

Efectividad bacteriostática de dos tipos de hidróxido de calcio, con dos vehiculos diferentes frente al *Enterococcus Faecalis*

Bohórquez Y*/Camacho P*/Peña T*/Reyes A*/Robayo I*/Chamorro V**

RESUMEN

Objetivo: comparar la efectividad bacteriostática del Hidróxido de Calcio (EUFAR)® asociado a los vehiculos (lidocaína al 2% más epinefrina y Clorhexidina al 2%) y el Ultracal XS® (Ultradent), en la eliminación del *Enterococcus faecalis*. **Métodos:** estudio experimental en el que realizaron dos ensayos: Antibiograma y Concentración Mínima Inhibitoria. Antibiograma: se expuso el *Enterococcus faecalis* a las siguientes soluciones: 1. Hidróxido de calcio Eufar® con Lidocaína al 2% más Epinefrina (GE-A1), 2. Hidróxido de calcio Eufar® con Clorhexidina al 2% (GE-A2) y 3. Hidróxido de Calcio Ultracal XS® (GE-B). Esas preparaciones se incubaron a 35° C durante 48 horas y se observó el crecimiento de *Enterococcus faecalis* a las 12 y las 48 horas. Concentración Mínima Inhibitoria: el *Enterococcus faecalis* se expuso a diferentes concentraciones de Hidróxido de calcio (Eufar®) con Lidocaína y Clorhexidina e hidróxido de calcio Ultracal XS®. Se examinó la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano durante 48 horas en cada una de ellas. **Resultados:** antibiograma: se observó mayor inhibición al crecimiento del *Enterococcus faecalis* en la preparación de Hidróxido de calcio Eufar® con Clorhexidina al 2% (GE-A2). Concentración mínima inhibitoria: la preparación de Hidróxido de calcio Eufar® con Clorhexidina al 2% (GE-A2) presentó inhibición de crecimiento bacteriano en todas las concentraciones. **Conclusiones:** en este estudio, la efectividad bacteriostática fue mayor con el Hidróxido de calcio (EUFAR)® con Clorhexidina. **Palabras clave:** Hidróxido de Calcio, *Enterococcus faecalis*, Bacteriostático.

ABSTRACT

Objective: to compare the bacteriostatic effectiveness of the Calcium Hydroxide (EUFAR)® associated with two vehicles (2 % lidocaine with epinephrine and 2 % Chlorhexidine) and Ultracal XS® (Ultradent), in the elimination of *Enterococcus Faecalis*. **Methods:** experimental study with two tests: antibiogram and Minimum Inhibitory concentration. Antibiogram: the *Enterococcus Faecalis* was exposed to the following solutions: 1. Calcium Hydroxide Eufar® with 2 % lidocaine with epinephrine (GE-A1). 2. Calcium Hydroxide Eufar® with 2 % Chlorhexidine (GE-A2) and 3. Calcium Hydroxide Ultracal XS® (GE-B). Those preparations were incubated to 35°C during 48 hours and *Enterococcus Faecalis* growth was observed at 12 and 48 hours. Minimum Inhibitory concentration: the *Enterococcus Faecalis* was exposed to different Calcium Hydroxides concentrations: (Eufar®) with lidocaine and epinephrine and Calcium Hydroxide Ultracal XS®. The presence or absence of bacterial growth during 48 hours was examined. **Results:** antibiogram: more inhibition in *Enterococcus Faecalis* growth was observed with calcium Hydroxide (Eufar®) with 2% Chlorhexidine (GE-A2) Minimum Inhibitory concentration: the preparation of Calcium Hydroxide Eufar® with (GE-A2) 2% Chlorhexidine presented bacterial growth inhibition in all the concentrations. **Conclusions:** the highest bacteriostatic effectiveness was observed for Calcium Hydroxide (EUFAR)® with 2% Chlorhexidine. **Key words:** Calcium hydroxide, *Enterococcus faecalis*, Bacteriostatic

* Estudiantes Odontología X semestre UNICOC.

** Odontólogo. Especialista en Endodoncia. Asesor Científico.

Correspondencia: vjch2000@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

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

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

Por lo tanto, los principios del tratamiento endodóntico de un diente deben minimizar el número de microorganismos alojados en los túbulos dentinales, debido a que estos pueden constituir un depósito en el canal de la raíz, infección de los tejidos circundantes y la reinfección. Un estudio informó que el *Enterococcus faecalis* no invade los túbulos dentinales hasta después de dos semanas de incubación cuando el cemento está intacto.⁵

Uno de los objetivos del tratamiento de conductos es siempre la obturación tridimensional del sistema de conductos incluyendo todas sus ramificaciones. Para conseguirlo, la fase de desinfección y conformación debe favorecer la remoción de todos los restos orgánicos, facilitar un buen acceso al foramen y ofrecer una superficie adecuada para la colocación del material de obturación permanente. Se ha demostrado que la instrumentación e irrigación bacteriana

brindará del 50% al 70% de conductos infectados libres de microorganismos. Estos y sus productos tóxicos son responsables del desarrollo y persistencia de las lesiones periapicales. Es por ello crucial el tratamiento del conducto radicular infectado para evitar la recidiva de la enfermedad.⁶ La irrigación con agentes antimicrobiales y el medicamento intraconducto Hidróxido de Calcio son usados con el propósito de eliminar las bacterias. El hidróxido de calcio se encuentra en dos presentaciones comerciales: pasta y polvo. Cada una por separado, posee las características generales como: baja solubilidad en agua y pH alcalino, aproximadamente de 12.5. Esta propiedad le permite convertirse en un excelente bactericida, incluso las esporas son eliminadas al ponerse en contacto con este elemento.⁷

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

Otro de los vehículos utilizados fue la clorhexidina, esta es manejada como sustancia intraconducto en endodoncia. Tiene un gran espectro de actividad antimicrobiana por sus características, se absorbe a través de la pared celular del microorganismo. En concentraciones menores ejerce una función bacteriostática, en altas concentraciones es un potente bactericida. Otra de sus características es la baja toxicidad a los tejidos peri apicales. Algunos estudios comprueban que al ser mezclada con hidróxido de calcio, fueron eficientes en la eliminación de *Enterococcus faecalis*. El vehículo y el medicamento determina la velocidad de disociación iónica que causa la pasta que se solubiliza y se reabsorbe a tasas diferentes por los tejidos peri apicales y desde el interior del conducto radicular.⁹ Cuanto más baja la viscosidad, mayor será la disociación iónica. El alto peso molecular de los vehículos de uso común minimiza la dispersión de hidróxido de calcio en los tejidos y mantiene la pasta en la zona deseada para períodos más largos de tiempo.⁹

La acción bactericida del $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ha sido relacionada con la liberación de iones hidroxilo, los cuales son radicales altamente oxidantes, altamente reactivos y letales para las bacterias. Puede causar daño a la membrana citoplasmática, al destruir los fosfolípidos; desnaturalización de proteínas por alcaliniza-

ción, por lo que muchas enzimas pierden su actividad biológica, alterando el metabolismo celular; daño al ADN bacteriano, inhibiendo la replicación celular y la pérdida de genes. También se ha postulado que el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ es capaz de alterar el pH del medio donde es colocado e incluso hasta en sitios distantes, lo cual aumenta su efecto bactericida. El hidróxido de calcio, al ser una sustancia altamente alcalina (pH entre 10-12), sus efectos dependen también de la preparación química y de la disponibilidad del Ion hidroxilo en solución. Es un polvo blanco que se obtiene por la calcinación del carbonato cálcico.¹⁰

Varios estudios in Vitro han comprobado la desinfección de los túbulos dentinales por medicamentos, han recomendado al hidróxido de calcio como una sustancia poderosa, alcalina debido a sus efectos biológicos. Apoyada esta teoría por estudios realizados entre el hidróxido de calcio y *Enterococcus faecalis* este debe difundirse por los túbulos dentinales y alcanzar niveles suficientes para ser mortal.¹¹ Los medios de transporte (vehículos) se pueden clasificar en acuoso, viscosos y aceitosos, las propiedades clínicas del hidróxido de calcio dependen del cambio de vehículo utilizado.¹²

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

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

MÉTODO

Estudio Experimental. El objeto de estudio fue la efectividad bacteriostática del hidróxido de calcio, frente al *Enterococcus faecalis*, proveniente de un cultivo realizado en el laboratorio LEMA de la Universidad de los Andes. El laboratorio realizó dos procedimientos: antibiograma y concentración mínima inhibitoria.

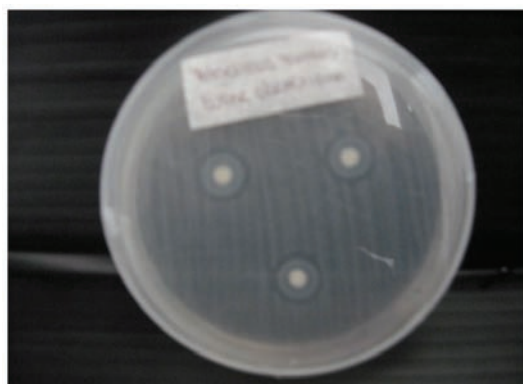
Antibiograma

Se sembró una cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, microorganismo anaerobio facultativo en 4 cajas de Petri con medio de Agar Muller Hilton. En el (GE- A1) se realizó la mezcla de Hidróxido de calcio EUFAR a una concentración de 0.09 gr de polvo y 300 micro litros de solución anestésica Lidocaína al 2%, luego esta solución se diluyó en una caja de Petri con la cepa de *Enterococcus faecalis*; En el (GE-A2) se mezcló Hidróxido de calcio EUFAR a una concentración de 0.09 gramos de polvo y 300 micro litros de

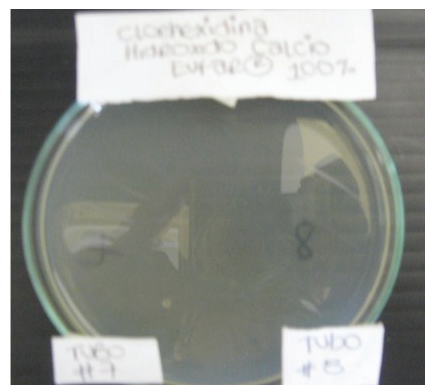
Clorhexidina al 2%, luego diluimos esta solución en una caja de Petri con la cepa de *Enterococcus faecalis*. En el (GE-B) a la caja de Petri que contiene la cepa de *Enterococcus faecalis*, se le aplicó el Hidróxido de calcio Ultracal XS®. La última caja contiene el (GC), corresponde al grupo control donde solamente se sembró la cepa de *Enterococcus faecalis*, este ensayo se utilizó para establecer un control de calidad interno y asegurar que el procedimiento ofrezca un resultado confiable. Se llevaron las cajas de Petri a la incubadora a 35° C, durante 48 horas, en donde se observaron los cambios en dos tiempos a las 24 y a las 48 horas. La recolección de resultados se realizó en asprimeras 24hor asyc ompletadas las48ho ras.

Concentración mínima inhibitoria

Este ensayo contiene diferentes concentraciones del producto a analizar en este caso (Hidróxido de calcio (EUFAR®) con Lidocaína y clorhexidina e hidróxido de calcio Ultracal XS®), estos son inoculados con *Enterococcus faecalis*; después de un adecuado periodo de inoculación, los tubos de ensayo en los que se encontraba la mezcla fueron examinados para la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano según la concentración a la que se encontraba la solución. La actividad del producto a analizar debe ser la menor concentración en la cual es inhibido el crecimiento del microorganismo.¹³ Para este procedimiento los microorganismos fueron sometidos a un crecimiento en el caldo de Tripticasa de soya (TSB) por 24 horas; se lavaron los microorganismos con solución salina a una concentración del 0.85%. Luego se colocaron 4 filas de 12 tubos en una gradilla, cada una de ellas dispuesta para concentraciones al 1%, 2%, 5% y 100%, en donde al primer tubo de cada fila se le dispensaron 4ml de TSB y 2.4ml de TBS del tubo # 2 al 12; Se dispensaron 0.4ml de la solución a analizar (Hidróxido de calcio (EUFAR®) – Lidocaína 2%) en el primer tubo de la fila de doce quedando este con un volumen total de 4.4ml. Se mezclaron las soluciones en el vortex y se transfirieron 2ml del primer tubo al segundo tubo de la misma fila, este procedimiento se repitió en los tubos restantes hasta llegar al último tubo de la fila (# 12); en donde se descartaron 2ml, para que el volumen total de este fuera 2.4ml, después se inoculó cada tubo con 0.1ml (100 micro – litros) de la bacteria *Enterococcus faecalis*, Luego se inoculó un tubo de control que contenía solamente 0.1ml del medio de cultivo TSB y 0.1ml del microorganismo *Enterococcus faecalis*. Los tubos de ensayo se incubaron por 48 horas a 35 ° C, pasadas las 48 horas las soluciones contenidas en los tubos de ensayo se incubaron en cajas de Petri en Agar nutritivo para la toma de resultados. Se tomó una caja de Petri para dos tubos, por fila de 12 tubos se utilizaron 6 cajas. Se tomó el

**Figura 1**

Resultados Antibiógrama GE-A2 A las 24 horas

**Figura 2**

Resultados CMI. Tubo 8 sin crecimiento bacteriano.

Tabla 1**Grado De inhibición bacteriana (Antibiógrama)**

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

Tabla 2**Resultados de concentración mínima inhibitoria según la concentración a la que se utilizó el medicamento**

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

tubo # 1 y con un asa estéril se llevó la solución al Agar en la caja de Petri hasta que se completó este procedimiento con los tubos restantes de cada fila. Se colocaron las cajas de Petri en la incubadora a 35°C, durante 24 horas. Posteriormente durante la toma de resultados la concentración mínima inhibitoria se expresó en miligramos por litro (MG/L) y el resultado se reportó tomando el tubo inmediatamente anterior al cual hubo crecimiento bacteriano, realizando esta lectura de derecha a izquierda (del tubo # 12 al #1).

Luego según el tubo en donde no hubo crecimiento bacteriano se verificó en una tabla la concentración y los MG/L a los que se encontró Hidróxido de calcio (EUFAR®) – Lidocaína2% para inhibir el crecimiento bacteriano.¹³

Dentro de las consideraciones éticas los investigadores declararon no tener conflicto de intereses y la investigación se clasificó como sin riesgo por no existir participación de humanos en los experimentos.

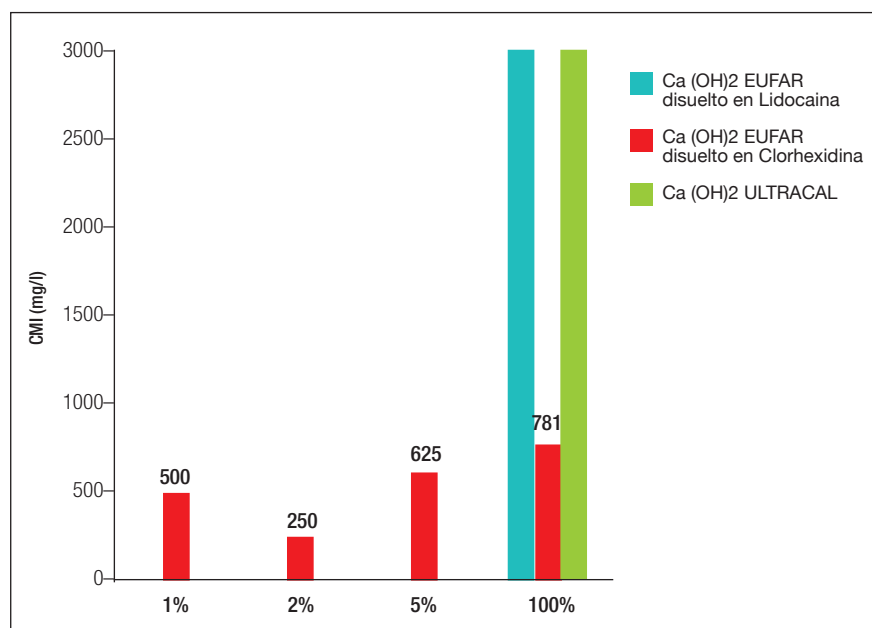


Figura 3

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

RESULTADOS

Antibiograma

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

1.243 cm². (Figura 1 y Tabla 1)

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

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

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

Concentración Mínima Inhibitoria

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

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

DISCUSIÓN

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

Los estudios han revelado que el *Enterococcus faecalis* tiene la capacidad de penetrar en los túbulos dentinarios, a veces en un grado de profundidad, esta propiedad puede permitir que esta especie pueda escapar de la acción de los instrumentos de endodoncia y soluciones de irrigación utilizadas durante la preparación biomecánica.¹⁶ Estudios realizados por Stephen y col, en 2005, nos dicen que A pesar de que el mecanismo exacto de acción del Ca(OH)₂ aún es desconocido, su actividad antimicrobiana es generalmente considerada estar relacionada con la liberaciones de iones de hidroxilo en un entorno acuoso produciendo (a) daño a la membrana citoplasmática (b) desnaturalización de proteína, (c) daño en el DNA.¹⁶

Según estudios realizados por Gomes, Souza y Col, concluyeron que el gel de Clorhexidina sola inhi-

bibe completamente el crecimiento del *Enterococcus Faecalis*. La combinación de Hidróxido de Calcio y Clorhexidina tiene una acción antibacteriana al 100% en sus primeros días. Esta acción se debe a su pH alto (12.8) (Clorhexidina pH 7.0, Hidróxido de Calcio pH 11.0), sugiriendo un incremento de la capacidad de la molécula ionizada de Clorhexidina.⁹

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

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de este estudio la mezcla de Hidróxido de calcio con Lidocaína GE – A1; GE – A2 Clorhexidina y GE – B Ultracal XS, mostró en el antibiograma un mayor halo de inhibición en el GE – A2.

Se observó que el Hidróxido de calcio junto con la clorhexidina GE – A2, presentan la mayor inhibición del *Enterococcus faecalis*, por esto se reconoce este como el mejor vehículo en su utilización con el Hidróxido de calcio (EUFAR) ®.

La efectividad bacteriostática del Hidróxido de calcio (EUFAR) ® es mayor que la del Hidróxido de calcio ULTRACAL XS (ULTRADENT) ®, frente al *Enterococcus Faecalis*.

AGRADECIMIENTOS

Las investigadoras agradecen la Microbióloga Diana Patricia Sosa de laboratorio LEMA de la Universidad de los Andes por la realización del estudio y lectura de los cultivos.

REFERENCIAS

- Sahli, C., Brau, C., Aguadé, E. Endodoncia. Técnicas clínicas y bases científicas. Ed. Masson. Barcelona. 2001. Capítulos 6 y 7.
- Estrela C, Pimenta FC, Ito IY, Bamman LL. Antimicrobial Evaluation of Calcium Hydroxide in Infected Dentinal Tubules. J Endod. 1999; 25, (6): 416–18.
- Berrios EJ, Porto ST. Respuesta pulpar frente a diferentes agentes cementantes. Rev. Estomatol Herediana. 2004; 14(1–2):84–88.
- Siqueira. JF. De Uzeda M. Disinfection by Calcium Hydroxide Pastes of Dentinal Tubules Infected with Two Obligate and One Facultative Anaerobic Bacterium. J Endod. 1996; 22(12): 674 – 76.
- Athanassiadis, B., Abbott, PV, Walsh LJ. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontic.. Australian Dental Journal Supplement 2007; 52: (1suppl): S64–82.
- De Souza CA, Teles RP, Souto R, Chaves MA, Colombo AP. Endodontic therapy associated with calcium hydroxide as an intracanal dressing: microbiology evaluation by the checkerboard DNA- DNA hybridization technique. J Endod. 2005; 31 (2): 79–83.
- Behnen, MJ, West LA, Liewehr FR, Buxton TB, McPherson JC 3rd. Antimicrobial activity of several calcium hydroxide preparations in root canal dentin. J Endod. 2001; 27(12): 765 – 7.
- Leal, D. Pulgarín, M. Difusión del Ion calcio de cuatro materiales con base en hidróxido de calcio: Calasept - Ultracal, conos de Hidróxido de calcio, Eufar. Tesis postgrado de endodoncia. 1999. T.O.E 0042. Colegio Odontológico Colombiano
- Gomes BP, Souza SF, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, Souza-Filho FJ. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. Int Endod J. 2003; 36 (4): 267–75.
- Barquero L, Rodríguez E. Efecto Antibacteriano in Vitro del Hidróxido de Calcio. Odovtoc. 2005; 7:77 – 80.
- Rocas, IN. Siqueira JF, Santos K R.N. Association of *Enterococcus faecalis* With Different Forms of Periradicular Diseases. J Endod. 2004; 30(5): 315 – 20.
- Soriano de Souza CA, Palmier Teles R, Souto R, Escobar A, Vieira AP. Endodontic therapy associated with calcium hydroxide as an intracanal dressing: microbiology evaluation by the checkerboard DNA- DNA hybridization technique. J endod. 2005; 31 (2):79 – 83.
- Norma técnica colombiana, NTC 2455, 3ra actualización, Desinfectantes, limpiadores líquidos para uso doméstico, ed. Icontec. 15 – 21.
- Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen H, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root – filled canals in a Lithuanian population. J Endod. 2000; 26(12):593–95.
- López-Marcos JF. Etiología, clasificación y patogenia de la patología pulpar y periapical. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2004; 9Suppl: S52–62.
- Cwikla S, Bélanger M, Giguère S, Proguiske-Fox A, Vertucci F. Dentinal Tubule Disinfection Using Three Calcium Hydroxide Formulations. J Endod. 2005; 31(1): 50 – 52.