloete TE. Resistance mechanism of bacteria to antimicrobial compounds. *Int Biodeterioration Biodegradation* 2003;51:277-82.

Colección Española de Cultivos Tipo. Página web: <http://www.cect.org/>. Acceso 11 febrero 2009.

Collins MD, Jones D, Farrow JAE, Kilpper-Balz R, Schleifer KH. *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1984 34: 220-3.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284:1318-22.

Cunningham WT, Balekjian AY. Effect of temperature on collagen-dissolving ability of sodium hypochlorite endodontic irrigant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1980;49:175-7.

Dametto FR, Ferraz CC, de Almeida Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99:768-72.

Danese P, Pratt L, Kolter R. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol* 2000;182:3593-6.

D'Arcangelo C, Varvara G, De Fazio P. An evaluation of the action of different root canal irrigants on facultative aerobic-anaerobic, obligate anaerobic, and microaerophilic bacteria. *J Endod* 1999;25:351-3.

Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 1998;280:295-8.

de Beer D, Stoodley P, Roe F, Lewandowski Z. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol Bioeng* 1994;43:1131-8.

Decho, A. Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research* 2000;20:1257-73.

Distel J, Hatton J, Gillespie J. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod*, 2002;28:689-93.

do Amorim CV, Aun CE, Mayer MP. Susceptibility of some oral microorganisms to chlorhexidine and paramonochlorophenol. *Braz Oral Res* 2004;18:242-6.

- Duggan JM, Sedgley CM. Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*. J Endod 2007;33:815-8.
- Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. J Endod 2006;32:527-31.
- El Karim I, Kennedy J, Hussey D. The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2007;103:560-9.
- Emilson CG. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. Scand J Dent Res 1977;85:255-65.
- Espigares E, Bueno A, Espigares M, Gálvez R. Isolation of *Salmonella* serotypes in wastewater and effluent: Effect of treatment and potential risk. Int J Hyg Environ-Health 2006;209:103-7.
- Estrela C, Ribeiro RG, Estrela CRA, Pecora JD, Sousa-Neto MD. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. Braz Dent J 2003;14:58-62.
- European Committee for Standardization. Norma española UNE-EN 1040. Antisépticos y desinfectantes químicos. Actividad bactericida básica. Método de ensayo y requisitos (fase 1). AENOR, Madrid, 1997.
- Ferrer-Luque CM, González López S, Navajas Rodríguez de Mondelo JM. Mechanical instrumentation of the root canals. A study using SEM and computerized image analysis. Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol 1996;39:111-7.
- Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. Oral Microbiol Immunol 2003;18:234-9.
- Garberoglio R, Becce C. Smear layer removal by root canal irrigants. A comparative scanning electron microscopic study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1994;78:359-67.
- George S, Kisben A, Song KP. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. J Endod 2005;31:867-72.
- Georgopoulou M, Kontakiotis E, Nakou M. Evaluation of the antimicrobial effectiveness of citric acid and sodium hypochlorite on the anaerobic flora of the infected root canal. Int Endod J 1994;27:139-43.
- Giardino L, Ambu E, Becce C, Rimondini L, Morra M. Surface tension comparison of four common root canal irrigants and two new irrigants containing antibiotic. J Endod 2006;32:1091-3.
- Giardino L, Ambu E, Savoldi E, Rimondini R, Cassanelli C, Debbia EA. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of sodium hypochlorite, MTAD, and Tetraclean against *Enterococcus faecalis* biofilm. J Endod 2007;33:852-5.
- Gilbert P, Das JR, Jones MV, Allison DG. Assessment of resistance towards biocides following the attachment of micro-organisms to, and growth on, surfaces. J Appl Microbiol 2001;91:248-54.
- Goldberg F, Abramovich A. Analysis of the effect of EDTAC on the dentinal walls of the root canal. J Endod 1977;3:101-5.

Goldman LB, Goldman M, Kronman JH, Lin PS. The efficacy of several irrigating solutions for endodontics: a scanning electron microscopic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1981;52:197-204.

Gomes BPFA, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2001;34:424-8.

Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:71-6.

Grawehr M, Sener B, Waltimo T, Zehnder M. Interactions of ethylenediamine tetraacetic acid with sodium hypochlorite in aqueous solutions. *Int Endod J* 2003;36:411-7.

Guibaud G, Tixier N, Bouju A, Baudu M. Relation between extracellular polymers' composition and its ability to complex Cd, Cu and Pb. *Chemosphere* 2003;52:1701-10.

Haapasalo M, Endal U, Zandi H, Coil J. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. *Endod Topics* 2005;10:77-102.

Haapasalo M, Orstavik D. *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987;66:1375-9.

Haapasalo M, Ranta H, Ranta KT. Facultative gram-negative enteric rods in persistent periapical infections. *Acta Odontol Scand* 1983;41:19-22.

Hales JJ, Jackson CR, Everett AP, Moore SH. Treatment protocol for the management of a sodium hypochlorite accident during endodontic therapy. *Gen Dent*. 2001;49:278-81

Hancock HH, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91:579-86.

Harrison JJ, Ceri H, Roper NJ, Badry EA, Sproule KM, Turner RJ. Persister cells mediate tolerance to metal oxyanions in *Escherichia coli*. *Microbiology* 2005;151:3181-95.

Harrison JJ, Ceri H, Stremick C, Turner RJ. Biofilm susceptibility to metal toxicity. *Environ Microbiol* 2004;6:1220-7.

Harrison JJ, Ceri H, Yerly J, Stremick CA, Hu Y, Martinuzzi R, Turner RJ. The use of microscopy and three-dimensional visualization to evaluate the structure of microbial biofilms cultivated in the Calgary Biofilm Device. *Biol Proced Online* 2006;8:194-215.

Harrison JJ, Turner RJ, Ceri H. High-throughput metal susceptibility testing of microbial biofilms. *BMC Microbiol* 2005;5:53.

Hayashi M, Takahashi Y, Hirai M, Iwami Y, Imazato S, Ebisu S. Effect of endodontic irrigation on bonding of resin cement to radicular dentin. *Eur J Oral Sci* 2005;113:70-6.

Haznedaroglu F. Efficacy of various concentrations of citric acid at different ph values for smear layer removal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;96:340-4.

- Heling I, Chandler NP. Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. *Int Endod J* 1998;31:8-14.
- Hems RS, Gulabivala K, Ng YL, Ready D, Spratt DA. An *in vitro* evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2005;38:22-9.
- Hoppe HG. Microbial extracellular enzyme activity: a new key parameter in aquatic ecology. En: *Microbial Enzymes in Aquatics Environments*. Springer. Berlin;1991:60-83.
- Huang CT, Yu FP, McFeters GA, Stewart PS. Nonuniform spatial patterns of respiratory activity within biofilms during disinfection. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:2252-6.
- Hubble TS, Hatton JF, Nallapareddy SR, Murray BE, Gillespie MJ.. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:121-6.
- Hülsmann M, Hahn W. Complications during root canal irrigation: literature review and case reports. *Int Endod J* 2000;33:186-93.
- Innovotech. Página web: <http://www.innovotech.ca/>. Acceso el 24 de enero de 2009.
- Jeanson MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod* 1994;20:276-8.
- Jiménez-Rubio A, Segura JJ, Llamas R, Jiménez-Planas A, Guerrero JM, Calvo JR. In vitro study of the effect of sodium hypochlorite and glutaraldehyde on substrate adherence capacity of macrophages. *J Endod* 1997;23:562-4.
- Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;20:340-9.
- Kishen A, Sum CP, Mathew S, Lim CT. Influence of irrigation regimens on the adherence of *Enterococcus faecalis* to root canal dentin. *J Endod* 2008;34:850-4.
- Krause TA, Liewehr FR, Hahn CL. The antimicrobial effect of MTAD, sodium hypochlorite, doxycycline, and citric acid on *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2007;33:28-30.
- Kugler R, Bouloussa O, Rondelez F. Evidence of a charge-density threshold for optimum efficiency of biocidal cationic surfaces. *Microbiology* 2005;151:1341-8.
- Lee W, Lim S, Son HH, Bae KS. Sonicated extract of *Enterococcus faecalis* induces irreversible cell cycle arrest in phytohemagglutinin-activated human lymphocytes. *J Endod* 2004;30:209-12.
- Leonardo MR, da Silva LA, Filho MT, Bonifácio KC, Ito IY. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a castor oil-based irrigant. *J Endod* 2001;27:717-9.
- Lima KC, Fava LR, Siqueira JF Jr. Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* biofilms to some antimicrobial medications. *J Endod* 2001;27:616-9.
- Lin YH, Mickel AK, Chogle S. Effectiveness of selected materials against *Enterococcus faecalis*: part 3. The antibacterial effect of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2003;29:565-6.

Liu H, Herbert HP, Fang HP Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *J. Biotechnol* 2002;95:249-56.

Love RM. *Enterococcus faecalis*: a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001;34:399-405.

McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:147-79.

Merianos JJ. Quaternary ammonium antimicrobial compounds. En: *Disinfection, Sterilization, and Preservation*. 4<sup>a</sup> ed. Block SS. Philadelphia: Lea & Febiger;1991:225-62.

Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998;31:1-7.

Naenni N, Thoma K, Zehnder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. *J Endod* 2004;30:785-7.

Nair PN, Sjögren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod* 1990;16:580-8.

Nikolaus BE, Wayman BE, Encinas E. The bactericidal effect of citric acid and sodium hypochlorite on anaerobic bacteria. *J Endod* 1988;14:31-4.

Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Takemura N, Ebisu S. Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis. *J Endod* 2002;28:679-83.

Nygaard-Østby B. Chelation in root canal therapy. *Odontol Tidskr* 1957;65:3-11.

Ohara P, Torabinejad M, Kettering JD. Antibacterial effects of various endodontic irrigants on selected anaerobic bacteria. *Endod Dent Traumatol* 1993;9:95-100.

Onçağ O, Hoşgör M, Hilmioglu S, Zekioglu O, Eronat C, Burhanoğlu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *Int Endod J* 2003;36:423-32.

Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 1990;6:142-9.

Parsons GJ, Patterson SS, Miller CH, Katz S, Kafrawy AH, Newton CW. Uptake and release of chlorhexidine by bovine pulp and dentin specimens and their subsequent acquisition of antibacterial properties. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1980;49:455-9.

Patterson SS. *In vivo* and *in vitro* studies of the effect of the disodium salt of ethylenediamine tetra-acetate on human dentine and its endodontic implications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1963;16:83-103.

Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *J Endod* 2000;26:593-5.

Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeast and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J* 2001;34:429-34.

Pérez-Heredia M, Ferrer-Luque CM, González Rodríguez MP, Martín-Peinado FJ, González-López S. Decalcifying effect of 15% EDTA, 15% citric acid, 5% phosphoric acid, and 2.5% sodium hypochlorite on root canal dentine. *Int Endod J* 2008;41:418-23.

Pérez-Heredia M, Ferrer-Luque CM, González Rodríguez MP. The effectiveness of different acid irrigating solutions in root canal cleaning after hand and rotary instrumentation. *J Endod* 2006;32:993-7.

Piard JC, Desmazeaud M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. I. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait* 1992;71:525-41.

Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003;36:1-11.

Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:100-3.

Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. *J Endod* 2006;32:138-41.

Potts M. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol Rev* 1994;58:755-805.

Purevdorj B, Costerton JW, Stoodley P. Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:4457-64.

Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, Hababbeh N, Qualtrough A, Worthington H, Drucker DB. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2004;37:438-46.

Ramachandran Nair PN. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod* 1987;13:29-39.

Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004;30:315-20.

Russel AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ. Evaluation of antibacterial and antifungal efficacy. *En: Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*. 3<sup>a</sup> ed. Blackwell Science LTD. Oxford;1999:124-48.

Russell AD, Chopra I. Understanding antibacterial action and resistance. 2<sup>a</sup> ed. Ellis Horwood. Chichester;1996.

Saleh IM, Ruyter IE, Haapasalo M, Ørstavik D. The effects of dentine pretreatment on the adhesion of root-canal sealers. *Int Endod J* 2002;35:859-66.

Sassone LM, Fidel R, Fidel S, Vieira M, Hirata R Jr. The influence of organic load on the antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine *in vitro*. *Int Endod J* 2003;36:848-52.

Sassone LM, Fidel RA, Fidel SR, Dias M, Hirata RJ. Antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine using a contact test. *Braz Dent J* 2003;14:99-102.

Sassone LM, Fidel RA, Murad CF, Fidel SR, Hirata R Jr. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine by two different tests. *Aust Endod J* 2008;34:19-24.

Schleifer KH, Kilpper-Bälz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1984;34:31-4.

Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB. Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:95-101.

Sen BH, Akdeniz BG, Denizci AA. The effect of ethylenediamine-tetraacetic acid on *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;90:651-5.

Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J* 2006;39:878-85.

Settembrini L, Boylan R, Strassler H, Scherer W. A comparison of antimicrobial activity of etchants used for a total etch technique. *Oper Dent* 1997;22:84-8.

Sherman JM. The streptococci. *Bacteriol Rev* 1937;1:3-97.

Shurrab MY. Antimicrobial efficiency of some antiseptic products on endodontic microflora isolated from gangrenous pulp tissue. *J Contemp Dent Pract* 2006;7:53-62.

Simões M, Pereira MO, Vieira MJ. Effect of mechanical stress on biofilms challenged by different chemicals. *Water Res* 2005;39:5142-52.

Siqueira JF Jr, Batista MM, Fraga RC, de Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod* 1998;24:414-6.

Siqueira JF Jr, Lopes HP. Bacteria on the apical root surfaces of untreated teeth with periradicular lesions: a scanning electron microscopy study. *Int Endod J* 2001;34:216-20.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Santos SR, Lima KC, Magalhães FA, de Uzeda M. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. *J Endod* 2002;28:181-4.

Siqueira JF Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J* 2001;34:1-10.

Sjogren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod* 1990;16:498-504.

Smith JJ, Wayman BE. An evaluation of the antimicrobial effectiveness of citric acid as a root canal irrigant. *J Endod* 1986;12:54-8.

Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K. An *in vitro* evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *Int Endod J* 2001;34:300-7.

- Steinberg D, Abid-el-Raziq D, Heling I. *In vitro* antibacterial effect of RC-Prep components on *Streptococcus sobrinus*. Endod Dent Traumatol 1999;15:171-4.
- Stewart PS, Grab L, Diemer JA. Analysis of biocide transport limitation in an artificial biofilm system. J Appl Microbiol 1998;85:495-500.
- Stoodley P, Dodds I, Boyle JD, Lappin-Scott H. Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. J Appl Microbiol 1999;85:19S-28S.
- Stoodley P, Jacobsen A, Dunsmore BC, Purevdorj B, Wilson S, Lappin-Scott HM, Costerton JW. The influence of fluid shear and  $AlCl_3$  on the material properties of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and *Desulfovibrio* sp. EX265 biofilms. Water Sci. Technol. 2001;43:113-120.
- 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;32:93-8.
- Sundqvist G, Fidgor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1998;85:86-93.
- Takemura N, Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Noguchi N, Ebisu S. Single species biofilm-forming ability of root canal isolates on gutta-percha points. Eur J Oral Sci 2004;112:523-9.
- Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. Cell Mol Life Sci 2003;60:2622-36.
- Torabinejad M, Cho Y, Khademi AA, Bakland LK, Shabahang S. The effect of various concentrations of sodium hypochlorite on the ability of MTAD to remove the smear layer. J Endod. 2003;29:233-9.
- Torabinejad M, Shabahang S, Aprecio RM, Kettering JD. The antimicrobial effect of MTAD: an *in vitro* investigation. J Endod 2003;29:400-3.
- Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, 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;97:79-84.
- Vieira DB, Carmona-Ribeiro AM. Cationic lipids and surfactants as antifungal agents: mode of action. J Antimicrob Chemother 2006;58:760-7.
- Vieira MJ, Melo LF, Pinheiro MM. Biofilm formation: hydrodynamic effects on internal diffusion and structure. Biofouling 1993;7:67-80.
- Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. J Bacteriol 2000;182:2675-9.
- White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. J Endod 1997;23:229-31.
- Whitfield C, Valvano MA. Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in gram-negative bacteria. Adv Microb Physiol 1993;35:135-246.

Williamson AE, Cardon JW, Drake DR. Antimicrobial susceptibility of monoculture biofilms of a clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. J Endod 2009;35:95-7.

Yamaguchi M, Yoshida K, Suzuki R, Nakamura H. Root canal irrigation with citric acid solution. J Endod 1996;22:27-9.

Yoshida T, Shibata T, Shinohara T, Gomyo S, Sekine I. Clinical evaluation of the efficacy of EDTA solution as an endodontic irrigant. J Endod 1995;21:592-3.

Zehnder M, Kosicki D, Luder H, Sener B, Waltimo T. Tissue-dissolving capacity and antibacterial effect of buffered and unbuffered hypochlorite solutions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2002;94:756-62.

Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T. Chelation in root canal therapy reconsidered. J Endod 2005;31:817-20.

Zehnder M. Root canal irrigants. J Endod 2006;32:389-98.

Zhang W, Torabinejad M, Li Y. Evaluation of cytotoxicity of MTAD using the MTT-tetrazolium method. J Endod 2003;29:654-7.

## **8. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA**



Resultados parciales de este trabajo de Tesis Doctoral han sido publicados e informados previamente en las siguientes revistas científicas y Congresos:

### **Publicaciones:**

Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-Rodríguez E, Liébana-Ureña J, Espigares-García M. Bactericidal activity of phosphoric acid, citric acid, and EDTA solutions against *Enterococcus faecalis*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2008; 106: e84-89. (ANEXO I).

Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-García M, Baca P. *Enterococcus faecalis* biofilms eradication by root canal irrigants. J Endod 2009. En prensa. (ANEXO II).

### **Congresos:**

XXVIII Congreso Nacional Asociación Española de Endodoncia (AEDE). Madrid, 1–3 Noviembre de 2007.

Título: Actividad bactericida de soluciones de ácido ortofosfórico, ácido cítrico y EDTA frente a *Enterococcus faecalis*.

2nd World Conference on Magic Bullets (Ehrlich II). Nuremberg, Alemania, 3 – 5 Octubre de 2008.

Título: Magic Bullets in Removing *Enterococcus faecalis* Biofilms.

XXIX Congreso Nacional Asociación Española de Endodoncia (AEDE). Valladolid, 30 - 31 Octubre y 1 Noviembre de 2008.

Título: Efectividad de soluciones irrigadoras frente a biopelículas de *Enterococcus faecalis*.

ConsEuro 2009, European Federation of Conservative Dentistry (EFCD) y la Sociedad Española de Odontología Conservadora (SEOC). Sevilla, 12 – 14 de Marzo de 2009.

Título: Eradication of *Enterococcus faecalis* biofilms by chlorhexidine and cetrimide.



## ANEXO I

### Bactericidal activity of phosphoric acid, citric acid, and EDTA solutions against *Enterococcus faecalis*

María Teresa Arias-Moliz, BDS,<sup>a</sup> Carmen María Ferrer-Luque, DDS, MD, PhD,<sup>b</sup>  
Elena Espigares-Rodríguez, PhD,<sup>c</sup> José Liébana-Ureña, PhD, MD,<sup>d</sup> and  
Miguel Espigares-García, PhD,<sup>e</sup> Granada, Spain  
UNIVERSITY OF GRANADA

**Objectives.** The objectives of this study were to evaluate the minimal bactericidal concentration (MBC) for *Enterococcus faecalis* of phosphoric acid, citric acid, and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solutions, and to determine the contact time required for 2.5% and 5% phosphoric acid, 10% and 25% citric acid, and 17% EDTA to exert bactericidal activity.

**Study design.** Bactericidal activity was tested by means of the dilution neutralization method in accordance with BS-EN-1040:2005 norm, using contact times of 0.5 to 60 minutes.

**Results.** The MBCs of citric and phosphoric acid were 20% and 2.5%, respectively. EDTA solution lacks bactericidal activity, even after 60 minutes of contact. The 2.5% and 5% phosphoric acid solutions required 5- and 3-minute contact times, and the 10% and 25% citric acid solutions required 10- and 3-minute contact times, respectively.

**Conclusions.** Phosphoric acid revealed bactericidal activity against *E. faecalis* and required less time than citric acid to exert its activity. (*Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106:e84-e89)

Bacteria and their by-products play an essential role in the establishment and development of pulpal and periapical diseases.<sup>1</sup> Although root canal microflora largely comprise obligate anaerobic organisms, some facultative anaerobes such as *Enterococcus faecalis* are implicated in the persistence of infection, influencing the prognosis of endodontic treatment.<sup>2-7</sup> *E. faecalis* is able to survive and persist as a pathogen in the root canals and dentinal tubules of teeth<sup>8,9</sup> and is present in many endodontic failures.<sup>10</sup>

Once bacteria are established within the root canal system, they cannot be eliminated by host defense mechanisms, therefore pulpal infections must be treated by chemical-mechanical procedures.<sup>8</sup> Instrumentation of the root canal system removes a large amount of irritants, but complete debridement is hampered by its complex anatomy,<sup>11</sup> and irrigation of the root canal is

essential for cleaning and disinfection during endodontic preparation.<sup>9,12-14</sup> Ideally, root canal irrigants should have a broad antimicrobial efficacy, dissolve organic tissue remnants, have a low systemic toxicity, and remove the smear layer.<sup>15</sup>

The most widely used endodontic irrigant is 0.5% to 6.0% sodium hypochlorite (NaOCl),<sup>16,17</sup> because of its bactericidal activity and ability to dissolve vital and necrotic organic tissue.<sup>12,13</sup> However, NaOCl solutions exert no effects on inorganic components of smear layer. Chelant and acid solutions have been recommended for removing the smear layer from instrumented root canals, including ethylene-diaminetetraacetic acid (EDTA), citric acid, and phosphoric acid.<sup>18-20</sup> The antimicrobial activity of citric acid and EDTA has been previously studied,<sup>11,14,15,21-30</sup> including their action against *E. faecalis*.<sup>14,15,28</sup>

Phosphoric acid is routinely used in dental practice as a conditioner and to remove smear layer and open dentin tubules. The antimicrobial activity of this acid may be related to an increased external hydrogen-ion concentration, which inhibits the metabolism and hence the growth of many microorganisms.<sup>31</sup> Some research has been published on the removal of smear layer with this acid solution. Garberoglio and Becce<sup>18</sup> compared 24% phosphoric acid plus 10% citric acid with 17% and 3% EDTA and obtained similar root canal cleaning results with each solution. Ayad<sup>19</sup> reported the partial removal of smear layer after a 10-second application of 10% phosphoric acid or 10% citric acid and its complete removal after a similar application of 32% phos-

<sup>a</sup>Postgraduate Student, Department of Operative Dentistry, Faculty of Dentistry, University of Granada, Spain.

<sup>b</sup>Associate Professor, Department of Operative Dentistry, Faculty of Dentistry, University of Granada, Spain.

<sup>c</sup>Assistant Professor, Department of Preventive Medicine and Public Health, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Spain.

<sup>d</sup>Professor, Department of Microbiology, Faculty of Dentistry, University of Granada, Spain.

<sup>e</sup>Professor, Department of Preventive Medicine and Public Health, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Spain.

Received for publication Jan 31, 2008; returned for revision Apr 3, 2008; accepted for publication Apr 4, 2008.

1079-2104/\$ - see front matter

© 2008 Mosby, Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.tripleo.2008.04.002

phoric acid. No significant differences in smear layer removal were found after the use of 15% EDTA, 15% citric acid, or 5% phosphoric acid solutions.<sup>20</sup> It has also been demonstrated that root dentin pretreatment with phosphoric acid enhances adhesion of resin-based endodontic sealers<sup>32,33</sup> and that this acid is effective to decalcify root canal dentin.<sup>34</sup>

Phosphoric acid has been demonstrated to have antimicrobial activity against bacteria commonly found within the oral cavity<sup>35</sup> but not against *E. faecalis*. The objectives of this in vitro study were to determine the minimal bactericidal concentration (MBC) against *E. faecalis* of phosphoric acid, citric acid, and EDTA solutions and to determine the time period required for solutions of 2.5% and 5% phosphoric acid, 10% and 25% citric acid, and 17% EDTA to exert their bactericidal activity.

## MATERIALS AND METHODS

### Irrigants

The irrigants tested were EDTA (Merck, Darmstadt, Germany), citric acid (Merck), and phosphoric acid (Merck). The 17% (wt/vol) EDTA solution was prepared by dissolving 17 g of disodium EDTA in sterile distilled water to reach a final volume of 100 mL after addition of sodium hydroxide (NaOH) to favor dissolution and attain a pH of 7. The 10% and 25% (wt/vol) citric acid solutions were prepared by dissolving 10 and 25 g, respectively, of acid in sterile distilled water to a volume of 100 mL. The 2.5% and 5.0% (vol/vol) phosphoric acid solutions were prepared by dissolving 2.94 and 5.88 mL of the acid, respectively, in sterile distilled water to a volume of 100 mL. All solutions were homogenized by constant stirring using a magnetic multi-stirrer and were sterilized by means of 0.22-micron pore-size sterile filters (Millipore, Billerica, MA).

### Neutralizers

The neutralizers tested for the EDTA, citric acid, and phosphoric acid solutions were designated A, B, and C, respectively.

- Neutralizer A: Tween 80, 32.25 g; 40% sodium bisulphate, 6.25 mL; sodium thiosulfate pentahydrate, 3.922 g; calcium chloride, 2.525 g; diluent to 250 mL. Adjusted to pH 7 and sterilized by filtration. One gram of lecithin was aseptically added.<sup>36</sup>
- Neutralizer B: Mixture of 70 mL 0.2 M sodium bicarbonate with approximately 30 mL of 0.2 M sodium carbonate to a pH of 9.6. Sterilized by filtration.
- Neutralizer C: Half the concentration of Neutralizer B, obtained by dilution with distilled water.

The diluent (tryptone-salt) comprised 1 g tryptone, 8.5 g sodium chloride, and 1000 mL distilled water, boiling the mixture to completely dissolve the ingredients. It was adjusted to a pH of 7.2 and sterilized at 121 °C for 20 minutes.

### Bacterial strain

*E. faecalis* strain ATCC 29212 was obtained from the *Colección Española de Cultivos Tipo* (CECT 795, Burjassot, Valencia, Spain) and underwent 3 passages on maintenance agar medium (15 g casein triptic peptone, 15 g soy peptone, 5 g sodium chlorate, 15 g agar, 1000 mL distilled water; pH 7.2 ± 0.2) with intervals of 18 to 24 hours. A suspension of *E. faecalis* in diluent was prepared and the optical density of the solution was adjusted at a wavelength of 620 nm until an absorbance value of 0.3 to 0.4 was obtained, equivalent to 1 to 3 × 10<sup>8</sup> CFU/mL. The number of CFU/mL in this suspension was confirmed by a bacteria count. The suspension was kept at 20 °C in a thermostat-controlled bath until use. The interval between preparation and use was always less than 15 minutes.

### Determination of MBC of irrigants

Bactericidal activity of irrigants was tested according to BS-EN-1040:2005<sup>37</sup> by means of the dilution-neutralization method. The temperature of the assay was 20 °C and the contact time was 5 minutes.<sup>38</sup> Ten 50% dilutions were made of the 17% EDTA and 5% phosphoric acid solutions. For the citric acid solutions, 4 of the 10 dilutions were made at concentrations used in clinical practice and reported in previous studies<sup>14,15,23,25</sup> (25%, 20%, 15%, and 10%) and the remaining 6 were 50% dilutions.

The efficacy and innocuousness of each neutralizer was tested by considering the following bacterial counts: (1) count of initial bacterial suspension (N); (2) count after 5-minute contact between bacterial suspension and neutralizer (N'); (3) count after 10-minute contact between irrigant and neutralizer and 5-minute contact between irrigant-neutralizer mixture and bacterial suspension (n'). Neutralizers had to meet the criteria of approximately equal values for N and N' (N ≈ N') and a reduction in bacterial production of less than 50% (n' ≥ 0.5 N').

The MBC of the irrigants was determined from the count after 5-minute contact between irrigant and bacterial suspension and 10-minute contact between irrigant-suspension mixture and neutralizer (n). A concentration of irrigant was considered to exert bactericidal activity when it produced a reduction of 5 or more logarithmic units (10<sup>-5</sup>) in the number of bacterial cells.<sup>37</sup> The logarithmic reduction was calculated by using the formula: log (N' × 10<sup>4</sup>) - log n.

**Table I.** Efficacy of neutralizers against irrigants

Irrigant	Neutralizer	Mean bacterial count (CFU/mL)		
		N	N'	n'
EDTA	A	167.3	155.0	144.0
Citric acid	B	196.8	189.3	138.3
Phosphoric acid	C	184.5	168.8	157.5

N, initial suspension; N', 5-minute contact between bacterial suspension and neutralizer; n', 10-minute contact between irrigant and neutralizer and 5-minute contact between irrigant-neutralizer mixture and bacterial suspension.

**Determination of contact time required for irrigants to exert antibacterial activity**

The dilution-neutralization method was used, selecting the following contact times: 0.5, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, and 60 minutes. The irrigants were assayed at concentrations of 10% (pH 1.6) and 25% (pH 1.2) citric acid, 2.5% (pH 1.2) and 5.0% (pH 1) phosphoric acid, and 17% EDTA (pH 7). The procedure described above was followed to determine the time required for the solutions to exert bactericidal activity and to calculate the logarithmic reduction. Assays were done in triplicate. Sterility controls were performed to test the absence of contamination throughout the experiment.

**RESULTS**

Table I shows the results of the neutralizer assays. Each neutralizer tested was effective against its corresponding irrigant and showed no toxicity. EDTA solution exerted no bactericidal activity against *E. faecalis* at either of the concentrations studied. The MBCs of citric acid and phosphoric acid were 20% and 2.5%, respectively.

Results for the contact time required for the bactericidal activity of the irrigants are shown in Table II. *E. faecalis* was eliminated by 25% citric acid solution after 3 minutes, by 10% citric acid solution after 10 minutes, by 2.5% phosphoric acid after 5 minutes, and by 5% phosphoric acid after 3 minutes of contact time. No bactericidal effect against *E. faecalis* was shown by 17% EDTA solution, even after 60 minutes of contact time. Table II lists the mean logarithmic reduction values for the 3 irrigants. All sterilized controls had negative counts.

**DISCUSSION**

In this study, a dilution-neutralization method approved by the British Standards Institution<sup>37</sup> was used to determine the bactericidal activity of irrigants against *E. faecalis*. This is a validated and reliable technique for determining the bactericidal activity of an antiseptic

**Table II.** Mean logarithmic reduction values at different contact times

Time, min	Logarithmic reduction (units of logarithmic reduction)				
	EDTA 17%	Citric acid 10%	Citric acid 25%	Phosphoric acid 2.5%	Phosphoric acid 5%
0.5	<4.00	<4.04	<4.04	<4.05	<4.04
1	<4.00	<4.04	<4.04	<4.05	<4.04
3	<4.00	<4.04	6.52	<4.05	6.51
5	<4.00	4.17	6.52	6.53	6.51
10	<4.00	6.52	6.52	6.53	6.51
15	<4.00	6.52	6.52	6.53	6.51
20	<4.00	6.52	6.52	6.53	6.51
25	<4.00	6.52	6.52	6.53	6.51
30	<4.00	6.52	6.52	6.53	6.51
40	<4.00	6.52	6.52	6.53	6.51
50	<4.00	6.52	6.52	6.53	6.51
60	<4.00	6.52	6.52	6.53	6.51

in the corresponding experimental conditions, and the neutralization of dilutions allows control of this activity for given time periods. Following the steps indicated for this method, the first experiments consisted of a search for neutralizers without bactericidal action against the irrigants tested. Once these were identified, the irrigants were exposed to a bacterial suspension under standard conditions and the reaction was then stopped by dilution with the neutralizer. The mixture was subsequently plated out, and the number of survivors was compared with the initial inoculum. Among the advantages of this reproducible quantitative approach are its objectivity, compared with qualitative studies,<sup>31</sup> and the absence of influence of the pH or other properties of the medium or of the diffusion capacity of the irrigant.<sup>14,27,39</sup>

In the present study, 2.5% and 5.0% phosphoric acid solutions showed bactericidal activity against *E. faecalis* after contact times of 5 and 3 minutes, respectively. To our best knowledge, no study has been published to date on the bactericidal activity of phosphoric acid against *E. faecalis*. Settembrini et al.<sup>35</sup> demonstrated that 8 commercially available phosphoric acid etchants at concentrations of 27.0% to 37.5% exerted antimicrobial activity against *Streptococcus mitans*, *Streptococcus salivarius*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. The action mechanism of phosphoric acid has not been fully elucidated. However, in common with some other inorganic acids, it may act by increasing the hydrogen-ion concentration in bacteria, which cannot maintain their vitality under these conditions.<sup>31</sup>

Results obtained showed that 17% EDTA solution exerted no bactericidal activity against *E. faecalis*, even after 60 minutes of contact time. This finding corroborates previously published results<sup>11,22,27</sup> that questioned the antibacterial effect of EDTA solutions. Thus,

no disinfection was achieved after 5-minute incubation in 17% EDTA solution of bovine dentin specimens experimentally infected with *E. faecalis*, *Streptococcus sanguis*, *Escherichia coli*, or *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>22</sup> Heling and Chandler<sup>11</sup> found no antimicrobial effect on infected root canals with a 17% EDTA solution, which showed a similar result to that of saline solution after a 10-minute contact with *E. faecalis*. Using the agar diffusion test, Torabinejad et al.<sup>27</sup> reported that a 17% EDTA solution had minimal antimicrobial activity and that dilutions of this solution had none at all, even when placed in direct contact with *E. faecalis*.

However, some authors have reported that EDTA has inhibitory capacity. One study described a minimum inhibitory concentration (MIC) of less than 5% for EDTA solution,<sup>28</sup> and others, using an agar diffusion test, found that 8.5% and 17.0% EDTA solutions were more effective than an 0.5% NaOCl solution.<sup>14,26</sup> This discrepancy with the present findings may be influenced by the pH of the medium, the diffusion capacity of the irrigant, and the interaction of solutions with components of the culture medium.<sup>14,27,39</sup> Zehnder et al.,<sup>15</sup> using a qualitative direct contact test, showed that a 17% EDTA solution inhibited the bacterial growth of *E. faecalis* at dilutions of 1/1 and 1/10 but not at a dilution of 1/100, whereas no inhibition was detected in the present study at these concentrations for the same exposure time. In a clinical study, Yoshida et al.<sup>24</sup> observed a significantly higher percentage of negative cultures with 15% EDTA versus saline solution. It has been proposed that EDTA solution is not a chemically active substance with antimicrobial effect but rather reduces the amount of microorganisms in root canal dentine by removing the smear layer.<sup>40</sup>

The MBC of citric acid was 20%. When 10% and 25% citric acid solutions were tested, they required 10 minutes and 3 minutes, respectively, to exert their bactericidal activity. Similar results were obtained by Zehnder et al.<sup>15</sup> after 15-minute exposure of *E. faecalis* to 10% citric acid. Yamaguchi et al.<sup>25</sup> described stronger antimicrobial effects against facultative and obligate anaerobes with 0.5, 1.0, and 2.0 M citric acid solutions than with 0.5 M EDTA solution. In contrast, Siqueira et al.,<sup>14</sup> who used agar diffusion test to evaluate the antibacterial effect of endodontic irrigants against 4 black-pigmented gram-negative anaerobes and 4 facultative anaerobic bacteria (including *E. faecalis*), reported that inhibition zones were larger for 10% citric acid than for 0.5% NaOCl but smaller than for 17% EDTA. These discrepancies are probably explained by the use of different methodologies, bacterial strains, inoculum sizes, and incubation times. Georgopoulou et al.<sup>23</sup> found that the antimicrobial action of a

25% citric acid solution was less effective than that of 2.5% NaOCl against root canal anaerobic microflora, i.e., gram-positive and gram-negative cocci and bacilli. BioPure MTAD (a mixture of doxycycline, citric acid, and Tween 80) can kill several strains of *E. faecalis* when diluted 1:515-fold.<sup>30</sup> Krause et al.<sup>29</sup> suggested that the antimicrobial effect of MTAD derived from doxycycline and not from citric acid, which was not significantly bactericidal in their study.

The bactericidal activity of phosphoric acid was demonstrated under these study conditions. The minimal bactericidal concentrations of the phosphoric acid and citric acid solutions were 2.5% and 20.0%, respectively. The bactericidal activity of 2.5% and 5.0% phosphoric acid was similar to that of 10% and 25% citric acid, respectively. The antibacterial activity of these acid solutions may derive from the release of hydrogen ion, which would inhibit bacterial metabolism.<sup>31</sup> However, the clinical efficacy of these agents must be considered in light of the complex root canal anatomy and polymicrobial biofilm of root canal infections. The effectiveness of these irrigants would likely be different on bacteria growing in biofilms, which are far less susceptible than their planktonic counterparts to antimicrobial killing.<sup>41</sup> A study to determine the effect of these irrigating solutions on *E. faecalis* biofilms is currently under way in our laboratory.

Solutions of 10% and 25% citric acid required 10 and 3 minutes of action, respectively, while 2.5% and 5.0% phosphoric acid required 5 and 3 minutes, respectively. All of these times were within the ranges established to remove the smear layer from the root canal. Most authors have reported that EDTA, citric acid, and phosphoric acid solutions have a good cleaning efficacy at the concentrations tested in this study.<sup>20,42-45</sup> Nevertheless, exposure to these agents for more than 5 minutes may cause peritubular and intertubular dentin erosion.<sup>43,45,46</sup> Given that 5% phosphoric acid has a lower decalcifying effect on dentin compared with 5% citric acid and 15% EDTA solutions<sup>34</sup> and only requires 3 minutes to exert its bactericidal activity against *E. faecalis*, it can be expected to have a lesser adverse effect on root dentin.

## CONCLUSION

In conclusion, phosphoric acid showed bactericidal activity against *E. faecalis* and required less time than citric acid to exert its action. EDTA solution showed no bactericidal activity. These findings on the antibacterial capacity of acid and chelant solutions used in root canal therapy may contribute to a better selection and use of these agents in clinical practice. Future studies are required to confirm the effectiveness of these agents on polymicrobial biofilm in root canal therapy.

The authors express their gratitude to Cesar Criado Sánchez for his technical assistance.

REFERENCES

1. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;20:340-9.
2. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004;30:315-20.
3. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998;31:1-7.
4. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003;36:1-11.
5. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:100-3.
6. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97:85-94.
7. Gomes BP, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:71-6.
8. Siqueira JF Jr, Machado AG, Silveira RM, Lopes HP, de Uzeda M. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal, *in vitro*. *Int Endod J* 1997;30:279-82.
9. Gomes BP, Lilley JD, Drucker DB. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *Int Endod J* 1996;29:235-41.
10. Lin LM, Skribner JE, Gaengler P. Factors associated with endodontic treatment failures. *J Endod* 1992;18:625-7.
11. Heling I, Chandler NP. Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. *Int Endod J* 1998;31:8-14.
12. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983;55:307-12.
13. Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2001;34:424-8.
14. Siqueira JF Jr, Batista MM, Fraga RC, de Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod* 1998;24:414-6.
15. Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T. Chelation in root canal therapy reconsidered. *J Endod* 2005;31:817-20.
16. Carson KR, Goodell GG, McClanahan SB. Comparison of the antimicrobial activity of six irrigants on primary endodontic pathogens. *J Endod* 2005;31:471-3.
17. Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms *in vitro*. *J Endod* 2006;32:434-7.
18. Garberoglio R, Becce C. Smear layer removal by root canal irrigants. A comparative scanning electron microscopic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;78:359-67.
19. Ayad MF. Effects of rotatory instrumentation and different etchants on removal of smear layer on human dentin. *J Prosthet Dent* 2001;85:67-72.
20. Pérez-Heredia M, Ferrer-Luque CM, González Rodríguez MP. The effectiveness of different acid irrigating solutions in root canal cleaning after hand and rotary instrumentation. *J Endod* 2006;32:993-7.
21. Nikolaus BE, Wayman BE, Encinas E. The bactericidal effect of citric acid and sodium hypochlorite on anaerobic bacteria. *J Endod* 1988;14:31-4.
22. Ørstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 1990;6:142-9.
23. Georgopoulou M, Kontakiotis E, Nakou M. Evaluation of the antimicrobial effectiveness of citric acid and sodium hypochlorite on the anaerobic flora of the infected root canal. *Int Endod J* 1994;27:139-43.
24. Yoshida T, Shibata T, Shinohara T, Gomyo S, Sekine I. Clinical evaluation of the efficacy of EDTA solution as an endodontic irrigant. *J Endod* 1995;21:592-3.
25. Yamaguchi M, Yoshida K, Suzuki R, Nakamura H. Root canal irrigation with citric acid solution. *J Endod* 1996;22:27-9.
26. Grawehr M, Sener B, Waltimo T, Zehnder M. Interactions of ethylenediamine tetraacetic acid with sodium hypochlorite in aqueous solutions. *Int Endod J* 2003;36:411-5.
27. Torabinejad M, Shabahang S, Aprecio RM, Kettering JD. The antimicrobial effect of MTAD: an *in vitro* investigation. *J Endod* 2003;29:400-3.
28. Bulacio MA, Cangemi R, Cecilia M, Raiden G. *Acta Odontol Latinoam* 2006;19:75-80.
29. Krause TA, Liewehr FR, Hahn CL. The antimicrobial effect of MTAD, sodium hypochlorite, doxycycline, and citric acid on *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2007;33:28-30.
30. Newberry BM, Shabahang S, Johnson N, Aprecio RM, Torabinejad M. The antimicrobial effect of biopure MTAD on eight strains of *Enterococcus faecalis*: an *in vitro* investigation. *J Endod* 2007;33:1352-4.
31. Russel AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ. Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science Ltd; 1999. p. 124-48.
32. Saleh IM, Ruyter IE, Haapasalo M, Orstavik D. The effects of dentine pretreatment on the adhesion of root canal sealer. *Int Endod J* 2002;35:859-66.
33. Hayashi M, Takahashi Y, Hirai M, Iwami Y, Imazato S, Ebisu S. Effect of endodontic irrigation on bonding of resin cement to radicular dentin. *Europe J Oral Sci* 2005;113:70-6.
34. Pérez-Heredia M, Ferrer-Luque CM, González Rodríguez MP, Martín-Peinado FJ, González-López S. Decalcifying effect of 15% EDTA, 15% citric acid, 5% phosphoric acid, and 2.5% sodium hypochlorite on root canal dentine. *Int Endod J* 2008;41:418-23.
35. Settembrini L, Boylan R, Strasser H, Scherer W. A comparison of antimicrobial activity of etchants used for a total etch technique. *Oper Dent* 1997;22:84-8.
36. Espigares E, Bueno A, Fernández-Crehuet M, Espigares M. Efficacy of some neutralizers in suspension tests determining the activity of disinfectants. *J Hosp Infect* 2003;55:137-40.
37. British Standards Institution. Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics. Test method and requirements (phase 1). London (UK); 2006. BS EN 1040:2005.
38. Espigares E, Bueno A, Espigares M, Gálvez R. Isolation of *Salmonella* serotypes in wastewater and effluent: effect of treatment and potential risk. *Int J Hyg Environ-Health* 2006; 209:103-7.
39. Estrela C, Ribeiro RG, Estrela CRA, Pecora JD, Sousa-Neto MD. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlo-

- rhexidine tested by different methods. *Braz Dent J* 2003; 14:58-62.
40. Di Lenarda R, Cadenaro M, Sbaizero O. Effectiveness of 1 mol L<sup>-1</sup> citric acid and 15% EDTA irrigation on smear layer removal. *Int Endod J* 2000;33:46-52.
41. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284: 1318-22.
42. Scelza M, Teixeira A, Scelza P. Decalcifying effect of EDTA-T, 10% citric acid, and 17% EDTA on root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;95:234-6.
43. Çalt S, Serper A. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. *J Endod* 2002;28:17-19.
44. Takeda FH, Harashima T, Kimura Y, Matsumoto K. A comparative study of the removal of smear layer by three endodontic irrigants and two types of laser. *Int Endod J*. 1999 32:32-9.
45. De-Deus G, Reis C, Fidel S, Fidel RA, Paciomiik S. Longitudinal and quantitative evaluation of dentin demineralization when subjected to EDTA, EDTAC, and citric acid: a co-site digital optical microscopy study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105:391-7.
46. De-Deus G, Paciomiik S, Pinho Mauricio MH, Prioli R. Real-time atomic force microscopy of root dentine during demineralization when subjected to chelating agents. *Int Endod J* 2006;39:683-92.

*Reprint requests:*

Carmen María Ferrer-Luque, DDS, MD, PhD  
Faculty of Dentistry  
Campus de Cartuja  
Colegio Máximo s/n. E-18071  
Granada, Spain  
cferrer@ugr.es.

ANEXO II

ARTICLE IN PRESS

Basic Research—Technology

**Enterococcus faecalis** Biofilms Eradication by Root Canal Irrigants

María Teresa Arias-Moliz, BDS,\* Carmen María, DDS, MD, PhD,<sup>†</sup> Miguel Espigares-García, PhD,<sup>‡</sup> and Pilar Baca, DDS, MD, PhD<sup>‡</sup>

**Abstract**

The aim of this study was to evaluate the minimal biofilm eradication concentration (MBEC) of sodium hypochlorite (NaOCl), chlorhexidine (CHX), EDTA, and citric and phosphoric acids after 1, 5, and 10 minutes of exposure to biofilms of *Enterococcus faecalis*. The biofilms grew in the MBEC high-throughput device for 24 hours at 37°C and were exposed to 10 serial two-fold dilutions of each irrigating solution. The viable cell counts were log<sub>10</sub> transformed, and a concentration of an irrigant was considered to eradicate the biofilms when it produced a reduction of ≥ 5 logarithmic units. NaOCl was the most effective agent, capable of eradicating the biofilms after 1 minute at a concentration of 0.00625%. CHX eradicated biofilm after 5 minutes at 2%. EDTA and citric and phosphoric acid solutions were not effective against the biofilms at any concentration or time tested. (*J Endod* 2009; ■:1-4)

**Key Words**

Biofilm, chlorhexidine, citric acid, *Enterococcus faecalis*, EDTA, irrigants, phosphoric acid, sodium hypochlorite

From the Departments of \*Microbiology and <sup>†</sup>Preventive and Operative Dentistry, School of Dentistry, and <sup>‡</sup>Department of Preventive Medicine and Public Health, School of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain.

Address requests for reprints to Dr María Teresa Arias-Moliz, Department of Microbiology, School of Dentistry, Campus de Cartuja, Colegio Máximo s/n, E-18071, Granada, Spain. E-mail address: mtarias@correo.ugr.es. 0099-2399/\$0 - see front matter

Copyright © 2009 American Association of Endodontists. doi:10.1016/j.joen.2009.01.018

*Enterococcus faecalis* is the most common and, occasionally, the only single isolated bacteria from root canals of teeth with persistent periapical periodontitis (1). Its inherent antimicrobial resistance, ability to adapt to harsh environmental changes, and its growth in root canal walls as biofilm (2) make it responsible for many endodontic failures (3). Biofilms have been defined as highly organized structures consisting of bacterial cells enclosed in a self-produced exopolymeric matrix attached on a surface (4). This matrix hinders the penetration of agents into the biofilm, limiting their effectiveness to the superficial layer (5).

Several irrigating solutions are used during endodontic treatment, and one of their most important requirements is to provide antimicrobial activity, which has been widely tested against planktonic bacteria (6). However, bacteria in biofilm are up to 1,000-fold more resistant than the corresponding bacteria in planktonic form (4). Consequently, recent studies attempt to evaluate the efficacy of root canal irrigants against biofilms (7-13).

Sodium hypochlorite (NaOCl) has shown a high antimicrobial activity against both planktonic (14, 15) and biofilm bacteria (7, 8, 11, 16, 17). Chlorhexidine (CHX), although less than NaOCl, is also active against both forms of growth (11, 17). However, these solutions exert no effects on inorganic components of the smear layer. Acid irrigating solutions such as EDTA and citric and phosphoric acids have been recommended as adjuvants in root canal therapy in view of their capacity to remove the smear layer (18) and enhance adhesion of resin-based endodontic sealers (19, 20). In terms of antimicrobial properties, EDTA solution has been seen to exhibit minimal activity on *E. faecalis* planktonic (21-23) and biofilm (11) cultures. The fact that citric and phosphoric acids have shown bactericidal activity against *E. faecalis* suspensions (21) leads us to surmise that they might also act on biofilm bacteria, and, to our knowledge, their effectiveness against *E. faecalis* grown as a biofilm has not been studied to date. Therefore, given the high resistance of biofilm to endodontic irrigants and the frequent use of acids in endodontics, the aim of this study was to evaluate the minimal biofilm eradication concentration (MBEC) of NaOCl, CHX, and several acid irrigating solutions used in root canal treatment against *E. faecalis* biofilms.

**Materials and Methods**

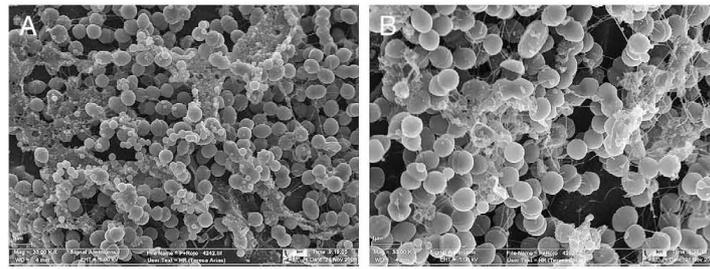
**Biofilm Cultivation**

Biofilms of *E. faecalis* strain ATCC 29212 were grown in the Calgary biofilm device (commercially available as the MBEC High-Throughput [HTP]; Innovotech Inc, Edmonton, Alberta, Canada), which was originally described by Ceri et al (24). To summarize briefly, there are two parts to this batch-culture apparatus. The top half is a lid with 96 pegs that also fits over a standard 96-well microtiter plate. The bottom half is a fluted trough that guides inoculated growth medium across the pegs when the device is placed on a rocker (25).

The *E. faecalis* strain was taken from a 4°C stock culture and streaked out twice on BHI agar (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain). Colonies were suspended in BHI to match the optical density of the 1.0 McFarland standard. This suspension was diluted 30-fold in broth, and 22 mL of the 1 in 30 dilution (1 × 10<sup>7</sup> colony-forming units per mL) were used to inoculate the troughs of the MBEC-HTP device. The starting bacterial number in the inocula was verified by viable cell counting. The peg lid was fitted inside the troughs, and the inoculated device was then placed on a rocking table at 5 rocks per

60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100  
101  
102  
103  
104  
105  
106  
107  
108  
109  
110  
111  
112  
113  
114  
115  
116  
117  
118  
119  
120  
121

Basic Research—Technology



122  
123  
124  
125  
126  
127  
128  
129  
130  
131  
132  
133  
134  
135  
136  
137  
138  
139  
140  
141  
142  
143  
144  
145  
146  
147  
148  
149  
150  
151  
152  
153  
154  
155  
156  
157  
158  
159  
160  
161  
162  
163  
164  
165  
166  
167  
168  
169  
170  
171  
172  
173  
174  
175  
176  
177  
178  
179  
180  
181  
182  
183

184  
185  
186  
187  
188  
189  
190  
191  
192  
193  
194  
195  
196  
197  
198  
199  
200  
201  
202  
203  
204  
205  
206  
207  
208  
209  
210  
211  
212  
213  
214  
215  
216  
217  
218  
219  
220  
221  
222  
223  
224  
225  
226  
227  
228  
229  
230  
231  
232  
233  
234  
235  
236  
237  
238  
239  
240  
241  
242  
243  
244  
245

**Figure 1.** Field emission scanning electron micrographs of *E. faecalis* biofilms grown on the peg after 24 hours of incubation. (A) Middle thick cell layers with abundant multisepate cells clustered into mounds (original magnification  $\times 20,000$ ). (B) The bacterial cells are aggregated on the polystyrene surface, and a characteristic network of polysaccharides can also be observed (original magnification  $\times 30,000$ ).

minute (Model Swing Sw 8 10000-00015; OVAN, Badalona, Spain) for 24 hours of incubation at 37°C with 95% relative humidity. The cultures were checked for purity by Gram stain and colony morphology.

Biofilms forming on the lid of the MBEC-HTP device were rinsed once by placing the lid on a 96-well microtiter plate with 200  $\mu$ L 0.9% saline solution in each well for 2 minutes to remove loosely adherent planktonic bacteria. To verify biofilm formation, four pegs were removed from alternating, parallel rows of the first column and were placed in 200  $\mu$ L 0.9% saline and sonicated on a water-table sonicator (Model 5510E-MT; Branson, Danbury, CT) for 10 minutes. The disrupted biofilms were diluted serially in 0.9% saline and 10- $\mu$ L aliquots were plated onto BHI agar for viable cell counting. This growth control was used to evaluate the initial number of bacteria formed in the biofilm in each assay.

**Root Canal Irrigants**

The initial concentrations of the irrigants tested were 0.1% NaOCl (Panreac Química S.A., Castellar del Vallès, Spain), 4% CHX (Guinama, Alboraya, Spain), 17% EDTA (Merck, Darmstadt, Germany), 25% citric acid (Merck), and 5% phosphoric acid (Merck). Ten two-fold dilutions were made of each solution in sterile distilled water. They were stored at room temperature until used (not more than 60 minutes). The available

chlorine contents in NaOCl dilutions were verified previously by using a standard iodine/thiosulfate titration method (26).

**Susceptibility Testing of *E. faecalis* Biofilms**

The susceptibility testings were performed in a microtiter plate known as the "challenge plate." The volume of the wells of the challenge plate must be sufficient to submerge the peg past the height of the biofilm produced. We used flat-bottom 96-well microtiter plates (Nunclon Delta Surface; Nunc, Roskilde, Denmark) with a final volume of 200  $\mu$ L. The dilutions of the irrigating solutions were placed along the length of the challenge plate, allowing the first and the last wells of each row containing BHI to respectively serve as sterility and growth controls. The peg lid was submerged in the challenge plate for 1, 5, and 10 minutes and thereafter transferred to two additional microtiter plates containing 200  $\mu$ L of 0.9% saline; it was then transferred to a microtiter recovery plate with 200  $\mu$ L of BHI/well and sonicated for 10 minutes to disrupt the biofilm structure. Each assay was performed in duplicate on three occasions for a total of six replicates per irrigant concentration and exposure time.

The viability of the biofilms was determined by spot plating 10- $\mu$ L aliquots of recovery biofilms onto BHI agar and incubating for 24 hours at 37°C. Mean viable cell counts were  $\log_{10}$  transformed, and

**TABLE 1.** Eradication of *E. faecalis* Biofilms After 1-5- and 10-min Contact Times With the Irrigating Solutions.

Irrigants and initial concentrations	Time (min)	Dilutions									
		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
0.1% NaOCl	1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	5	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	10	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
4% CHX	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
17% EDTA	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25% citric acid	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5% phosphoric acid	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Six replicates were performed for each antimicrobial agent. +, eradication; -, no eradication ( $\log(\text{initial CFU/ml}) - \log(\text{remaining CFU/ml}) \geq 5$ ).

246 a concentration of an irrigant was considered to eradicate the biofilms  
247 when it produced a reduction of  $\geq 5$  logarithmic units (27).  
248  
249

250 **Results**

251 The efficacy of the method for biofilm generation was observed by  
252 field emission scanning electron microscopy (Fig. 1). The MBEC of  
253 NaOCl was 0.00625% for 1 minute, 0.0015625% for 5 minutes, and  
254 0.00078125% after 10 minutes of contact. CHX eradicated biofilms at  
255 a concentration of 2% in 5 minutes and 1% in 10 minutes. The three  
256 acid irrigating solutions were unable to eradicate biofilms at any dilu-  
257 tion or time tested (Table 1). All sterility controls had negative counts.

258 **Discussion**

259 To evaluate the effectiveness of NaOCl, CHX, and acid irrigating  
260 solutions against *E. faecalis* biofilms, we used the Calgary biofilm device  
261 (24), which had not been previously tested in conjunction with these  
262 bacteria. This device is capable of examining 96 biofilms in one batch  
263 culture, allows a high-throughput susceptibility testing of microbial bio-  
264 films to antimicrobials, and has been validated as a tool for studying  
265 biofilm structure (28). Aside from being a quick and reliable technique,  
266 the shear force created by the rocking table motion serves to facilitate  
267 the formation of biofilms that are statistically equivalent (24, 25). Thus,  
268 several antimicrobial agents and/or concentrations can be tested in  
269 a single assay (24). Duggan and Sedgley (29) previously used microtiter  
270 plates (8 × 12 wells) to create biofilms; when testing susceptibility to  
271 irrigants, the peg lid facilitates handling.  
272

273 Different techniques have been used to study the effectiveness of  
274 root canal irrigants against biofilm populations (8, 12, 17), compli-  
275 cating the comparison of results. Our study involved three acid solutions  
276 (EDTA and citric and phosphoric acids) in addition to two irrigants of  
277 demonstrated efficacy, NaOCl and CHX, which would permit us to test  
278 these solutions as well as validate the technical procedure. We selected  
279 24 hours of biofilm growth, having obtained an adequate bacterial bio-  
280 film density for subsequent bacterial counts (Fig. 1), which is in agree-  
281 ment with Lima et al (13). Some studies (7, 9, 11, 12, 21) evaluating the  
282 antimicrobial activity of irrigants used neutralizers to eliminate any  
283 residual activity. We did not apply any because neutralizing agents previ-  
284 ously described in testing acid solutions contain components that may  
285 exert an antimicrobial effect on the biofilms (21). Instead, the peg lid  
286 was submerged twice in 0.9% saline to terminate any residual irrigant  
287 that remained.

288 In the present study, NaOCl proved highly effective in eradicating  
289 biofilms of *E. faecalis* after just 1 minute of exposure at a concentration  
290 of 0.00625%, whereas the CHX solution was determined to be less effec-  
291 tive, requiring at least 5 minutes of contact time in concentrations of 2%  
292 or higher. These results are consistent with work published previously  
293 using different methodologies (7–9, 11, 17).

294 The frequent use of acid irrigants in root canal therapy enhances  
295 our interest in determining their antibacterial properties. With regard to  
296 their capacity to remove the smear layer, a previous study gave no signif-  
297 icant differences after the alternating use of 15% EDTA, 15% citric acid,  
298 or 5% phosphoric acid solutions with 2.5% NaOCl (18). However, this  
299 finding should not lead one to assume that its potential antimicrobial  
300 action against biofilms will be similar. Our results revealed that the  
301 EDTA solution had no effect on *E. faecalis* biofilms at any of the time  
302 periods and concentrations assayed. This finding corroborates the  
303 result of a previous study (11) reporting that 17% EDTA solution  
304 exhibited minimal activity against *E. faecalis* biofilms, even after 60  
305 minutes of contact.

306 Moreover, our results showed that *E. faecalis* biofilms were not  
307 eradicated by either citric or phosphoric acids at any dilution or time

308 of exposure. This contrasts with the activity observed for these acids  
309 against *E. faecalis* suspensions. Previous studies have shown citric  
310 acid to be effective against planktonic bacteria in concentrations of  
311 10% or over and at times of 10 and 15 minutes (21, 30). Phosphoric  
312 acid solutions at 2.5% and 5% have shown bactericidal activity against  
313 *E. faecalis* suspensions after 5- and 3-minute contact times, respectively  
314 (21). The difference in susceptibility between *E. faecalis* planktonic  
315 and biofilm cultures to citric and phosphoric acids, previously reported  
316 against alkaline stress as well (31), may be attributed to the possible  
317 inefficacy of these solutions in breaking through the exopolysaccharide  
318 matrix of the biofilm. Another explanation might reside in the intermi-  
319 crobial relationships of the biofilm, perhaps through quorum-sensing  
320 signals, which would conceivably alter gene expression, giving rise to  
321 a competitive advantage ensuring bacterial survival (32).

322 Although these acid solutions per se have not proven any capacity  
323 to eradicate *E. faecalis* biofilms (to the contrary of NaOCl and CHX, with  
324 a direct chemical effect), this does not imply that they lack effective  
325 mechanical disinfection through the flushing of contaminated debris  
326 accumulated during root canal preparation (6). Notwithstanding,<sup>Q2</sup>  
327 residual bacteria remain in the canals, requiring the use of a final appli-  
328 cation of some solution with antimicrobial capacity against the biofilms  
329 (33).

330 The biofilm model used in this study may be considered effective as  
331 a screening to test the biofilm-eradicating capacity of irrigating solutions  
332 and could prove useful for the characterization of *E. faecalis* biofilms.  
333 Further studies using infected tooth models should now be undertaken  
334 to reproduce the clinical conditions under which biofilms grow.

335 **Acknowledgments**

336 *The authors wish to express their gratitude to Francisca*  
337 *Castillo for her technical assistance.*

338 **References**

339  
340  
341  
342 1. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with  
343 different forms of periradicular diseases. J Endod 2004;30:315–20.  
344 2. Ramachandran Nair PN. Light and electron microscopic studies of root canal flora  
345 and periapical lesions. J Endod 1987;13:29–39.  
346 3. Lin LM, Sribriener JE, Gaengler P. Factors associated with endodontic treatment fail-  
347 ures. J Endod 1992;18:625–7.  
348 4. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of  
349 persistent infections. Science 1999;284:1318–22.  
350 5. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet 2001;  
351 358:135–8.  
352 6. El Karim I, Kennedy J, Hussey D. The antimicrobial effects of root canal irrigation and  
353 medication. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2007;103:560–9.  
354 7. Giardino L, Ambu E, Savoldi E, et al. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy  
355 of sodium hypochlorite, MTAD, and Tetraclean against *Enterococcus faecalis* bio-  
356 film. J Endod 2007;33:852–5.  
357 8. Duravant TR, Regan JD, Glickman GN, et al. Comparative evaluation of endodontic  
358 irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. J Endod 2006;32:527–31.  
359 9. Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, et al. The effect of exposure to irrigant solutions on  
360 apical dentin biofilms *in vitro*. J Endod 2006;32:434–7.  
361 10. Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, et al. *In vitro* antimicrobial activity of sodium hypo-  
362 chlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. Int Endod J  
363 2006;39:878–85.  
364 11. Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, et al. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis*  
365 phenotypes to root canal medications. J Endod 2005;31:30–6.  
366 12. Spratt DA, Pratten J, Wilson M, et al. An *in vitro* evaluation of the antimicrobial effi-  
367 cacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. Int Endod J 2001;34:300–7.  
368 13. Lima KC, Fava LR, Siqueira JF Jr. Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* biofilms  
369 to some antimicrobial medications. J Endod 2001;27:616–9.  
370 14. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium  
371 hypochlorite in endodontic therapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1983;55:  
372 307–12.  
373 15. Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, et al. *In vitro* antimicrobial activity of several  
374 concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimina-  
375 tion of *Enterococcus faecalis*. Int Endod J 2001;34:424–8.  
376  
377

Basic Research—Technology

370	16. Bryce G, Ready D, Donnell DO, et al. Biofilm disruption by root canal irrigants and potential irrigants [abstract]. <i>Int Endod J</i> 2008;41:814–5.	432
371		433
372	17. Williamson AE, Cardon JW, Drake DR. Antimicrobial susceptibility of monoculture biofilms of a clinical isolate of <i>Enterococcus faecalis</i> . <i>J Endod</i> 2009;35:95–7.	434
373		435
374	18. Pérez-Heredia M, Ferrer-Luque CM, González-Rodríguez MP. The effectiveness of different acid irrigating solutions in root canal cleaning after hand and rotary instrumentation. <i>J Endod</i> 2006;32:993–7.	436
375		437
376	19. Saleh IM, Ruyter IE, Haapasalo M, et al. The effects of dentine pretreatment on the adhesion of root canal sealer. <i>Int Endod J</i> 2002;35:859–66.	438
377		439
378	20. Hayashi M, Takahashi Y, Hirai M, et al. Effect of endodontic irrigation on bonding of resin cement to radicular dentin. <i>Eur J Oral Sci</i> 2005;113:70–6.	440
379		441
380	21. Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-Rodríguez E, et al. Bactericidal activity of phosphoric acid, citric acid, and EDTA solutions against <i>Enterococcus faecalis</i> . <i>Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod</i> 2008;106:e84–9.	442
381		443
382	22. Torabinejad M, Shabahang S, Apereo RM, et al. The antimicrobial effect of MIAD: an <i>in vitro</i> investigation. <i>J Endod</i> 2003;29:400–3.	444
383		445
384	23. Heilig I, Chandler NP. Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. <i>Int Endod J</i> 1998;31:8–14.	446
385		447
386	24. Ceri H, Olson ME, Stremick C, et al. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. <i>J Clin Microbiol</i> 1999;37:1771–6.	448
387		449
388		450
389		451
390		452
391		453
392		454
393		455
394		456
395		457
396		458
397		459
398		460
399		461
400		462
401		463
402		464
403		465
404		466
405		467
406		468
407		469
408		470
409		471
410		472
411		473
412		474
413		475
414		476
415		477
416		478
417		479
418		480
419		481
420		482
421		483
422		484
423		485
424		486
425		487
426		488
427		489
428		490
429		491
430		492
431		493