

**UNIVERSIDAD CATÓLICA
SANTO TORIBIO DE MOGROVEJO**



**EFFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE DOS PASTAS
MEDICAMENTOSAS FRENTE AL *ENTEROCOCCUS
FAECALIS*
CHICLAYO, PERU**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE:
CIRUJANO DENTISTA**

**AUTOR: Bach. Carlos André Aguirre Becerra
Bach. Jheyemy Gerardo Huatuco Granda**

Chiclayo, 20 de enero del 2014

**EFFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE DOS PASTAS
MEDICAMENTOSAS FRENTE AL *ENTEROCOCCUS
FAECALIS***

POR:

**Bach. Carlos André Aguirre Becerra
Bach. Jheymy Gerardo Huatuco Granda**

Presentada a la Facultad de Medicina de la Universidad Católica Santo
Toribio de Mogrovejo, para optar el Título de:

CIRUJANO DENTISTA

APROBADO POR:

Esp.CD. Aurealuz Guevara Morales

Presidente de Jurado

CD. María Elizabeth Cruz Flores

Secretario de Jurado

Mgrtr. CD. Mariano Ortiz Pizarro

Vocal/Asesor de Jurado

CHICLAYO, 2014

DEDICATORIA

A Dios, por permitirnos llegar a este momento tan especial en nuestra vida, por los triunfos y momentos difíciles que nos ha enseñado a valorar cada día más.

A nuestros padres y hermanas por su apoyo incondicional y por acompañarnos en cada uno de nuestros logros. Gracias a ellos, hoy podemos ver alcanzada una de nuestras metas, ya que siempre estuvieron impulsándonos durante nuestra carrera. Porque su amor y confianza fue nuestra principal motivación.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer de manera especial a nuestra asesora Mgtr. María Teresa Sánchez Julca por la ayuda brindada para realizar la presente tesis bajo su dirección. Debemos destacar, por encima de todo, su disponibilidad y dedicación; su apoyo y confianza en nuestro trabajo y su capacidad para guiar nuestras ideas han sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en nuestra formación como personas y como profesionales.

Deseamos expresar también nuestro más sincero agradecimiento al Mgtr. CD. John Paul Torres Navarro por su apoyo incondicional, aportes y participación en el desarrollo de este proyecto.

Por último agradecer a la Mgtr. CD. Erika Raquel Enoki Miñano y al Mgtr. CD. Mariano Wenceslao Ortíz Pizarro por su aporte incondicional en el área metodológica del presente trabajo de investigación.

ÍNDICE

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT	ix
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL	7
1.1 ANTECEDENTES DEL PROBLEMA	7
1.2 BASES TEÓRICO CONCEPTUAL.....	9
1.2.1 <i>Enterococcus</i>	9
1.2.2 Sustancias medicamentosas	11
1.3 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS	21
1.4 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	22
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
2.1 DISEÑO METODOLÓGICO	23
2.1.1 Tipo de estudio y diseño de estudio	23
2.1.2 Población y muestra	23
2.1.3 Métodos, técnicas e instrumentos de recolección de datos.	24
2.1.4 Procedimientos para garantizar aspectos éticos en las investigaciones con sujetos humanos	25
2.1.5 Plan de procesamiento y análisis de datos	26
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
3.1. RESULTADOS	27
3.2. DISCUSIÓN.....	31
CONCLUSIONES	35
BIBLIOGRAFÍA	36

ANEXOS	42
Anexo 1 Reactivación de la cepa de <i>Enterococcus faecalis</i>	43
Anexo 2 Preparación de materiales a emplear en el experimento	45
Anexo 3 Inoculación de la bacteria.....	46
Anexo 4 Preparación de las pastas medicamentosas y de los discos embebidos en ellas	47
Anexo 5 Distribución de los discos embebidos en las pastas medicamentosas en las placas Petri	49
Anexo 6 Medición de los halos de inhibición.....	50
Anexo 7 Ficha de recolección de datos.....	51

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Distribución de las medias de los halos de inhibición de cada pasta medicamentosa de acuerdo al tiempo. 27

TABLA 2. Efectividad antibacteriana de la pasta de hidróxido de calcio con clorhexidina al 2% y la pasta de hidróxido de calcio con yodopovidona al 1%, frente al *Enterococcus faecalis*..... 28

TABLA 3. Efectividad antibacteriana de la pasta de hidróxido de calcio con clorhexidina al 2% frente al *Enterococcus faecalis* 29

TABLA 4. Efectividad antibacteriana de la pasta de hidróxido de calcio con yodopovidona al 1% frente al *Enterococcus faecalis* 30

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue comparar la efectividad antibacteriana de la pasta de hidróxido de calcio con clorhexidina al 2% y la pasta de hidróxido de calcio con yodopovidona al 1%, frente al *Enterococcus faecalis*. El diseño de contrastación fue experimental. Se distribuyeron 10 placas Petri que contenían agar Müller Hinton a 40° C, sobre las cuales fue inoculada la bacteria *Enterococcus faecalis*. Además, estas fueron divididas de manera aleatoria en 3 segmentos cada una de acuerdo al tipo de pasta medicamentosa que se aplicó: grupo P1 (hidróxido de calcio + clorhexidina al 2%), grupo P2 (hidróxido de calcio + yodopovidona al 1%) y el grupo P3 o control (hidróxido de calcio + agua destilada). Finalmente, se procedió a la lectura de halos de inhibición a las 24 horas, 48 horas, 7 días, 14 días. Los datos fueron procesados a través del análisis de Tukey para determinar la diferencia de medias entre los grupos experimentales y el análisis de ANOVA con un nivel de significancia del 95%, utilizando el programa SPSS 20.

Se concluyó que la pasta de hidróxido de calcio con clorhexidina al 2% fue más efectiva que la pasta de hidróxido de calcio con yodopovidona al 1% frente al crecimiento *in vitro* del *Enterococcus faecalis*.

Palabras Clave: *Enterococcus faecalis*, hidróxido de calcio, clorhexidina, povidona yodada, crecimiento bacteriano.

ABSTRACT

The aim of this study was to compare the antimicrobial effectiveness of calcium hydroxide paste with 2% chlorhexidine and calcium hydroxide paste with 1% povidone iodine against *Enterococcus faecalis*. This study was experimental. Petri dishes are distributed 10 Müller Hinton agar containing 40° C, upon which was inoculated bacteria *Enterococcus faecalis*. Besides, these were divided randomly into 3 segments each according to the type of drug paste was applied: P1 group (calcium hydroxide + chlorhexidine 2%), group P2 (calcium hydroxide + 1% povidone iodine) and the group P3 or control (calcium hydroxide + distilled water). Finally, we proceeded to the reading of zones of inhibition at 24 hours, 48 hours, 7 days, 14 days. The data were processed using Tukey analysis to determine the mean difference between the experimental groups and ANOVA analysis with a significance level of 95%, using SPSS 20.

The study concluded that the calcium hydroxide paste with 2% chlorhexidine was more effective than calcium hydroxide paste with 1% povidone iodine against in vitro growth of *Enterococcus faecalis*.

Key words: *Enterococcus faecalis*, hydroxide calcium, chlorhexidine, povidone iodine, bacterial growth.

INTRODUCCIÓN

La endodoncia es considerada en la actualidad una de las ramas más importantes de la odontología, siendo encargada del diagnóstico, tratamiento y pronóstico de las enfermedades que afectan la pulpa dental y los tejidos periapicales.

Una de las metas del tratamiento endodóntico es reducir o eliminar las bacterias del sistema de conductos radiculares.¹

Sin embargo, en el tratamiento de los conductos infectados, con o sin lesión periapical, diversos investigadores y clínicos recomiendan realizar el tratamiento de los mismos en más de una cita, introduciendo una medicación en el interior del conducto para aumentar la desinfección del mismo.

Durante décadas se han usado una variedad de sustancias antibacterianas (eugenol, paramonoclorofenol alcanforado, formocresol, glutaraldehído, hidróxido de calcio, etc.) como medicación temporal, haciendo depender el éxito del tratamiento en muchas ocasiones de dicha medicación.

Todas las medicaciones cuyo efecto deseable en el tratamiento de conductos radiculares infectados es la inhibición del crecimiento bacteriano, suelen poseer mayor irritabilidad y poca compatibilidad con los tejidos periapicales.

Las investigaciones microbiológicas de los últimos años reflejan que en los fracasos endodónticos hay una mayor prevalencia de la especie bacteriana *Enterococcus faecalis*.

Razón por la cual se emplea el hidróxido de calcio, compuesto químico ampliamente utilizado en el tratamiento endodóntico como medicación intraconducto por su capacidad osteogénica para inducir la formación de tejido duro, su buena tolerancia biológica y sus propiedades antimicrobianas basadas

en su pH, factor cuestionado para la neutralización de bacterias resistentes a altos niveles de pH, como la especie antes mencionada.^{2,3}

Sin embargo, no existe un criterio que permita identificar y utilizar el vehículo idóneo para combinarlo, teniendo en cuenta que la base del éxito antibacteriano del hidróxido de calcio se basa en la disociación lenta y sostenida de sus iones y de mantener estable su pH en el tiempo.⁴

Si el conocimiento sobre este aspecto continúa siendo limitado, los microorganismos en el conducto radicular durante el tratamiento endodóntico no serán completamente eliminados, aún más teniendo en cuenta la gran resistencia que puede ejercer el *Enterococcus faecalis*, el cual según investigaciones de Rodríguez *et al.*² puede sobrevivir en condiciones ambientales en las que el pH es similar o superior a 11.5, valores similares a los que proporciona el hidróxido de calcio.⁵

Algunas investigaciones realizadas por Love⁶ han reportado la presencia de biopelículas de *Enterococcus faecalis* en el sistema de conductos de dientes monorradiculares extraídos que habían sido obturados con cemento a base de hidróxido de calcio. La formación de la biopelícula constituye una evidencia contundente de que el *Enterococcus faecalis* puede colonizar los conductos radiculares medicados. Cuando esta especie crece en las biopelículas, puede ser hasta mil veces más resistente a la acción de los antimicrobianos que cuando se encuentra como bacteria planctónica (suspendida en un medio líquido y no adherida a ninguna superficie). Si la formación de biopelículas que contienen *Enterococcus faecalis* ocurre *in vivo*, ello pudiera considerarse como un mecanismo que permite a este microorganismo resistir al tratamiento antimicrobiano.

La habilidad por parte del *Enterococcus faecalis* de causar enfermedades periapicales y fracasos crónicos en dientes tratados endodónticamente puede

deberse a su capacidad de invadir los túbulos dentinarios y mantenerse viable dentro de estos.

Es por ello que se ha tratado de identificar el posible mecanismo que explique cómo esta bacteria puede sobrevivir y crecer dentro de los túbulos dentinarios, y a la vez reinfectar un conducto radicular obturado. En este sentido, Love⁶ realizó un estudio en el cual colocó muestras conteniendo *Enterococcus faecalis* en caldo de infusión cerebro-corazón que contenía distintas cantidades de suero humano por un período de 56 días, demostrando que las células de este microorganismo se mantenían viables y eran capaces de penetrar en los túbulos dentinarios y de adherirse al colágeno tipo I presente en la dentina en presencia de suero humano.

Otro aspecto importante en relación con la alta frecuencia de *Enterococcus faecalis* es su habilidad para crecer en medios con pH ácido y alcalino, donde éste último inhibe habitualmente el crecimiento y supervivencia de muchos otros microorganismos. Con respecto a esto McHugh *et al.*⁷ evaluaron el pH necesario para inhibir *in vitro* su crecimiento y demostraron que se necesita un pH mayor de 11.0 para la erradicación de este microorganismo.

Frente a este contexto, existe la necesidad de evaluar la actividad antibacteriana del hidróxido de calcio asociado con vehículos como la clorhexidina al 2% y yodopovidona al 1% como alternativa de medicación intraconducto frente a la resistencia demostrada del *Enterococcus faecalis*.

Para lo cual se plantea la siguiente hipótesis: La pasta de hidróxido de calcio con clorhexidina al 2% tiene mayor efectividad antibacteriana que la pasta de hidróxido de calcio con yodopovidona al 1% frente al *Enterococcus faecalis*.

Objetivo general

Comparar la efectividad antibacteriana de la pasta de hidróxido de calcio con clorhexidina al 2% y la pasta de hidróxido de calcio con yodopovidona al 1%, frente al *Enterococcus faecalis* de acuerdo al tiempo.

Objetivos específicos

- Determinar la efectividad antibacteriana de la pasta de hidróxido de calcio con clorhexidina al 2% frente al *Enterococcus faecalis* de acuerdo al tiempo.
- Determinar la efectividad antibacteriana de la pasta de hidróxido de calcio con yodopovidona al 1% frente al *Enterococcus faecalis* de acuerdo al tiempo.

Lo cual permitirá seleccionar el vehículo idóneo para la obtención de una pasta medicamentosa a base de hidróxido de calcio con propiedades antibacterianas óptimas, debido a que el tercio apical del sistema de conductos radiculares puede considerarse como una zona crítica para el éxito de la terapia endodóntica, el conocimiento sobre la microbiota infectante de esta área es de particular importancia, razón por la cual ésta investigación se encuentra abocada a encontrar el vehículo que en combinación con el hidróxido de calcio permita tener un mejor control sobre la microbiota y la completa eliminación del mismo en dicha zona, para asegurar de esta manera el éxito del tratamiento.^{8,9}

Estudios previos han demostrado un mayor efecto antibacteriano del hidróxido de calcio al ser combinado con un vehículo como la clorhexidina, tal es el caso de Furuya *et al.*¹⁰ los cuales realizaron una investigación cuyo objetivo fue determinar la eficacia antibacteriana de una mezcla de hidróxido de calcio con clorhexidina al 0.12% en comparación con una mezcla de

hidróxido de calcio a diferentes concentraciones sobre cepas bacterianas de *E. faecalis*, *E. mutans*, *B. subtilis* y *A. israeli*, cuyos resultados fueron que el efecto bactericida de la solución de hidróxido de calcio con clorhexidina fue efectiva contra todas las muestras con un rango de inhibición de 11mm a 19mm, mientras que la solución de hidróxido de calcio con agua destilada no fue efectiva contra 15 muestras y su máxima inhibición fue en un rango de entre 6mm a 10mm.

Según lo expuesto por Ferro *et al.*¹¹, el éxito de los tratamientos de conductos disminuye en un 22% en presencia de lesiones periapicales, causadas por la reinfección. Por lo cual, el encontrar un vehículo adecuado para la combinación con el hidróxido de calcio para la desinfección de los conductos radiculares, brindaría mayores y mejores resultados durante y después del tratamiento, disminuyendo de esta manera el índice de fracasos endodónticos en presencia de lesiones periapicales, y evitando la necesidad de retratamientos convencionales o quirúrgicos.

Los resultados de esta investigación permitirán al endodoncista establecer criterios más sólidos en cuanto a la selección del vehículo para la combinación con el hidróxido de calcio como medicación intraconducto y lograr el mejor efecto bactericida posible, logrando así la desinfección del conducto radicular y eliminación del *Enterococcus faecalis*.

Todos aquellos pacientes que requieran de un tratamiento de conducto en más de una cita y por ende el uso de medicación intraconducto serán los beneficiados con los resultados, logrando de esta forma la desinfección completa del conducto radicular, previniendo la reinfección y formación de lesiones periapicales.

Aunque los resultados de las investigaciones *in vitro* no puedan ser extrapolados a las situaciones *in vivo*, según Rodríguez *et al.*², son una forma de aproximación que nos permiten evaluar y comparar la eficacia de los

materiales dentales; o en este caso comparar diferentes pastas medicamentosas en la especie bacteriana ya mencionada, lo cual permitirá tomar estos datos como base para próximas investigaciones.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

1.1 ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

Furuya *et al.*¹⁰ realizaron una investigación cuyo objetivo fue determinar la eficacia antibacteriana de una mezcla de hidróxido de calcio con clorhexidina al 0.12% en comparación con una mezcla de hidróxido de calcio a diferentes concentraciones sobre cepas bacterianas de *E. faecalis*, *E. mutans*, *B. subtilis* y *A. israeli*. Los resultados fueron que el efecto bactericida de la solución de hidróxido de calcio con clorhexidina fue efectiva contra todas las muestras con un rango de inhibición de 11mm a 19mm, mientras que la solución de hidróxido de calcio con agua destilada no fue efectiva contra 15 muestras y su máxima inhibición fue en un rango de entre 6mm a 10mm.

Wang *et al.*¹² realizaron un estudio comparativo con el objetivo de evaluar el efecto antibacteriano sobre el *Enterococcus faecalis*, de una pasta de clorhexidina al 2% con hidróxido de calcio, puntas de hidróxido de calcio y puntas de diaceato de clorhexidina, y determinar cuál de ellas es la mejor alternativa de elección en el tratamiento de conductos de piezas dentarias con diagnóstico de necrosis pulpar. Como resultado se observaron diferencias significativas entre los efectos de las medicaciones. Destacando que la asociación de clorhexidina al 2% e hidróxido de calcio presentó mayor acción bactericida en todos los períodos de tiempo evaluados (1 hora, 5 horas, 10 horas, 24 horas, 48 horas, 120 horas y 168 horas).

Lopreite *et al.*³ realizaron una investigación cuyo objetivo fue evaluar la efectividad de la clorhexidina y la yodopovidona independientemente y combinadas como vehículo del hidróxido de calcio, en diferentes concentraciones y tiempos, frente a *Staphilococcus saprofiticus* y *Enterococcus faecalis*. Concluyendo que la combinación del hidróxido de calcio con dichos

vehículos no incrementó el poder de la medicación de acuerdo al método empleado en dicha investigación.

Lopreite *et al.*¹³ realizaron un estudio con el objetivo de evaluar la variación de los niveles de pH del hidróxido de calcio mezclado con distintos vehículos. Fueron empleados yodopovidona, solución fisiológica, propilenglicol y clorofenol alcanforado y se compararon entre sí en un lapso de 21 días. Concluyendo que el hidróxido de calcio mezclado con un vehículo de yodopovidona al 1.25%, exhibió una mayor liberación de iones hidroxilo en comparación a la que tuvo por vehículo la solución fisiológica a los 21 días y por lo tanto es de esperar que el pH al ser más elevado tenga un efecto antibacteriano mayor.

Herrera *et al.*¹⁴ desarrollaron una investigación cuyo objetivo fue evaluar si existe sinergismo antibacteriano sobre *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*, al asociar yodopovidona con hidróxido de calcio. Como resultados no hubo diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), entre la acción antibacteriana del hidróxido de calcio puro y asociado a la yodopovidona, independientemente del vehículo utilizado. Se concluye que el efecto antibacteriano del hidróxido de calcio sobre *E. faecalis* y *P. aeruginosa* prevalece al mostrado por la yodopovidona y que la asociación de ambos no altera ese resultado.

Saez *et al.*¹⁵ realizaron un estudio con el objetivo de evaluar la actividad antibacteriana de pastas de hidróxido de calcio preparadas con diferentes vehículos utilizando el método de difusión en agar. Para ello, se prepararon pastas de hidróxido de calcio, utilizando como vehículos gluconato de clorhexidina al 0.5% y 1%, hipoclorito de sodio al 1%, solución iodada de yoduro de potasio al 0.1% y 0.2%, y solución fisiológica. El resultado del estudio demostró que no hubo diferencia significativa entre los halos de

inhibición de las diferentes pastas utilizadas ($p < 0.05$); concluyendo que todas las pastas de hidróxido de calcio inhibieron de manera similar al *Enterococcus faecalis*.

1.2 BASES TEÓRICO CONCEPTUAL

1.2.1 *Enterococcus*

Entre las principales bacterias que afectan el sistema de conductos radiculares, se encuentra el género *Enterococcus*. El cuál forma parte de la flora bacteriana normal del tracto gastrointestinal, tracto genitourinario, vías respiratorias superiores, piel y cavidad oral del ser humano.

Los *Enterococcus* son células esféricas u ovoides que miden de 0.6 μ m a 2.0 μ m x 0.6 μ m a 2.5 μ m, son cocos Gram positivos que aparecen en par o cadenas cortas en medio líquido, son no encapsulados, no forman endosporas, son anaerobios facultativos, poseen requerimientos nutricionales complejos, son catalasa negativa, fermentan una amplia variedad de carbohidratos con elaboración de ácido láctico sin producción de gas, y su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C. Sin embargo, pueden presentar un crecimiento inusual a temperaturas de 10 a 45°C, tolerando incluso valores superiores a 60°C. También presentan un crecimiento en presencia de 6.5% de cloruro de sodio (NaCl), realizan hidrólisis de la bilis – esculina y reducción de la leche con azul de metileno.^{16, 17}

Enterococcus faecalis

Dentro del género *Enterococcus*, la especie *faecalis* es la principal responsable de los fracasos en endodoncia, producto de su gran capacidad de resistencia a pH alcalinos y de penetración a los túbulos dentinarios generando posteriormente una reinfección.

Poco se conoce sobre los factores relacionados con la colonización, la traslocación, adhesión hística, evasión de la respuesta del hospedero y la modulación de la respuesta inflamatoria, sin embargo dentro de los factores de virulencia que posee el *Enterococcus faecalis* se encuentran:

- ✓ Producción de citolisina.
- ✓ Fabricación de superóxida extracelular (O₂).
- ✓ La actividad citocromo C reductasa.
- ✓ Proteínas de superficie ESP.
- ✓ Producción de sustancias de agregación.
- ✓ Gelatinasa.

La citolisina es ampliamente producida por el *Enterococcus faecalis*, ésta se ha asociado con la ruptura de membranas, además contribuye a la toxicidad o letalidad de infecciones.

Algunos estudios recientes han corroborado una estrecha asociación entre la producción de radicales libres superóxidos y un aumento de su capacidad de invasión, incrementando la patogenicidad del *Enterococcus faecalis*. Este factor de virulencia también está asociado con conferirle habilidad a las cepas de evadir las defensas del hospedero y daño a las células eucariotas.

La actividad citocromo C reductasa favorece de igual forma a la capacidad patogénica del *Enterococcus faecalis*.

De la misma manera, el *Enterococcus faecalis* tiene la capacidad de producción de sustancias de agregación o biofilm, los cuales le brindan una alta resistencia a la bacteria frente a la terapia antimicrobiana.¹⁷

1.2.2 Sustancias medicamentosas

a. Hidróxido de calcio

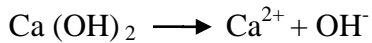
El hidróxido de calcio es uno de los compuestos químicos más utilizados en endodoncia desde su descubrimiento por Hermann en 1920.

Este se presenta como una base fuerte de pH 12.6, poco soluble en agua obtenida a partir de la calcinación (calentamiento) del carbonato de calcio hasta su transformación en óxido de calcio (cal viva), la cual al pasar por un proceso de hidratación se transforma en hidróxido de calcio.

Las propiedades del hidróxido de calcio derivan de su disociación iónica en iones de calcio e hidroxilo, siendo éstos los que explican sus propiedades biológicas y antimicrobianas.

Esta disociación iónica del hidróxido de calcio, se puede explicar a partir de las siguientes fórmulas químicas:

Fórmula 1:



$$1^{\text{n}} \text{Ca}^{2+} = 40.08$$

$$1^{\text{n}} \text{OH}^- = 17.0 \longrightarrow 2^{\text{n}} \text{OH}^- = 34.0$$

$$1^{\text{n}} \text{Ca (OH)}_2 = 74.08$$

Fórmula 2:

$$74.0 \longrightarrow 100\%$$

$$34.0 \longrightarrow x = 45.89\%$$

$$\longrightarrow \text{Ca}^{2+} = 54.11\%$$

$$1^{\text{n}} \text{Ca (OH)}_2 \longrightarrow 2\text{OH}^- = 45.89\%$$

De esta manera, teniendo en cuenta el entorno celular del hidróxido de calcio cuyos valores son de 74.08 g. se puede obtener mediante una regla de tres, el porcentaje de iones de hidroxilo encontrados en el hidróxido de calcio, que corresponde a 45.89%, mientras que el 54.11% corresponde a los iones de calcio. A partir de esas explicaciones, se entiende que cuando se coloca el hidróxido de calcio en el conducto radicular, el 45.89% y el 54.11% se disocian respectivamente en iones hidroxilo e iones calcio.

Mecanismo de acción

El mecanismo de acción del hidróxido de calcio con respecto a los microorganismos es determinante a partir del efecto de su pH sobre el crecimiento, metabolismo y la división celular bacteriana.

La variación del pH se refleja en el crecimiento bacteriano una vez que influencia la actividad enzimática. La velocidad de las reacciones químicas favorecidas por las enzimas es influenciada por el sustrato; estas enzimas pueden estar presentes tanto extra como intracelularmente. Las enzimas extracelulares actúan sobre los nutrientes, carbohidratos, proteínas y lípidos, que mediante las hidrolasas favorecen la digestión. Las enzimas localizadas en la membrana citoplasmática están relacionadas con el transporte de sustancias intra y extracelular, con la actividad respiratoria y con la estructuración de la pared celular. El transporte por la membrana es fundamental, pues para sus complejas reacciones metabólicas, crecimiento y reproducción, existe la necesidad del control del flujo de nutrientes.

En condiciones de pH elevado, la actividad enzimática de las bacterias es inhibida. Aliado a este hecho, cada enzima posee un pH excelente para su acción, según el cual reacciona con una velocidad máxima. El pH interno de las bacterias es diferente del pH externo, internamente su valor oscila alrededor de la neutralidad. Se añade a este hecho que la diferencia del pH intra y

extracelular puede determinar el mecanismo a través del cual la actividad celular se influye por la concentración de iones de hidrógeno.

También se considera la existencia de un gradiente de pH a través de la membrana citoplasmática, que es responsable por producir energía para el transporte de nutrientes y componentes orgánicos para el interior de la célula. Este gradiente puede ser afectado por el cambio en el pH del medio, influenciando el transporte químico a través de la membrana.

En este caso específico, el efecto del pH sobre el transporte químico puede ser directo o indirecto, será directo cuando el pH influya la actividad específica de las proteínas de la membrana y será indirecto cuando causa alteraciones de los estados de ionización de los nutrientes orgánicos. Los componentes no ionizados son mucho más fácilmente transportados a través de la membrana celular que los ionizados. De esta forma, según el pH, puede haber aumento de la disponibilidad de nutrientes, y un intenso transporte puede causar la inhibición y efectos tóxicos sobre la célula.

El crecimiento bacteriano en pH inferior a su pH interno hace que el citoplasma quede más alcalino que el medio, no obstante, cuando el crecimiento ocurre en pH alto, su citoplasma queda más ácido. El crecimiento bacteriano en pH elevado puede causar complicaciones fisiológicas muy complejas.

El pH influye diferentes procesos celulares, como el metabolismo celular, citoesqueleto; pudiendo alterar la forma, la motilidad, la regulación de transportadores y la polimerización de elementos; conductibilidad y transporte a través de la membrana, volumen celular isosmótico. De esta forma, muchas funciones celulares pueden ser afectadas por el pH, entre ellas las enzimas esenciales al metabolismo celular.

Otro proceso a considerar consiste en el transporte químico por la membrana celular que puede alterarse por la cantidad de iones de hidroxilo presentes a

través del proceso de peroxidación lipídica. La pérdida de la integridad de la membrana puede ser observada a través de la destrucción de ácidos grasos insaturados o fosfolípidos. Cuando los iones de hidroxilo remueven los átomos de hidrógeno de ácidos grasos insaturados, se forma un radical lípido libre que reacciona con el oxígeno molecular, transformándose en otro radical peróxido lípido. La peroxidación lípida puede formarse nuevamente a partir de un nuevo inductor, iones de hidroxilo que roban átomos de hidrógeno de un segundo ácido graso insaturado, resultando en otro peróxido lípido y otro nuevo radical lípido libre, transformándose en una reacción en cadena.

Efecto antimicrobiano

La acción bactericida del hidróxido de calcio ha sido relacionada con la liberación de iones hidroxilo, los cuales son radicales altamente oxidantes, con una gran reactividad, lo que dificulta que puedan difundirse a sitios distantes.

Sus efectos letales sobre las bacterias y células ocurren por los siguientes mecanismos:

Daño a la membrana citoplasmática

Los iones hidroxilo inducen peroxidación de lípidos, provocando la destrucción de los fosfolípidos componentes de la membrana celular. Remueven los átomos de hidrógeno de los ácidos grasos insaturados, generando radicales libres lipídicos, los que reaccionan con el oxígeno formando radicales peróxidos, que remueven otro átomo de hidrógeno de otro ácido graso, creando una reacción en cadena que conlleva a un daño extenso en la membrana.

Desnaturalización proteica

La alcalinización producida por el hidróxido de calcio induce el rompimiento de los enlaces iónicos de la estructura terciaria de las proteínas. Esto tiene como consecuencia que muchas enzimas pierdan su actividad biológica, alterando el

metabolismo celular. Los iones hidroxilo también pueden ocasionar daño estructural a las proteínas.

Daño al DNA

Los iones hidroxilo reaccionan con el DNA celular induciendo la separación de las cadenas, inhibiendo la replicación celular y la pérdida de genes.

Además de la acción antibacteriana, es necesario describir también la acción biológica del hidróxido de calcio, y en este caso son los iones de calcio los que participan activamente del proceso de reparación.

Se considera que la fosfatasa alcalina, siendo una enzima hidrolítica, actúa mediante la liberación de fosfato inorgánico de los ésteres de fosfato. Se cree en su relación con el proceso de mineralización.

El pH excelente que posee el hidróxido de calcio, permite la actuación de la fosfatasa alcalina, la cual varía según el tipo y la concentración de sustrato con la temperatura y con la fuente de enzima, siendo que los límites están alrededor de un pH 8.6 a 10.3.

Esta enzima puede separar los ésteres fosfóricos liberando los iones fosfatos que quedan libres, los cuales reaccionan con los iones de calcio para formar un precipitado en la matriz orgánica, el fosfato de calcio, que es la unidad molecular de la hidroxiapatita.

En este contexto, el hidróxido de calcio activa la fosfatasa alcalina a partir de su elevado pH, lo que puede iniciar o favorecer la mineralización.

Además de la fosfatasa alcalina, hay otras dos enzimas, la adenosina trifosfatasa y la pirofosfatasa que son calcio dependiente y favorecen el mecanismo de la reparación del tejido. El hidróxido de calcio también puede activarlas.¹⁶

b. Clorhexidina

La Clorhexidina (CHX) fue desarrollada hace más de 50 años atrás en Inglaterra, siendo lanzada al mercado en el Reino Unido en 1953 como una crema antiséptica, utilizada como desinfectante general y para el tratamiento de infecciones.

Estructura Molecular

La CHX pertenece a la familia de antibacterianos de polibiguanida, consistente en dos anillos simétricos de 4-clorofenil y dos grupos bisguanidinas conectados por una cadena central de hexametileno. La CHX es una molécula básica y estable como una sal. La sal de digluconato de CHX es soluble en agua.

Modo de Acción

La CHX es un agente antimicrobiano de amplio espectro, activo contra bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras. Debido a su naturaleza catiónica, la CHX es capaz de unirse electrostáticamente a las superficies de las bacterias cargadas negativamente, dañando así la superficie externa de la pared celular y dejándola permeable.

Dependiendo de su concentración, la CHX puede tener efecto bacteriostático y bactericida. En altas concentraciones actúa como un detergente, y al dañar la membrana celular causa precipitación del citoplasma y por tanto ejerce un efecto bactericida. En concentraciones bajas, la CHX es bacteriostática, produciendo la pérdida de sustancias de bajo peso molecular, como por ejemplo potasio y fósforo, lo que daña en forma reversible a la célula. También puede afectar el metabolismo celular de varias otras formas tal como el transporte de azúcar e inhibiendo la producción de ácidos en algunas bacterias.

Sustantividad

Debido a la naturaleza catiónica de la molécula de CHX, ésta puede ser absorbida por sustratos aniónicos como la mucosa oral. La CHX tiene la capacidad de unirse a proteínas tales como la albúmina presente en el suero o saliva, en la película de la superficie dentaria, glicoproteínas salivales y membranas mucosas. Esta reacción es reversible. También puede ser absorbida por la hidroxiapatita y los dientes. Estudios han mostrado que la absorción de CHX por los dientes también es reversible. Esta reacción reversible de toma y liberación de CHX lleva a una actividad antimicrobiana que se conoce como sustantividad. Este efecto depende de la concentración de CHX. En bajas concentraciones (0.005 a 0.01%) una monocapa de CHX es absorbida por la superficie del diente, la que puede cambiar las propiedades físicas y químicas de la superficie y podría prevenir o reducir la colonización bacteriana. En altas concentraciones (>0.02%), una múltiple capa de CHX es formada en la superficie lo que provee un reservorio de CHX el que rápidamente libera los excesos en el medio a medida que la concentración de CHX disminuye en el medio.

La sustantividad antibacteriana de tres concentraciones de CHX en solución (4%, 2% y 0.2%) después de cinco minutos de aplicación fueron evaluadas. Los resultados arrojaron una directa relación entre la concentración de CHX y su sustantividad. Por el contrario se atribuyó la sustantividad de la CHX a su capacidad de absorberse a la dentina durante la primera hora. Ellos dicen que sólo después que se alcanza el punto de saturación a la primera hora es que la capacidad antimicrobiana de la CHX aumenta con el tiempo. Así parece ser que la actividad antimicrobiana residual en el canal radicular se mantiene hasta las 12 semanas.

Citotoxicidad

En el área médica, la CHX es normalmente usada a concentraciones de entre 0.12% y 2.0%. De acuerdo a Loe, a estas concentraciones la CHX tiene un bajo nivel de toxicidad, tanto local como sistémicamente.¹⁸

c. Yodopovidona

La yodopovidona o yodo polivinilpirrolidona (PVP) es un producto formado por una solución de povidona y yodo molecular, siendo la proporción más usada la que contiene 10g de yodo disponible por 100g de PVP, equivalente a una solución al 10%, que es la comúnmente encontrada en el mercado.

Pertenece a la familia de los yodóforos, sustancias portadoras o liberadoras de yodo más estables en solución que las soluciones acuosas o las tinturas (soluciones alcohólicas).^{19, 20.}

Mecanismo de acción

Si bien el mecanismo de acción de la yodopovidona no es completamente conocido, se cree que sigue el mismo modo de acción que los yodóforos, los cuales gracias a su intensa capacidad para oxidar (atribuida al yodo) producen la desnaturalización de las proteínas y oxidan enzimas esenciales.²⁰

Características de la yodopovidona

- Amplio espectro de actividad contra bacterias, virus y hongos.
- Baja o nula actividad sobre esporas bacterianas.
- Es más soluble en agua.
- Penetra mejor en la célula bacteriana.
- Es un antiséptico ampliamente usado en cirugía para la antisepsia de piel y mucosas.

- Es poco irritante para la piel, sin embargo, algunos pacientes pueden presentar cierta hipersensibilidad que puede evolucionar a erupción con urticaria.
- Su liberación de yodo depende del pH. Ante un pH ácido se produce mayor liberación de yodo libre y por lo tanto mayores efectos secundarios, irritantes y corrosivos.^{19,20}

La PVP es un polímero que se une al yodo libre. Este complejo polivinil pirrolidona – yodo mantiene la actividad germicida del yodo y lo libera lentamente al actuar como un reservorio del mismo.

La yodopovidona, es un polímero soluble en agua y fisiológicamente aceptable por los seres humanos; es capaz de combinarse con el yodo y de esta manera volverlo soluble. Con esta acción se obtiene un producto final en el cual se encuentran aún presentes como yodo utilizable las dos terceras partes de la cantidad del complejo de la cantidad original, útil para propósitos microbicidas. El resto del yodo se encuentra presente esencialmente como ion inorgánico de yodo y una pequeña cantidad se combina orgánicamente. Estas dos últimas formas no producen yodo utilizable. Al constituirse esta molécula estable en caso de ser absorbida, no se une a las proteínas plasmáticas y por lo mismo carece de efecto tirotóxico y es eliminado íntegramente por el riñón.

Una de sus principales ventajas es que son menos irritantes que la solución yodo – yodurada, no tiñen y conservan la misma eficacia. Además, es considerado un bactericida de potencia intermedia, con elevada actividad frente a cepas Gram positivas y Gram negativas, virus con cubierta, virus sin cubierta y hongos. Sin embargo, su actividad frente a micobacterias es variable, siendo poco activa frente a esporas.

La solución de yodopovidona se prepara por reacción del yodo con polivinil pirrolidona, un polímero hidrosoluble que se presenta en escamas o polvo fino

soluble en agua y en alcohol. El compuesto es estable y en solución acuosa no da la reacción del yodo.

Las concentraciones de yodopovidona entre 0,5% y 1% liberan 23 ppm de yodo libre y por lo tanto poseen un mayor poder antiséptico, que el otorgado por concentraciones mayores como en el caso de la solución al 10%, que en contacto con sustancia orgánica libera tan sólo 2 ppm de yodo libre. Sin embargo, algunos autores mencionan que la actividad antimicrobiana disminuye cuando los productos son diluidos.^{19,20}

Algunos autores como Lopreite²⁰ mencionan que la yodopovidona al 1% no posee efectos secundarios y que por el contrario posee como ventaja una sustentividad de 60 minutos.

Leonardo¹⁹ por su parte afirma que la yodopovidona por su acción tensoactiva pequeña, resulta siendo un auxiliar excelente en la limpieza de conductos radiculares. Y que actualmente las preparaciones comerciales incluyen en su fórmula Lauril Etoxi Sulfato de Sodio, el cual es un detergente aniónico sintético que baja la tensión superficial de los líquidos favoreciendo la penetración de los mismos en los conductos laterales e irregularidades del conducto, y por ende aumenta la acción antibacteriana de la solución.

Sin embargo, la yodopovidona presenta también ciertas desventajas entre las cuáles se pueden mencionar:

- Falta de autoesterilidad de las soluciones que pueden contaminarse con *Pseudomonas*.
- Su acción antiséptica es afectada por el pH, la temperatura, el tiempo de contacto, la concentración de yodo disponible y la concentración de las soluciones.
- Se neutraliza rápidamente en presencia de materia orgánica. Sin embargo, su actividad antimicrobiana sigue siendo mejor que el yodo puro.^{19,20}

1.3 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS

Enterococcus faecalis

Es un coco Gram positivo, anaerobio facultativo, que puede encontrarse en la flora intestinal humana normal y en la cavidad bucal en menor concentración. El cual ha sido identificado como una causa frecuente de infecciones periapicales persistentes.²¹

Efectividad antibacteriana

Es la capacidad que tiene un fármaco o agente químico para disminuir el número y patogenicidad de las bacterias, inhibiendo su crecimiento y desarrollo sin dañar al organismo infectado, actuando sobre ellas directa o indirectamente.²²

Pasta medicamentosa

Es la combinación de dos o más sustancias que hacen sinergismo entre ellas potenciando su efecto antibacteriano, la cual es utilizada para inhibir y destruir microorganismos que escaparon de la acción de la preparación biomecánica.²³

1.4 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL E INDICADORES	TIPO		ESCALA DE MEDICIÓN
			SEGÚN SU CARACTERÍSTICA	SEGÚN SU FUNCIÓN	
EFFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA	Es la capacidad que tiene un fármaco o agente químico para disminuir el número y patogenia de las bacterias, inhibiendo su crecimiento y desarrollo sin dañar al organismo infectado, actuando sobre ellas directa o indirectamente. ²²	Cuantificada a través del halo de inhibición por medio de una regla regulada en milímetros.	Númerica	Dependiente	De razón
PASTA MEDICAMENTOSA	Es la combinación de dos o más sustancias que hacen sinergismo entre ellas potenciando su efecto antibacteriano, la cual es utilizada para inhibir y destruir microorganismos que escaparon de la acción de la preparación biomecánica. ²³	Pasta P1: Hidróxido de calcio + clorhexidina 2%. Pasta P2: Hidróxido de calcio + yodopovidona 1%.	Catógica	Independiente	Nominal
TIEMPO DE OBSERVACIÓN	Intervalos de tiempo en la que el investigador evalúa y recopila la información del fenómeno o evento estudiado. ²⁴	Para efecto del estudio se considera como tiempo de observación: 24 horas, 48 horas, 7 días y 14 días.	Númerica	Interviniente	De intervalo

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 DISEÑO METODOLÓGICO

2.1.1 Tipo de estudio y diseño de estudio

El tipo de investigación de acuerdo a su finalidad es básica y de acuerdo al diseño es experimental.

2.1.2 Población y muestra

La muestra estuvo conformada por diez placas Petri conteniendo *Enterococcus faecalis*, las cuales fueron divididas en dos grupos experimentales y un grupo control.

Se decidió optar por la utilización de diez placas Petri teniendo en cuenta la validación de métodos analíticos de la Asociación Española de Farmacéutica, la cual describe que el grado de precisión requerido para la valoración aceptable de un medicamento o antibiótico depende de los límites de aceptación. Por ejemplo, si el límite de aceptación es del 95% se requiere de un número bajo de réplicas ($n=2-3$), por otro lado si el límite de aceptación es del 98% el número de réplicas aumenta ($n > 6$). Por lo tanto para efectos de este estudio en el cual se trabajó con una aceptación del 95% y con el fin de obtener datos más exactos se creyó conveniente trabajar con 10 réplicas, lo cual supera ampliamente lo requerido según la validación de métodos analíticos en mención.²⁵

El diseño muestral fue no probabilístico.

Criterios de Selección

- Cepa obtenida e identificada de la familia *Enterococcus*, especie *faecalis*.
- Muestras sin contaminación alguna.

2.1.3 Métodos, técnicas e instrumentos de recolección de datos.

Procesamiento de la cepa

La cepa de *Enterococcus faecalis* se sembró en medio de cultivo tripticosa soya, siendo incubada por 24 horas, posteriormente se ajustó hasta lograr una suspensión bacteriana equivalente a una turbidez estándar de 0.5 en la escala de McFarland. (Ver ANEXO 1)

Diseño del estudio

Se dispuso de 10 placas Petri previamente esterilizadas, que contenían agar Müller Hinton a 40° C, sobre las cuales fue inoculada la bacteria *Enterococcus faecalis* previamente aislada. Cada placa fue dividida en 3 segmentos, a cada uno de los cuales se le asignó de manera aleatoria un disco de papel filtro marca WHATMAN^R, de un mismo tamaño y con una misma capacidad de absorción, embebido en la pasta medicamentosa correspondiente. Posteriormente se colocaron todas las placas Petri en una estufa marca MEMMERT a 37°C. (Ver ANEXOS 2 - 5)

A continuación se detalla los grupos de pastas medicamentosas: pasta P1 (0.4g de hidróxido de calcio + 6ml clorhexidina al 2%), pasta P2 (0.4g hidróxido de calcio + 6ml yodopovidona al 1%) y la pasta P3 o control (0.4g hidróxido de calcio + 6ml agua destilada). La mezcla de cada una de las pastas medicamentosas se realizó sobre una platina de vidrio empleando espátulas para cemento, todos estos materiales fueron esterilizados previamente.

La cantidad de hidróxido de calcio en polvo y de los vehículos a emplear fue determinada durante la prueba piloto de tal manera que al mezclarlas se obtuvieran pastas de consistencia homogénea. Para dosificar el hidróxido de calcio en polvo se utilizó una balanza analítica de precisión marca OHAUS TRAVELER y en el caso de los vehículos se empleó una jeringa de tuberculina estéril marca NIPRO^{MR} para cada uno de ellos.

Procesamiento de la medición

Finalmente, se procedió a la lectura de los halos de inhibición producidos por estas pastas medicamentosas sobre los cultivos de la bacteria en mención a las 24 horas, 48 horas, 7 días y 14 días de realizada la prueba por medio de una regla plástica marca ARTESCO calibrada en milímetros, para determinar el efecto antibacteriano de dichas pastas medicamentosas. (Ver ANEXO 6)

Recolección de datos

Los datos obtenidos en cada lectura fueron registrados en las tablas de recolección de datos. (Ver ANEXOS 7 y 8)

2.1.4 Procedimientos para garantizar aspectos éticos en las investigaciones con sujetos humanos

Las cepas bacterianas fueron obtenidas del banco de cepas del laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, previa autorización del jefe de laboratorio. En ningún momento se tuvo contacto directo con muestras biológicas de pacientes.

Para la ejecución de la presente investigación, los autores emplearon todas las medidas estándares de bioseguridad establecida por MINSA para manejo antes, durante y después de cada procedimiento microbiológico.

Los campos de acción de este trabajo de investigación fueron los ambientes del laboratorio de Microbiología y Genética de la Universidad Católica Santo Toribio de Mogrovejo.

Cabe mencionar que para la ejecución de este proyecto de investigación no fue necesario trabajar con una cámara de bioseguridad, debido a que los cocos Gram positivos no son microorganismos esporulados, por lo que está permitido trabajar en un laboratorio nivel I.

2.1.5 Plan de procesamiento y análisis de datos

Se realizó un análisis de varianza de ANOVA, con un nivel de significancia del 95%, puesto que es una metodología para analizar la variación entre muestras y la variación al interior de las mismas mediante la determinación de varianzas. Este análisis se realizó utilizando el programa SPSS Statistics 20.

Además se empleó el análisis de Tukey, el cual nos determinó la diferencia entre medias de las muestras en el tiempo.

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. RESULTADOS

TABLA 1. Distribución de las medias de los halos de inhibición de cada pasta medicamentosa de acuerdo al tiempo.

Tiempo Grupos	24 HORAS			48 HORAS			7 DÍAS			14 DÍAS		
	X1	X2	X3	X1	X2	X3	X1	X2	X3	X1	X2	X3
Halo de inhibición (mm.)	15,5	12,5	11	16,1	13	11,5	16,5	13	11,8	16,6	13	11,9

X1: Media de los halos de inhibición de todos los P1.

X2: Media de los halos de inhibición de todos los P2.

X3: Media de los halos de inhibición de todos los P3.

TABLA 2. Efectividad antibacteriana de la pasta de hidróxido de calcio con clorhexidina al 2% y la pasta de hidróxido de calcio con yodopovidona al 1%, frente al *Enterococcus faecalis*

Tiempo	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	*Diferencia de medias (I-J)	Gl	F	⁺p
24 horas	P1	P2	3,000	19	34,56	0,000
48 horas	P1	P2	3,100	19	21,03	0,000
7 días	P1	P2	3,500	19	26,42	0,000
14 días	P1	P2	3,600	19	28,41	0,000

*Prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

⁺ Análisis de ANOVA de un factor.

La tabla muestra que existe diferencia significativa entre el tratamiento P1 en relación al tratamiento P2 a las 24 horas, 48 horas, 7 días y 14 días.

TABLA 3. Efectividad antibacteriana de la pasta de hidróxido de calcio con clorhexidina al 2% frente al *Enterococcus faecalis*

Tiempo	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	*Diferencia de medias (I-J)	Gl	F	⁺p
24 horas	P1	P3	4,500	19	36,25	0,000
48 horas	P1	P3	4,600	19	25,53	0,000
7 días	P1	P3	4,700	19	24,17	0,000
14 días	P1	P3	4,700	19	28,96	0,000

*Prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

⁺ Análisis de ANOVA de un factor.

La tabla muestra que existe diferencia significativa entre el tratamiento P1 en relación al tratamiento P3 a las 24 horas, 48 horas, 7 días y 14 días.

TABLA 4. Efectividad antibacteriana de la pasta de hidróxido de calcio con yodopovidona al 1% frente al *Enterococcus faecalis*

Tiempo	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	*Diferencia de medias (I-J)	Gl	F	⁺p
24 horas	P2	P3	1,500	19	32,46	0,000
48 horas	P2	P3	1,500	19	20,56	0,065
7 días	P2	P3	1,200	19	19,23	0,058
14 días	P2	P3	1,100	19	14,53	0,075

*Prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

⁺ Análisis de ANOVA de un factor.

La tabla muestra que existe diferencia significativa entre el tratamiento P2 en relación al tratamiento P3 sólo a las 24 horas.

3.2. DISCUSIÓN

El presente estudio comparó la efectividad antibacteriana de la pasta de hidróxido de calcio con clorhexidina al 2% y la pasta de hidróxido de calcio con yodopovidona al 1% frente al crecimiento bacteriano *in vitro* del *Enterococcus faecalis*.

Los resultados evidenciaron que hubo mayor efectividad antibacteriana de la pasta de hidróxido de calcio con clorhexidina al 2% en todos los periodos de tiempo evaluados según los datos obtenidos por medio del análisis de Tukey y Anova con una diferencia significativa.

Estos resultados coinciden con la investigación de Sameer²⁶ quien realizó un trabajo de investigación en el que concluyó que la pasta de hidróxido de calcio con clorhexidina al 2% fue significativamente más efectiva que las combinaciones con yodopovidona al 5% y con solución salina, lo cual al igual que el presente estudio evidencia que la asociación con yodopovidona, independientemente de la concentración que se emplee, no aumenta de manera significativa el efecto antibacteriano que posee el hidróxido de calcio. Hecho que puede explicarse por la formación de subcompuestos producto de la combinación del hidróxido de calcio con algunos vehículos como la yodopovidona, lo cual conlleva a una disminución en su efectividad, atribuida como se mencionó, a una reacción química que se traduce en un comportamiento no deseado en cuanto a su efecto antiséptico.²⁰

Por el contrario, Lopreite *et al.*³ encontraron que la combinación del hidróxido de calcio con clorhexidina y yodopovidona respectivamente no incrementó el poder de la medicación. La diferencia entre ambos estudios puede ser atribuible al tiempo de evaluación de la muestra. El estudio en mención, tuvo periodos de observación de 48 horas, 7 días, 14 días, 21 días, 30 días a diferencia de esta investigación en donde el tiempo de evaluación fue a partir de las 24 horas, 48

horas, 7 días y 14 días; siendo el período de tiempo de 24 horas donde se observó una mayor diferencia significativa.

Otro factor atribuible a la diferencia de resultados de ambos estudios es que en la presente investigación se empleó una cepa bacteriana, que si bien se corroboró mediante pruebas bioquímicas que fuera *Enterococcus faecalis*, no fue una especie ATCC certificada como la empleada en la investigación de Lopreite *et al*³, en la cual emplearon la cepa bacteriana *Enterococcus faecalis* ATCC 2286 con características y factores de virulencia ya comprobados.

De igual forma el presente estudio también comparó la efectividad antibacteriana de la pasta de hidróxido de calcio con clorhexidina al 2% y la pasta de hidróxido de calcio con agua destilada frente al crecimiento bacteriano *in vitro* del *Enterococcus faecalis*.

Los resultados obtenidos evidenciaron que hubo mayor efectividad antibacteriana de la pasta de hidróxido de calcio con clorhexidina al 2%, en comparación a la pasta de hidróxido de calcio con agua destilada frente al crecimiento bacteriano *in vitro* de *Enterococcus faecalis* en todos los periodos de tiempo evaluado según los datos obtenidos por medio del análisis de Tukey y Anova con una diferencia significativa.

Esto coincide con los estudios realizados por Furuya *et al.*¹⁰ y Wang *et al.*¹², los cuales encontraron que la asociación entre hidróxido de calcio y clorhexidina obtuvo un mayor rango de inhibición bacteriana. La similitud en los resultados de estos estudios se da a pesar de la diferencia entre las concentraciones de clorhexidina utilizadas (clorhexidina al 0.5% empleada por Furuya *et al.*¹⁰ frente a una concentración al 2% utilizada por Wang *et al.*¹² y en el presente estudio). Esto último puede atribuirse a que el principal efecto antibacteriano está dado por el pH alcalino del hidróxido de calcio de 12.2 a 12.8, y se debe tener en cuenta que la mezcla de hidróxido de calcio con clorhexidina, independientemente de la concentración de ésta última, no modifica el pH.²⁷

De la misma forma, Evans *et al.*²⁸ presentaron resultados similares; determinando que el hidróxido de calcio con clorhexidina al 2% fue significativamente más eficaz eliminando al *Enterococcus faecalis* en los túbulos dentinarios de bovinos, en comparación del hidróxido de calcio mezclado con agua. Esta similitud podría explicarse por la teoría de que la mezcla de hidróxido de calcio y clorhexidina realizan un efecto aditivo o sinérgico entre sí, mejorando por ende el efecto antibacteriano de la pasta obtenida.²⁹ Esto coincide con lo encontrado por Turk *et al.*³⁰ quienes empleando una metodología similar obtuvieron el mismo resultado.

Por otro lado estos resultados difieren de los encontrados por Saez *et al.*¹⁵, Sinha *et al.*³¹, Ballal *et al.*³², Gomes *et al.*³³ y Sukawat *et al.*³⁴ quienes demostraron que la combinación de hidróxido de calcio con clorhexidina no realiza sinergismo alguno y por el contrario la clorhexidina de manera individual presentó mejor efecto antibacteriano frente al crecimiento de *Enterococcus faecalis*. La disimilitud entre estos estudios puede deberse a la metodología empleada, ya que las investigaciones antes descritas presentaron diferencias en la fase experimental y recolección de datos, las cuales pueden haber conllevado a errores humanos, calibración de instrumental y/o contaminación de las muestras durante el proceso, pudiendo haber alterado los resultados en comparación al presente estudio.^{18,35}

Por último el presente estudio también comparó la efectividad antibacteriana de la pasta de hidróxido de calcio con yodopovidona al 1% y la pasta de hidróxido de calcio con agua destilada frente al crecimiento bacteriano *in vitro* del *Enterococcus faecalis*.

Los resultados obtenidos en el presente estudio evidencian que hubo mayor efectividad antibacteriana de la pasta de hidróxido de calcio con yodopovidona al 1%, en comparación a la pasta de hidróxido de calcio con agua destilada

frente al crecimiento bacteriano *in vitro* de *Enterococcus faecalis* solo a las 24 horas, en los demás periodos de tiempo no hubo diferencias significativas según los datos obtenidos por medio del análisis de Tukey y Anova con una diferencia significativa.

Estos resultados difieren de los encontrados por Lopreite *et al.*¹³ quienes realizaron un estudio, obteniendo como resultado que el hidróxido de calcio mezclado con un vehículo de yodopovidona al 1.25%, presenta mayor liberación de iones hidroxilo en comparación con la de solución fisiológica a los 21 días, por lo tanto es de esperar que el pH al ser más elevado tenga un efecto antibacteriano mayor.

En resumen, el presente estudio indica que el hidróxido de calcio en combinación con clorhexidina al 2% tuvo mayor efectividad antibacteriana frente al *Enterococcus faecalis* en comparación a la combinación de hidróxido de calcio con yodopovidona al 1% e hidróxido de calcio con agua destilada en los cuales no se evidenció inhibición de crecimiento bacteriano significativo.

Si bien es cierto no se puede extrapolar los resultados obtenidos en estudios *in vitro* a estudios *in vivo*, de allí que es preciso destacar que investigaciones adicionales siguen siendo necesarias para verificar que estos resultados también se producirán en el complejo sistema de conductos radiculares.

CONCLUSIONES

- La pasta de hidróxido de calcio con clorhexidina al 2% presentó mayor efectividad en comparación a la pasta de hidróxido de calcio con yodopovidona al 1%, en todos los tiempos de observación. ($p=0.000$)
- La pasta de hidróxido de calcio con clorhexidina al 2% mostró mayor efectividad antibacteriana frente al *E. faecalis* en todos los tiempos de observación ($p=0.000$).
- La pasta de hidróxido de calcio con yodopovidona al 1% mostró mayor efectividad antibacteriana frente al *E. faecalis* sólo a las 24 horas ($p=0.000$).

BIBLIOGRAFÍA

1. Martínez D, Díaz A, Covo E. Aplicaciones del hidróxido de calcio en endodoncia. Cartagena: Pontificia Universidad Javeriana; 2007.
2. Rodríguez L, Pumarola J, Canalda C. Acción antimicrobiana *in vitro* de distintas medicaciones sobre *Enterococcus faecalis* y *Actinomyces israelii*. Endodoncia [revista en Internet]. 2009 [Consultado 20 Febrero 2013]; 27(1):7-12. Disponible en: www.medlinedental.com/pdf-doc/ENDO/antimicrobiana.pdf
3. Lopreite G, Basilaki J, Michelena G, Tobias M, Hecht P, Sierra L. Acción Antimicrobiana de la Clorhexidina y la Yodopovidona y sus combinaciones con HO₂Ca en diferentes tiempos y concentración *in vitro*. Soc Endo Chile [revista en Internet]. 2009 [Consultado 25 Febrero 2013]; 20(1):40-45. Disponible en: <http://www.socendochile.cl/revistas/20.pdf>
4. Silva D, Andrade L, Lainfiesta J. Comparación del hidróxido de calcio como medicamento intraconducto, utilizando vehículos viscosos y acuosos. Estudio *in vitro*. ADM [revista en Internet]. 2005 [Consultado 25 Febrero 2013]; 62(4):137-141. Disponible en: http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_revista=24&id_seccion=146&id_ejemplar=3345&id_articulo=32553
5. De la casa M, Bulacio M, Sáez M, López G, Rainden G, Pastas de hidróxido de calcio preparadas con diferentes soluciones. Acción solvente. Endodoncia [revista en Internet]. 2009 [Consultado 28 Febrero 2013]; 27(1):19-22. Disponible en: <http://www.medlinedental.com/pdf-doc/ENDO/pastas.pdf>
6. Love R. *Enterococcus faecalis*: A mechanism for its role in endodontic failure. Int Endod J [journal online]. 2001 [Cited 2 Mar 2013]; 34:399- 405. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11482724>

7. McHugh C, Zhang P, Michalek S, Eleazer P. pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. J Endod [journal online]. 2004 Apr [Cited 25 Mar 2013]; 30(4): 218-9. Available from: [http://www.jendodon.com/article/S0099-2399\(05\)60125-2](http://www.jendodon.com/article/S0099-2399(05)60125-2)
8. Ramón J. Difusión de iones hidroxilo y calcio de la pasta de hidróxido de calcio químicamente puro con el gel de aloe vera como medicamento intraconducto [Tesis]. Lima: Universidad Mayor de San Marcos; 2004. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/1738/1/ramon_rj.pdf
9. Rodríguez I. Actividad antimicrobiana de distintos materiales utilizados en la terapia de conductos radiculares [Tesis doctoral]. Granada: Universidad de Granada; 2009. Disponible en: <http://hera.ugr.es/tesisugr/17760690.pdf>
10. Furuya A, Arroniz S, Vaca S, Paniagua G, Monroy E, Hernández L. Evaluación de la actividad antibacteriana en una mezcla de hidróxido de calcio y clorhexidina al 0.12% como irrigante pulpar. Oral [revista en Internet]. 2007 [Consultado 30 Abril 2013]; 8(24):374-379. Disponible en: http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=46644&id_seccion=2030&id_ejemplar=4725&id_revista=124
11. Ferro P, Quiñonez M, Espinosa L, Felipe S, Salamanca L. Tratamiento no quirúrgico de lesiones periapicales. Rev Cubana Estomatol [revista en Internet] 2005 Ago [Consultado 2 Mayo 2013]; 42(2). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072005000200008&lng=es.
12. Wang L, Sigüas M. Estudio comparativo de la efectividad antibacteriana de la asociación de clorhexidina al 2%, de hidróxido de calcio, puntas de hidróxido de calcio y puntas de clorhexidina frente al *Enterococcus faecalis*. Kiru [revista en Internet]. 2007 [Consultado 17 Mayo 2013]; 4(1):14-16. Disponible en:

- <http://www.usmp.edu.pe/odonto/servicio/2007/Kiru2007v4n1/Kiru2007v4n1art3.pdf>
13. Lopreite G, Rodríguez P, Lenarduzzi A, Sierra L. Variación de los niveles de pH del hidróxido de calcio mezclado con distintos vehículos. Rev Fac de Odont UBA [revista en Internet]. 2009 [Consultado 22 Mayo 2013]; 24(1):56-57. Disponible en: <http://www.odon.uba.ar/revista/2009vol24num56-57/docs/revfacuvol24completa.pdf>
 14. Herrera D, Tay L, Kose C, Andrade T, Rezende E, Kozlowski V *et al.* Efecto antibacteriano de la asociación de hidróxido de calcio y iodoformo sobre *Enterococcus faecalis* y *Pseudomona aeruginosa*. Rev Estomatol Herediana [revista en Internet]. 2008 [Consultado 25 Mayo 2013]; 18(1):5-8. Disponible en: http://www.upch.edu.pe/faest/publica/2008/vol18_n1/vol18_n1_08_art1.pdf
 15. Saez M, De la Casa M, López M, López G. Acción antibacteriana de pastas de hidróxido de calcio frente a *Enterococcus faecalis*. Endodoncia. 2012;30(2):60-63.
 16. Estrela C. Ciencia Endodóntica. 1ª ed. Brasil: Artes Médicas Latinoamérica; 2005.
 17. Quiñones D. *Enterococcus* aislados en Cuba: Resistencia antimicrobiana, virulencia y diversidad genética [Tesis doctoral]. Cuba: Instituto de Medicina tropical Pedro Kourí; 2010. Disponible en: http://tesis.repo.sld.cu/311/1/dianelys_quinones.pdf
 18. Basrani B. Update en Clorhexidina. Soc Endo Chile [revista en Internet]. 2009 [Consultado 10 Junio 2013]; 20(1):6-15. Disponible en: <http://www.socendochile.cl/revistas/20.pdf>
 19. Leonardo M. Endodoncia: Tratamiento De Conductos Radiculares. Principios Técnicos y Biológicos. Sao Paulo: Editorial Médica Panamericana; 2005.

20. Lopreite G. Biofilms en endodoncia: Descripción estructural, mecanismo de formación, implicancia clínica y posibilidades terapéuticas de los biofilms en endodoncia [Internet]. Buenos Aires: Seccional de la Sociedad Argentina de Endodoncia; 2009 [Consultado 15 Junio 2013]. Disponible en: <http://www.endodoncia-sae.com.ar/download/articulos/biofilms.pdf>
21. Ausina V, Moreno S. Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Madrid: Ed. Médica Panamericana; 2006.
22. Flores J, Armijo J, Mediavilla A. Farmacología Humana. 3ra edición. Barcelona: Masson; 1997.
23. Soares I, Golberg F. Endodoncia: Técnicas y fundamentos. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2007.
24. Hurtado de Barrera J. Metodología de la investigación holística. 3ra edición. Venezuela: Editorial SYPAL; 2000.
25. Aguirre L, García F, García T, Illera M, Juncadella M, Lizondo M *et al.* Validación de métodos analíticos [Libro electrónico]. Barcelona: Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria; 2001 [Consultado 30 Julio 2013]. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/47159911/Validacion-Metodos-Analiticos-AEFI>
26. Sameer P. Antibacterial effect of calcium hydroxide, calcium hidroxide combined with chlorhexidine and calcium hydroxide combined with povidone iodine against *Enterococcus faecalis* in dentinal tubules of human incisors an *in vitro* comparative study [Dissertation]. Karnataka: Rajiv Gandhi University of Health Sciences; 2009. Available from: <http://14.139.159.4:8080/jspui/bitstream/123456789/2532/1/Sameer%20P.pdf>
27. Tronstad L, Andrease J, Hasselgren G, Kristerson K. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. J Endod [journal online].

- 2001 [Cited 15 September 2013]; 7(11):17–21. Available from: [http://www.jendodon.com/article/S0099-2399\(81\)80262-2/abstract](http://www.jendodon.com/article/S0099-2399(81)80262-2/abstract)
28. Evans M, Craig J, Khemaleelakul S, Xia T. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. *J Endod* [journal online]. 2003 [Cited 20 September 2013]; 29(5):338-339. Available from: [http://endoexperience.com/userfiles/file/unnamed/Ca\(OH\)2-CHX%20paste%20JEndod%202003.pdf](http://endoexperience.com/userfiles/file/unnamed/Ca(OH)2-CHX%20paste%20JEndod%202003.pdf)
29. Peters L, Wesselink P, Moorer W. The fate and the role of bacteria left in root dentinal tubules. *Int Endod J* [journal online]. 1995 [Cited 25 September 2013]; 28:95–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7665208>
30. Turk B, Sen B, Ozturk T. *In vitro* antimicrobial activity of calcium hydroxide mixed with different vehicles against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* [journal online]. 2009 [Cited 3 October 2013]; 108(2):297-301. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Turk+B.+In+vitro+antimicrobial+activity+of+calcium+hydroxide+mixed+with+different+vehicles+against+Enterococcus+faecalis+and+Candida+albicans>.
31. Sinha N, Patil S, Dodwad P, Patil A, Singh B. Evaluation of antimicrobial efficacy of calcium hydroxide paste, chlorhexidine gel, and a combination of both as intracanal medicament: An *in vivo* comparative study. *J Conserv Dent* [journal online]. 2013 Jan [Cited 7 October 2013]; 16(1):65-70. Available from: <http://www.jcd.org.in/article.asp?issn=0972-0707;year=2013;volume=16;issue=1;spage=65;epage=70;aulast=Sinha>
32. Ballal V, Kundabala M, Acharya S, Ballal M. Antimicrobial action of calcium hydroxide, chlorhexidine and their combination on endodontic pathogens. *Aust Dent J* [journal online]. 2007 Jun [Cited 8 October 2013]; 52(2):118-21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17687957>

33. Gomes B, Souza S, Ferraz C, Teixeira F, Zaia A, Valdrighi L *et al.* Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine *in vitro*. Int Endod J [journal online]. 2003 Apr [Cited 12 October 2013]; 36(4):267-75. Available from: <http://www.oro centro.com.br/files/file-205224389.pdf>
34. Sukawat C, Srisuwan T. A comparison of the antimicrobial efficacy of three calcium hydroxide formulations on human dentin infected with *Enterococcus faecalis*. J of Endod [journal online]. 2002 [Cited 25 October 2013]; 28:102-104. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11833679>
35. Lodish, J, Baltimore D, Berk A, Zipursky S, Matsudaira P, Darnell J. Molecular Cell Biology [monograph on the internet]. 4a ed. New York: Scientific American Books Inc; 2000 [Cited 12 October 2013]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21475/>

ANEXOS

Anexo 1

Reactivación de la cepa de *Enterococcus faecalis*



Fig. 1. Cepa de *Enterococcus faecalis*.



Fig. 2. Agar Müller Hinton.

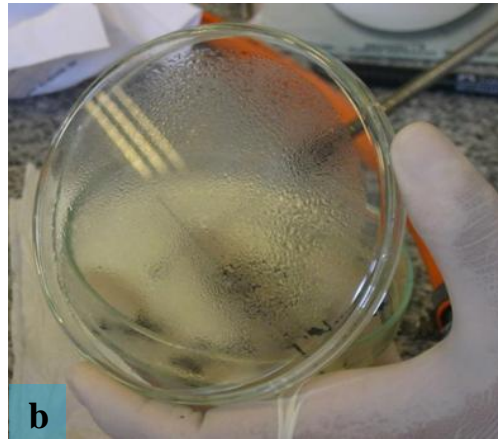


Fig. 3. a, b: Reactivación de la bacteria en placa Petri que contiene agar Müller Hinton a 40°C.



Fig. 4. Incubación de la bacteria reactivada en estufa a 37°C.

Anexo 2

Preparación de materiales a emplear en el experimento

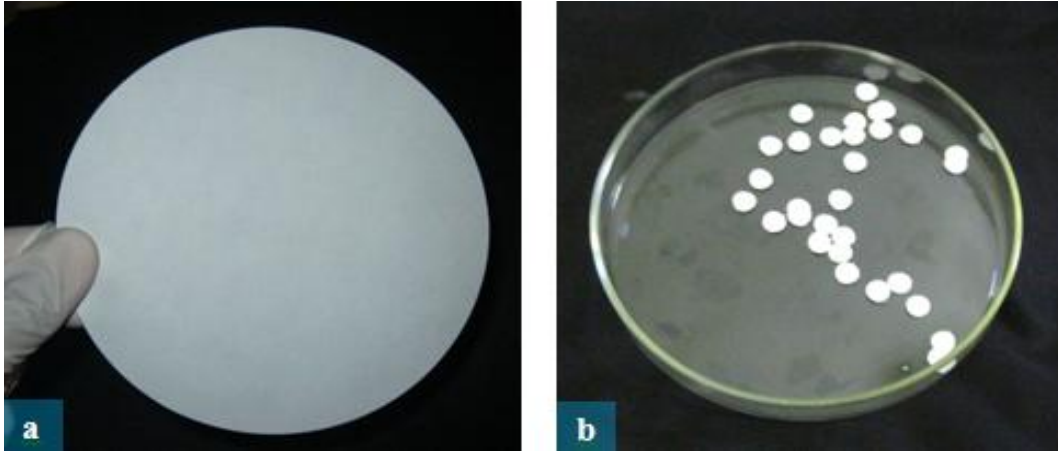


Fig. 5. a, b: Preparación de los discos de papel filtro y colocación de los mismos en una placa Petri para su esterilización.

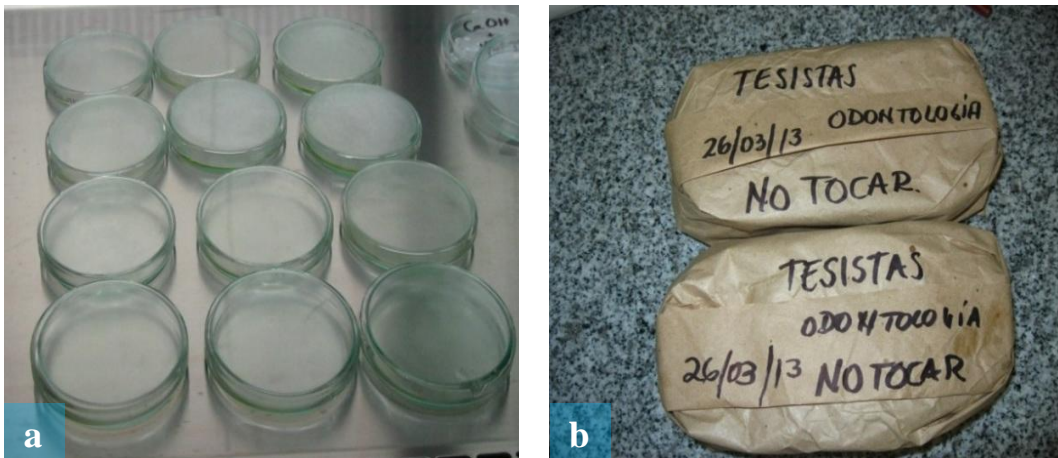


Fig. 6. a, b: Preparación y esterilización de las placas Petri que se emplearon en el estudio.

Anexo 3

Inoculación de la bacteria

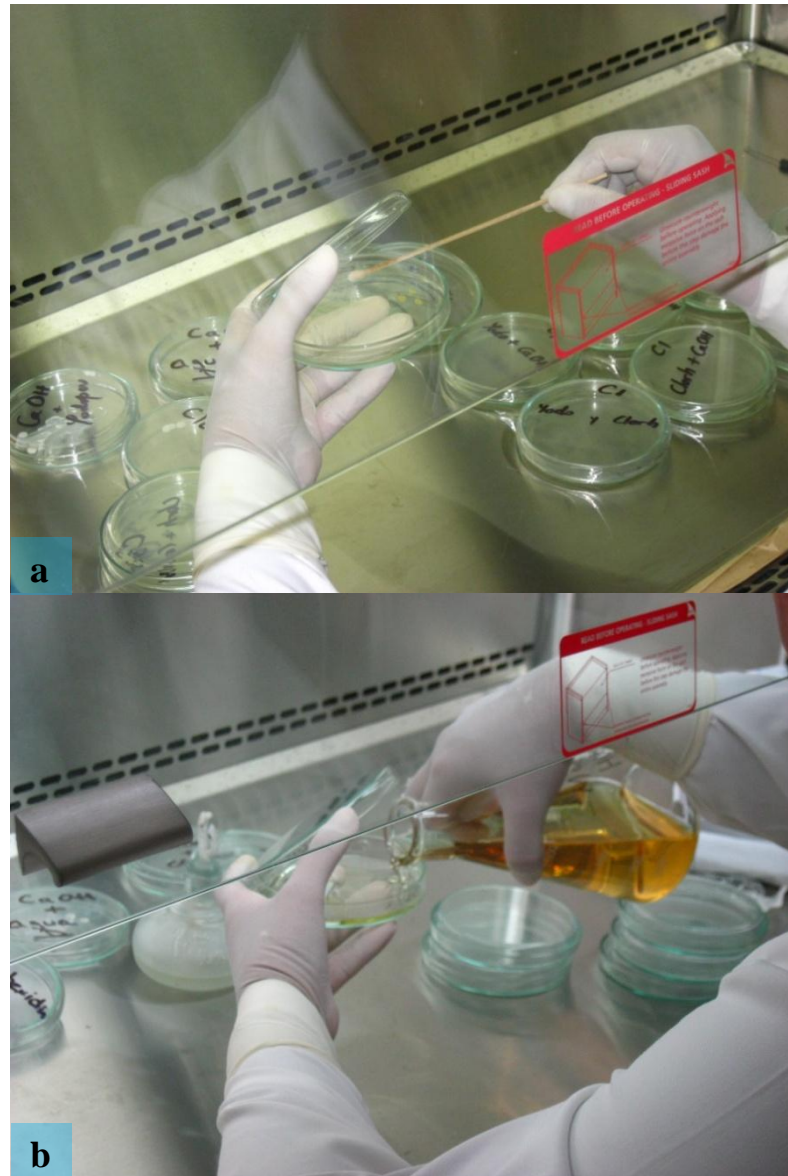


Fig. 7. a, b: Inoculación del *E. faecalis* en las placas Petri a emplear.

Anexo 4

Preparación de las pastas medicamentosas y de los discos embebidos en ellas

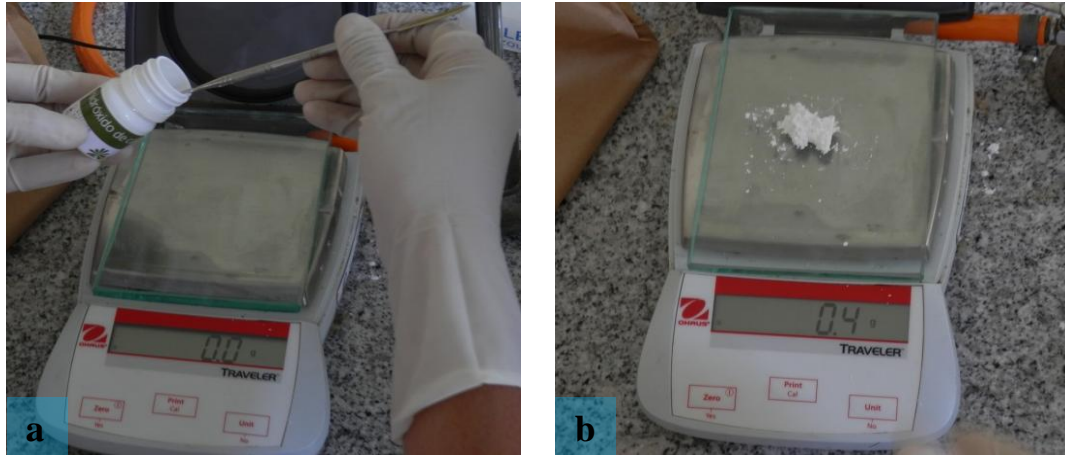


Fig. 8. a, b: Dosificación del hidróxido de calcio puro a través de una balanza analítica.

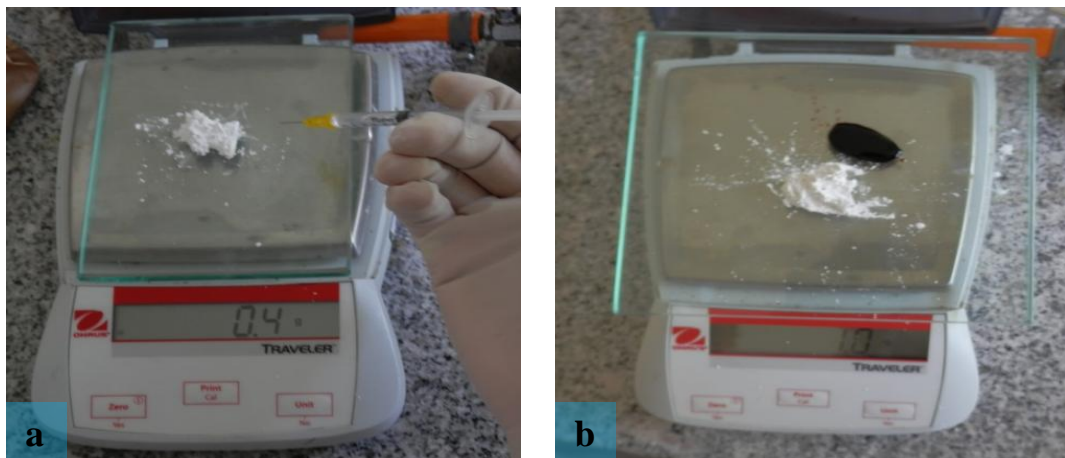


Fig. 9. a, b: Dosificación del vehículo mediante una jeringa de tuberculina.

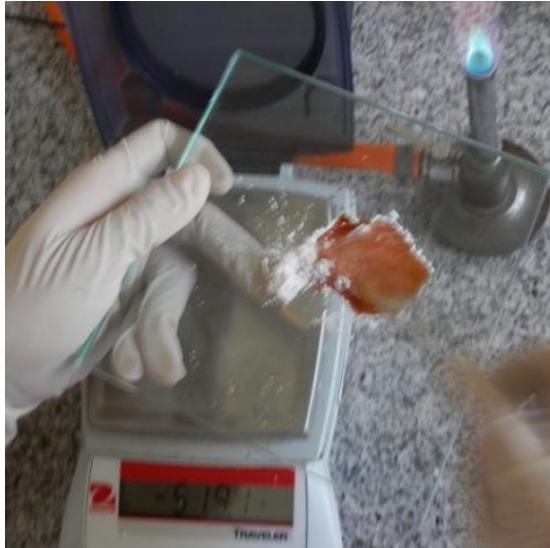


Fig. 10. Mezcla del hidróxido de calcio y del vehículo para la obtención de la pasta medicamentosa.

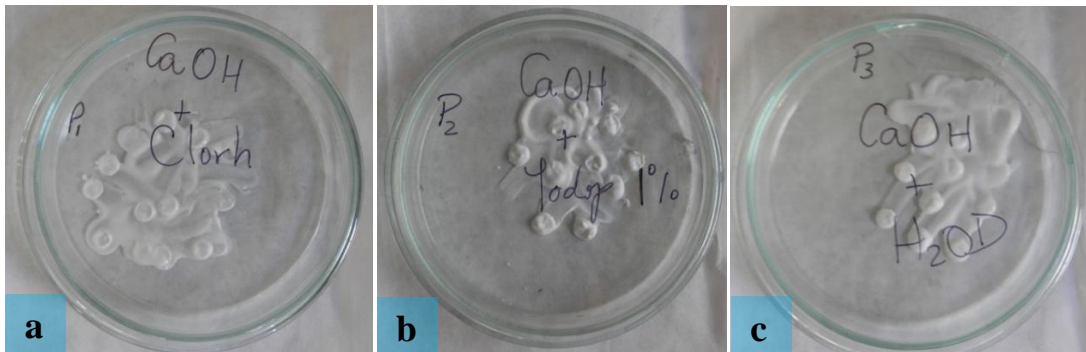


Fig. 11. a, b, c: Discos de papel filtro embebidos en cada una de las pastas medicamentosas preparadas.

Anexo 5

Distribución de los discos embebidos en las pastas medicamentosas en las placas Petri

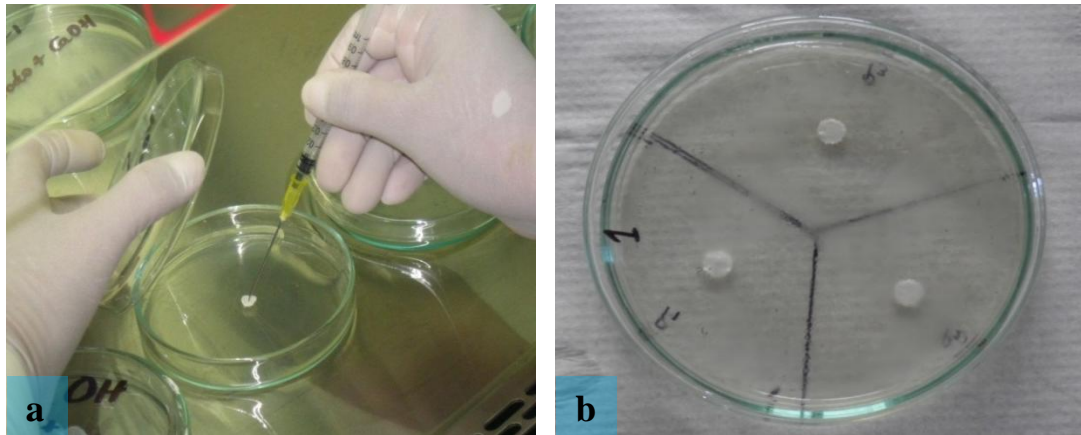


Fig. 12. a, b: Distribución de los discos embebidos en las pastas medicamentosas de forma aleatoria, en las placas Petri que contienen la bacteria *E. faecalis*.

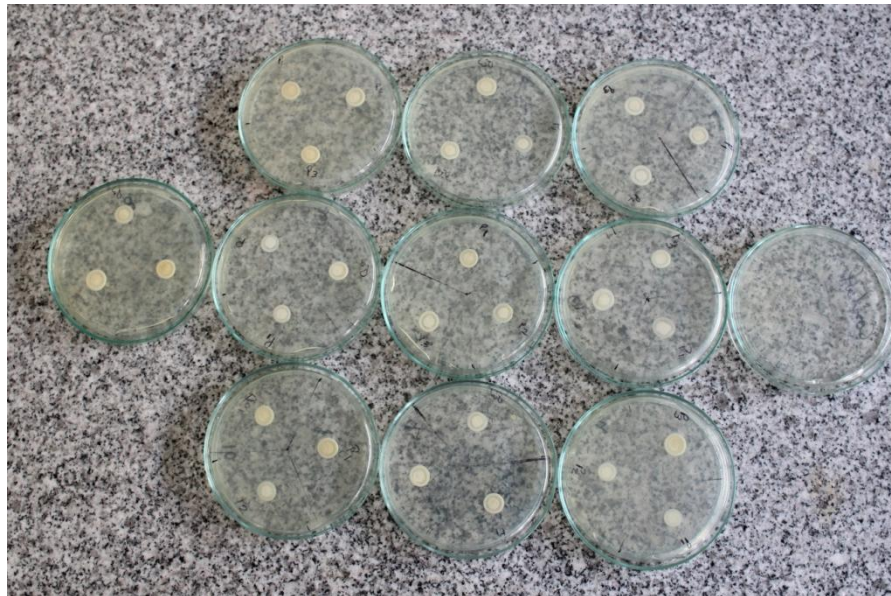


Fig. 13. Vista general de todas las placas Petri empleadas en el estudio con los discos ya distribuidos. Nótese la placa sin discos que corresponde al control negativo.

Anexo 6

Medición de los halos de inhibición



Fig. 14. Observación de los halos de inhibición producidos por las tres pastas medicamentosas en una de las placas Petri.



Fig. 15. Observación en detalle del halo de inhibición formado por una pasta medicamentosa de hidróxido de calcio con clorhexidina 2% a las 24 horas.

Anexo 7

Ficha de recolección de datos

I. DATOS

CEPA: *Enterococcus faecalis*

Ca(OH)₂ + clorhexidina 2% (P1)

Placa Petri	24 HORAS	48 HORAS	7 DÍAS	14 DÍAS
P1 ₁	16 mm	16 mm	16 mm	16 mm
P1 ₂	16 mm	16 mm	16 mm	16 mm
P1 ₃	16 mm	16 mm	16 mm	16 mm
P1 ₄	15 mm	15 mm	16 mm	16 mm
P1 ₅	17 mm	19 mm	19 mm	19 mm
P1 ₆	15 mm	16 mm	16 mm	16 mm
P1 ₇	18 mm	18 mm	18 mm	18 mm
P1 ₈	15 mm	18 mm	19 mm	19 mm
P1 ₉	13 mm	13 mm	14 mm	15 mm
P1 ₁₀	14 mm	14 mm	15 mm	15 mm

Ca(OH)₂ + yodopovidona 1% (P2)

Placa Petri	24 HORAS	48 HORAS	7 DÍAS	14 DÍAS
P2 ₁	12 mm	15 mm	15 mm	15 mm
P2 ₂	11 mm	11 mm	11 mm	11 mm
P2 ₃	14 mm	15 mm	15 mm	15 mm
P2 ₄	11 mm	11 mm	11 mm	11 mm
P2 ₅	13 mm	13 mm	13 mm	13 mm
P2 ₆	15 mm	16 mm	16 mm	16 mm
P2 ₇	11 mm	11 mm	11 mm	11 mm
P2 ₈	13 mm	13 mm	13 mm	13 mm
P2 ₉	14 mm	14 mm	14 mm	14 mm
P2 ₁₀	11 mm	11 mm	11 mm	11 mm

Ca(OH)₂ + agua destilada (P3)

Placa Petri	24 HORAS	48 HORAS	7 DÍAS	14 DÍAS
P3₁	11 mm	13 mm	13 mm	13 mm
P3₂	11 mm	11 mm	11 mm	11 mm
P3₃	11 mm	11 mm	11 mm	12 mm
P3₄	11 mm	11 mm	12 mm	12 mm
P3₅	11 mm	12 mm	12 mm	12 mm
P3₆	11 mm	11 mm	11 mm	11 mm
P3₇	11 mm	11 mm	11 mm	11 mm
P3₈	11 mm	13 mm	15 mm	15 mm
P3₉	11 mm	11 mm	11 mm	11 mm
P3₁₀	11 mm	11mm	11 mm	11 mm

P1₁: Pasta de Ca(OH)₂ + clorhexidina al 2% en placa Petri # 1.

P1₂: Pasta de Ca(OH)₂ + clorhexidina al 2% en placa Petri # 2.

P2₁: Pasta de Ca(OH)₂ + yodopovidona al 1% en placa Petri # 1.

P2₂: Pasta de Ca(OH)₂ + yodopovidona al 1% en placa Petri # 2.

P3₁: Pasta de Ca(OH)₂ + agua destilada en placa Petri # 1.

P3₂: Pasta de Ca(OH)₂ + agua destilada en placa Petri # 2