

Efectividad antibacteriana de tres sustancias irrigantes sobre células planctónicas de *Enterococcus faecalis* in vitro.

Andrés Callejas¹, Carolina Del Rio², Estefani Ospina², Lina Salazar³, Rafael Fernández¹.

Resumen.

El propósito de este estudio es evaluar la efectividad antibacteriana de tres sustancias irrigantes, sobre células planctónicas *E. faecalis* in vitro y establecer un protocolo de irrigación, se utilizó la bacteria *E. faecalis*, cepa de referencia ATCC 29212 Y *E. faecalis*, aislado en el Laboratorio de Microbiología Oral del Instituto Colombiano de Medicina Tropical (ICMT; Sabaneta, Antioquia – Colombia) mediante el método dilución neutralización en determinados intervalos de tiempo. Se encontró que el NaOCl en concentraciones del 1.3% y 5.25%, y la clorhexidina al 2%, fueron los únicos irrigantes que mostraron producir una ausencia completa de crecimiento de la cepa de referencia y el aislado de *E. faecalis* en todos los tiempo de contacto evaluado, La clorhexidina al 0.2% produjo una ausencia de crecimiento bacteriano sólo después de 5 minutos de contacto con la cepa ATCC 29212, y después de 10 minutos con el aislado de *E. faecalis* Colombiano. Finalmente la acción del benzirín verde y el benzirín forte en contacto con la cepa de referencia y el aislado de *E. faecalis* pudo observarse que fue efectiva a partir de los 5 min. En conclusión podemos afirmar que aunque el hipoclorito de sodio y la clorhexidina al 2% fueron las sustancias desinfectantes mas efectivas, la bencidamina aunque se mostró efectiva después de cinco minutos se convierte en una alternativa en la irrigación de conductos ya que demostró ser efectiva contra ésta bacteria. Se debe tener cuidado con la extrapolación de estos resultados ya que esta evaluación se hizo por contacto directo y las condiciones clínicas que se presentan en el interior del conducto radicular son completamente diferentes a las condiciones in vitro.

Palabras clave: Antimicrobial activity , Sodium hypochlorite, Chlorhexidine, Benzidamine, *Enterococcus faecalis*.

INTRODUCCIÓN.

la invasión bacteriana del sistema de conductos radiculares desencadena el inicio de patología pulpar y su extensión a los tejidos periapicales, hecho que genera un proceso inflamatorio que busca prevenir la diseminación microbiana dentro del hueso alveolar, así la evidencia científica confirma que estos microorganismos y sus productos son determinantes para el desarrollo de la enfermedad¹⁻⁵

Hay una serie de especies bacterianas implicadas en este proceso dinámico de la enfermedad pulpar y periapical entre los cuales, cocos gram positivos y bacilos gram negativos constituyen la población mas predominante en las infecciones endodónticas. Dichas bacterias se adaptan al hábitat que le propicia el sistema de conductos radiculares, mediante la adopción de uno de dos fenotipos: el fenotipo planctónico, constituido por las bacterias que transcurren libremente y que van en la búsqueda de nuevas superficies para ser colonizadas, y el fenotipo sésil,

permite instaurarse de manera definitiva a este ambiente.⁶

De esta manera, los microorganismos cualquiera que sea su forma fenotípica, poseen la capacidad de entrar o colonizar zonas inaccesibles dentro del del conducto radicular que representa un reto para su eliminación mediante los procesos de instrumentación mecánica y química⁷. De acuerdo a esto uno de los principales patógenos involucrado con la formación de biopelículas endodónticas es el *Enterococcus faecalis*, bacteria anaerobia gram positiva facultativa considerada como un habitante normal de la cavidad oral. Sedgley evaluó mediante técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y técnicas de cultivo, su prevalencia en muestras de lengua, surco gingival y conductos radiculares de pacientes que serian sometidos a tratamiento endodóntico. Sus resultados mostraron una mayor presencia de *E. faecalis* en la lengua con un 43%, en surco gingival en un 14% y conducto radicular en un 10%⁸. Este microorganismo ha sido relacionado con infecciones endodónticas primarias e infecciones persistentes. En el caso de las infecciones endodónticas primarias, se ha encontrado que la prevalencia de esta bacteria es del 4 al 40%, en lesiones periapicales crónicas asintomáticas en un porcentaje mayor que en las lesiones agudas⁹ y en lesiones persistentes su prevalencia es nueve veces mayor que en las infecciones endodónticas

1-Endodoncista Universidad CES

2- Estudiantes de pregrado Universidad CES

3- Microbióloga CMA, MSc en Biotecnología U Nal.

en el cual la bacteria desarrolla comunidades tipo biopelícula que le

primarias, con un porcentaje entre 24 al 77% de los casos¹⁰⁻¹⁴.

Estos microorganismos tienen la capacidad de adquirir resistencia frente a diferentes sustancias biocidas como los antisépticos empleados de manera convencional, a manera de irrigantes, en los procedimientos de limpieza y desinfección de los conductos. Parte de la resistencia frente a dichas sustancias, se debe a la adopción del fenotipo sésil, situación que genera que sean de dos a 1000 veces más resistentes⁶.

Si la anterior situación se suma a que una de las consideraciones esenciales para predecir el éxito, a largo término, de un tratamiento endodóntico es la eliminación completa de la microbiota que se encuentra instaurada dentro del sistema de conductos radiculares, podemos deducir que el protocolo de desinfección de dicho sistema constituye uno de los pasos determinantes en el trabajo endodóntico. Algunas de las sustancias empleadas para tal fin son el hipoclorito de sodio, el digluconato de clorhexidina y el ácido etileno-diamino tetracético (EDTA) al 17% como coadyuvantes en el proceso de desinfección, finalmente la benzidamina que es una sustancia que ha sido utilizada como enjuague bucal ya que ha demostrado su efecto antiinflamatorio debido a que inhibe la actividad de los mediadores químicos de la inflamación además de su efecto anestésico, antimicrobiano y antifúngico in Vitro, pero no existe mucha información acerca de su uso como irrigante para conductos y su eficacia contra *Enterococcus faecalis*¹⁵⁻²⁰. De acuerdo a esto en la actualidad existe una gran diversidad de protocolos que tienen como objetivos la disolución del tejido pulpar inflamado o necrótico y la erradicación de los microorganismos que pueden estar presentes en el conducto radicular. Sin embargo, los estudios que han evaluado las propiedades antimicrobianas de los diferentes irrigantes, han empleado diversas metodologías, muchas de las cuales no han sido estandarizadas a nivel internacional, como es el caso de la técnica de dilución-neutralización, lo que hace que no exista un acuerdo acerca de cuáles son las sustancias irrigantes con mayor actividad antimicrobiana y cómo deben ser incluidas en un protocolo

El propósito de este estudio es evaluar la efectividad antibacteriana de tres sustancias irrigantes, sobre células planctónicas *E. faecalis* de una cepa de referencia ATCC 29212 y un aislado de un paciente colombiano in vitro.

MATERIALES Y METODOS.

Cepas bacterianas

Se emplearon 2 cepas bacterianas, la *E. faecalis*, cepa de referencia ATCC 29212 y *E. faecalis*, aislado en el Laboratorio de Microbiología Oral del Instituto Colombiano de Medicina Tropical (ICMT; Sabaneta, Antioquia – Colombia) e identificado utilizando el panel para bacterias gram positivas de MicroScan® (Siemens Healthcare Diagnostics, Inc.; Deerfield, Illinois - USA).

El aislamiento, fue seleccionado a partir de una colección de bacterias obtenidas de pacientes que consultaron la Sección de Endodoncia de la Clínica Odontológica de la Universidad CES (Sabaneta, Antioquia – Colombia); los cuales fueron diagnosticados con infección endodóntica refractaria y aceptaron participar de la investigación firmando el consentimiento informado aprobado por los Comités Técnicos y de Ética de la Universidad CES y el ICMT.

El mayor grado de patogenicidad del aislamiento, frente al resto de aislamientos obtenidos, fue el criterio de selección empleado. Dicho criterio, se basó en el perfil de sensibilidad frente a los antibióticos penicilina, eritromicina, tetraciclina, rifampicina, cloranfenicol, vancomicina y ciprofloxacina –cuya determinación se realizó por el método de difusión en disco, según Kirby Bauer-; y en la detección de factores de virulencia tales como hemolisinas y proteasas

Condiciones de mantenimiento y cultivo

Tanto la cepa como el aislamiento, fueron mantenidos a -80°C en viales de Cryobank™ (COPAN Diagnostic Inc., Murrieta, California – USA). Posteriormente, y antes de su empleo para cualquiera de los ensayos, las bacterias fueron descongeladas y repicadas. Inicialmente, en caldo Trypticase Soya (CTS; Sigma), e incubadas a 37°C durante

cuatro a seis horas bajo condiciones aeróbicas; luego, fueron subcultivadas en cajas biplaca con agar sangre de carnero y Enterococcosel™ (BBL™; Franklin Lakes, New York - USA) e incubadas a 37°C durante 18 a 24 horas en atmósfera aeróbica.

Adicionalmente, se establecieron curvas de crecimiento para cada una de las bacterias, tal y como lo describe Radcliffe y col²², con el objetivo de determinar en qué momento se daba inicio a la fase de crecimiento estacionario –en CTS incubado a 37°C bajo condiciones aeróbicas y sin agitación-, y poder comparar de un modo más representativo –en una segunda fase del estudio- el comportamiento de las células planctónicas frente a sus contrapartes sésiles. Esto, ya que los microorganismos en comunidades tipo biopelícula –microorganismos en su fenotipo sésil-metabólicamente se comportan como si estuvieran en fase estacionaria. La biopelícula, además, es el tipo de comunidad que el *E. faecalis* establece al interior del sistema de conductos.

Tal ensayo –datos no mostrados-, determinó que la fase de crecimiento estacionario para ambas bacterias, y bajo las condiciones antes descritas, ocurría después de las 10 horas de incubación.

Soluciones irritantes

Se empleó una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl; Clorox, Tecnoquímicas, Cali - Colombia) al 1.3 y 5.25%, solución de digluconato de clorhexidina (CHX; Laboratorios Farpag, Santa Fe de Bogotá - Colombia) al 0.2 y al 2%, clorhidrato de bencidamina (Benzirin verde y Benzirin Forte; Tecnoquímica, Cali – Colombia) al 0.15 y 0.30%, solución salina isotónica [0.85%] (SSI) (Control negativo), cada una a tiempos de contacto con las células planctónicas de *E. faecalis* a 30 segundos, 60 segundos, 150 segundos (dos minutos y medio) 300 segundos (cinco minutos) 600 segundos (10 minutos) 900 segundos (15 minutos) 1800 segundos (30 minutos).

Valoración de la efectividad antibacteriana de las soluciones irrigantes en células planctónicas

Para valorar la efectividad de las soluciones irrigantes, las cuales poseen efecto antiséptico y para las cuales existe un agente neutralizante, se determinó la concentración mínima bactericida (CMB), mediante la técnica de dilución neutralización, de acuerdo con la norma AFNOR NF T 72-150 (AFNOR, 1995. Citado por Álvarez, Rodríguez y Gálvez, 2001⁶⁶.

La CMB, es la mínima concentración de antiséptico ensayada capaz de reducir, en cinco unidades logarítmicas, una suspensión de bacterias durante cinco minutos de tiempo de contacto, a 20°C⁶⁶. En este punto es importante aclarar que, adicionalmente a los cinco minutos, se evaluaron otros tiempos de contacto – anteriormente descritos- con propósitos comparativos.

Preparación de las suspensiones de células planctónicas

De acuerdo con las técnicas normalizadas (AFNOR, 1997; AFNOR, 1995. Citado por Álvarez, Rodríguez y Gálvez, 2001), para el método de dilución neutralización se parte de una suspensión de bacterias –en su fenotipo planctónico- que contenga entre 1×10^8 y 2×10^8 UFC/mL. Por esta razón, se empleó una suspensión de *E. faecalis* que correspondía a la escala 0.5 de McFarland y que equivale a 1.5×10^8 UFC/mL. Adicionalmente, las células bacterianas fueron obtenidas en su fase de crecimiento estacionario, con el objetivo de compararlas –en una fase posterior del estudio- con sus contrapartes sésiles, como se mencionó anteriormente.

La suspensión bacteriana, se obtuvo de un cultivo puro de la cepa o aislamiento, a partir del repique de una colonia pura obtenida en medio Enterococcosel™, e incubada en CTS a 37°C bajo condiciones aeróbicas, durante al menos 10 horas. La concentración de las bacterias en las suspensiones, fue ajustada a la escala 0.5 de McFarland mediante la adición de CTS, y fue corroborada espectro fotométricamente a 625nm, evidenciando densidades ópticas entre 0.08 y 0.1. También se verificó la pureza de las suspensiones, mediante repique en agar sangre y realizando la observación macroscópica y tinción de Gram de cada una de las morfologías de colonia obtenidas.

Ensayo de validación del neutralizante

Para valorar la efectividad antibacteriana de cada una de las soluciones irrigantes, se determinó la CMB mediante la técnica de dilución neutralización, como ya fue mencionado. Para ello, se empleó el caldo neutralizante D/E (Difco™) como solución neutralizante, el cual fue evaluado con cada una de las soluciones irrigantes a evaluar, con el objetivo de verificar que éste no tuviera ningún efecto deletéreo sobre la bacteria y corroborar que ejerciera, de manera eficaz, su actividad neutralizante sobre el irrigante.

En el ensayo de validación, tanto para el neutralizante como para la cepa o aislamiento bacteriano, se prepararon dos tubos: el primero, contenía 1.5mL de solución salina isotónica estéril; el segundo, 1.5mL del irrigante a la quinta concentración de la máxima del ensayo. Posteriormente, a cada uno de los tubos se adicionó 1.5mL de la solución neutralizante al doble de la concentración. Luego, los tubos se agitaron por inversión y se incubaron a 20°C, durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, a cada tubo se adicionó 100µl de la suspensión bacteriana (1.5×10^{-3} UFC/mL), para luego ser agitados e incubados a 20°C, durante 5 minutos.

A continuación, de cada tubo se tomó una alícuota de 1mL para ser sembrada en agar tripticosa soya (ATS, Merck; Darmstadt - Alemania), mediante la técnica de siembra en profundidad; procedimiento que se realizó por duplicado, en dos ensayos independientes. La incubación, se efectuó a 37°C durante 24 a 48 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se determinó el número promedio de UFC/mL, tanto para la solución salina isotónica como para la solución del irrigante. Para verificar la efectividad de la solución neutralizante, se requirió que al menos un 50% de las los diferentes intervalos de tiempo descritos en la metodología y en tres replicas.

Sólo el NaOCl en concentraciones del 1.3% y 5.25%, y la clorhexidina al 2%, fueron los únicos irrigantes que mostraron producir una ausencia completa de crecimiento de la cepa de referencia y el aislado de *E. faecalis*, que fue observado desde el primer tiempo de evaluación a los 30 segundos. La clorhexidina al 0.2%

células bacterianas se hayan visto protegidas de la acción del irrigante – datos no mostrados-.

Ensayo de la efectividad de la solución irrigante

Se prepararon tubos con 3.6mL de cada una de las concentraciones de las soluciones irrigantes; luego, a cada uno de los tubos se les añadió 400µl de la suspensión bacteriana 1.5×10^{-8} UFC/mL. A continuación, se agitaron e incubaron a 20°C, durante los diferentes tiempos de contacto a evaluar.

Transcurridos los tiempos, se tomaron 400µl de cada tubo y se añadieron a un tubo con 3.6mL de la solución neutralizante a concentración simple. Posteriormente, se agitaron e incubaron a 20°C, durante 10 minutos. A continuación, se tomaron de cada uno de estos tubos alícuotas de 1mL y se repicaron en ATS, por duplicado, mediante la técnica de siembra en profundidad. La incubación, se realizó a 37°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se determinó el número promedio de UFC/mL. Para que la concentración del irrigante (i) fuera considerada bactericida, se tuvo que producir una reducción logarítmica mayor a cinco en el número de UFC/mL.

RESULTADOS.

La acción de cada solución irrigante frente a la cepa de referencia ATCC 29212 y el aislado de *E. faecalis*, fueron expresados en términos de unidades formadoras de colonias (UFC), teniendo en cuenta las categorías: **ausencia de crecimiento** cuando el recuento del UCF fue igual a cero, **crecimiento bajo** cuando el recuento estuvo entre 1-300 y **crecimiento alto** cuando el recuento estuvo mayor a 300. Cada irrigante fue evaluado en

produjo una ausencia de crecimiento bacteriano sólo después de 5 minutos de contacto con la cepa ATCC 29212, y después de 10 minutos con el aislado de *E-faecalis* Colombiano. Finalmente la acción del benzirin verde y el benzirin forte en contacto con la cepa de referencia y el aislado de *E-faecalis* pudo observarse que fue efectiva a partir de los 5 min, cuando los cultivos mostraron una ausencia total de crecimiento.

Los resultados expresados en términos de porcentaje mostraron un 100% de efectividad para el NaOCl al 1.3%, 5.25% y la clorhexidina al 2% independiente de los tiempos de exposición y en todas las replicas con ausencia de crecimiento bacteriano cuando estuvieron en contacto con la cepa de referencia ATCC 29212 y el aislado de *E-faecalis*, porcentajes más bajos de efectividad antimicrobiana fueron observados con la clorhexidina al 0.2% con 57.1% para la cepa de referencia y 42.9% para el aislado mostraron ausencia completa de crecimiento, 14.3% y 28.6% de las muestras se encontró que hubo crecimiento bajo para ambos microorganismos respectivamente. En cuanto a el benzirín verde y benzirín forte se observó que 57.1% de las muestras generaron ausencia de crecimiento bacteriano tanto para la cepa de referencia como para el aislado y 28.6% crecimiento bajo también para ambos microorganismos,

DISCUSION.

El microorganismo usado en este estudio fue la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y el aislado de un paciente con infección refractaria Colombiano, el cual fue escogido por presentar características de alta virulencia y resistencia ante medicamentos antibióticos respecto de otros aislados evaluados. Se trabajó con esta bacteria ya que es uno de los patógenos que mas se presenta en infecciones secundarias y persistentes a nivel endodóntico y una de las mas resistentes al tratamiento, lo que hace relevante su utilización en este estudio. Las sustancias antimicrobianas empleadas en este estudio fueron el NaOCl en concentraciones del 1.3% y 5.25%, la clorhexidina al 0.2% y 2% y la bencidamina al 0.15% y 0.33%. Como bien se sabe el NaOCl ha sido por excelencia la sustancia irrigante mas empleada en la desinfección de conductos radiculares por su capacidad antibacteriana^{21,24-29}, se pudo comprobar en este estudio claramente que el hipoclorito de sodio en ambas concentraciones 1.3%, 5.25% al igual que la clorhexidina al 2% en contacto directo con la cepa de referencia y el aislado, fueron ampliamente efectivas desde el primer tiempo de contacto mostrando una reducción completa de crecimiento. Hallazgos similares han sido reportados por Óncag y col³⁰, donde compararon los efectos antibacterianos de varios irrigantes, entre ellos la clorhexidina al 2% y el

NaOCl al 5.25%, en ese estudio se observó ausencia de crecimiento del *E-faecalis in Vitro* al utilizar estas sustancias. Sassone y col evaluaron varias concentraciones de hipoclorito y clorhexidina con y sin adición de carga orgánica obteniendo como resultado que el crecimiento del *E-faecalis* fue negativo en su totalidad solo para concentraciones de clorhexidina al 1% e hipoclorito al 5% inmediatamente y a los 5 minutos de aplicada la solución, solo porcentajes menores en cuanto a concentración de clorhexidina fueron efectivos después de 15 minutos de contacto con o sin carga orgánica³¹. En este estudio también se evidenció que la clorhexidina al 0.2% fue menos efectiva que la otra concentración al 2% y que solo en tiempos de contacto mayores fue igual de efectiva, como lo confirma el anterior estudio. Estrela y col en su estudio evaluaron la capacidad del hipoclorito de sodio y la clorhexidina ambos a concentración del 2%, sobre 5 especies de microorganismos entre ellos el *Enterococcus faecalis* y concluyeron que la clorhexidina al 2% y el NaOCl al 2% mediante este método de contacto directo y difusión en agar, si poseían efecto antibacteriano sobre estos microorganismos, mostrando ausencia de crecimiento en todos los intervalos de tiempo evaluados (5 min, 10min, 15 min) con ausencia de crecimiento³².

El Hidrocloruro de benzidamina ha sido estudiado y reportado ampliamente para el uso en irritaciones orofaríngeas, ya que se ha demostrado que inhibe la producción de mediadores inflamatorios como las prostaglandinas y las citoquinas¹⁶, también se ha reportado su efecto sobre microorganismos en cavidad oral, aunque su mecanismo de acción sobre los microorganismos aun no es muy claro^{33,34}. Su uso en endodoncia como irrigante de conductos no ha sido aun reportado. Los resultados de este estudio mostraron una efectividad de la benzidamina solo después de 5 minutos de contacto, esto podría suponer que su uso en endodoncia depende mas del tiempo de contacto y no tanto de la concentración, lo que supone una desventaja frente al hipoclorito y la clorhexidina al 2%, además no tiene la capacidad de diluir el tejido orgánico como si la tiene el hipoclorito de sodio.

Este estudio demostró que el hipoclorito de sodio al 1.3% y 5.25% tuvo una efectividad del 100% en ambas concentraciones, lo

que confirma que sigue siendo el irrigante mas efectivo contra esta bacteria, la clorhexidina al 2% también fue efectiva en un 100%, sustentando que esta concentración posee un efecto antibacteriano alto siendo comparable al del hipoclorito, esto tanto para la cepa de *E-faecalis* ATCC 29212 y el aislado colombiano. La clorhexidina al 0.2% solo tuvo una efectividad del 57.1% para generar conteos de cero UFC Para el *E-faecalis* ATCC 29212 y para el aislado colombiano fue de solo de 42.9%, sin embargo los porcentajes que se obtuvieron cuando se presentó un crecimiento bajo, 14.3% y 28.6% respetivamente, también marcan que esta sustancia a pesar de ese pequeño crecimiento que se presento en el ensayo, es efectiva , ya que la efectividad la estamos tomando si el irrigante o la sustancia biocida es capaz de reducir en 5 unidades logarítmicas el conteo bacteriano, que en este caso estuvo entre 1 y 300 UFC, lo que confirma que en todo caso si hubo efectividad no tanto en términos de tiempo si no de reducción bacteriana. Para el benzirín verde y forte el comportamiento fue similar, ya que solo 57.1% de efectividad se presentó para esta sustancia en lograr reducir a cero UFC el conteo para ambos microorganismos y solo 28.6% de las muestras mostraron crecimiento bajo también para ambos microorganismos.

En conclusión, podemos afirmar que aunque el hipoclorito de sodio y la clorhexidina al 2% fueron las sustancias desinfectantes mas efectivas, es importante tener en cuenta que los resultados de este estudio se hallaron por contacto directo del agente desinfectante y las bacterias; otras situaciones de mayor complejidad se pueden encontrar dentro del conducto, donde el microorganismo puede alojarse en .zonas de difícil acceso para el irrigante o inclusive en la presencia de biopelícula donde el microorganismo es difícil de erradicar. El hipoclorito y la clorhexidina al 2% siguen siendo unas de las sustancias mas efectivas contra el *E-faecalis*, en el proceso de desinfección de conductos radiculares. La clorhexidina al 2% es mas efectiva en términos de tiempo que concentraciones mas bajas de las mismas, la benzidamina se convierte en una alternativa en la irrigación de conductos ya que demostró ser efectiva contra ésta bacteria, pero mas estudios son necesarios para determinar el mecanismo de acción por la cual la benzidamina tiene efectos

antibacterianos. También es importante tener en cuenta, que la interpretación de los resultados de este estudio, debe ser de forma cuidadosa ya que la extrapolación de estudios *in vitro* a la clínica no siempre reúne las mismas características y en caso de emplear los resultados en la práctica debe realizarse con mucho cuidado.

AGRADECIMIENTOS.

Agradecemos al Instituto de Medicina Tropical y a la Universidad CES por el apoyo prestado a esta investigación.

REFERENCIAS.

1. Möller AJR, Fabricius L, Dahlén G, Öhman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. Scand J Dent Res 1981;89: 475-84.
2. Bergenholtz G. Pathogenic mechanisms in pulpal disease. J Endod 1990; 16: 98-101.
3. Marsh, P. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. Journal of Clinical Periodontology, 32 (Suplemento 6), 2005,7-15.
4. Donlan, R and Costerton, W.. Biofilms: Survival mechanism of clinically relevant microorganisms. Clinical microbiology Reviews, 2002 Vol.15 N°2, 167 – 193.
5. Fabricius L, Dahlén G, Öhman AE, Möller AJR Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canal after varied times of closure. Scandinavian Journal of Dental Research(1982) 90, 134-44.
6. Costerton JW, Stewart PS Biofilms and device-related infections. In: Nataro PJ, Balsler MJ, Cunningham-Rundels S, eds. Persistent Bacterial Infections. Washington, DC: AS Press, pp. 2000, 423-39.
7. Nair PNR Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. Journal of Endodontics (1987) 13, 29-39.
8. Sedgley CM, Buck G, Appelbe O Prevalence of Enterococcus faecalis at Multiple Oral Sites in Endodontic Patients Using Culture and PCR. Journal of Endodontics (2006) 32, 104-109
9. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled

- teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998;31:1–7.
10. Rôças IN, Siqueira JF, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004;30:315–20.
 11. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* (1998) 85,86–93.
 12. Peciulienė V, Reynaud AH, Balcioniene I, Haapasalo M Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J* (2001) 34:429–34.
 13. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza Filho FJ Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* (2003 a) 36:1–11.
 14. Siqueira JF, Rôças I Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* (2004) 97,85–94.
 15. Turnbull, R. S. Benzylamine hydrochloride (tantum) in the management of oral inflammatory conditions. *Journal of Canadian Dental Association* (1995) 61, 127–134.
 16. Fanaki, N. H. & El Nakeeb, M. A. Antimicrobial activity of benzylamine, a non-steroid anti-inflammatory agent. *Journal of Chemotherapy* (1992) 4, 347–352.
 17. Pina-Vaz, C., Rodrigues, A. G., Sansonetti, F., Martinez-De-Oliveira, J., Fonseca, A. F. & Mardh, P. A. Antifungal activity of local anesthetics against *Candida* species. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* (2000) 8, 124–137.
 18. Matthews, R. W., Scully, C. M., Levers, B. G. & Hislop, W. S. Clinical evaluation of benzylamine, chlorhexidine, and placebo mouth washes in the management of recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* (1987) 63, 189–191
 19. Sardella, A., Uglietti, D., Demarosi, F., Lodi, G., Bez, C. & Carrassi, A. Benzylamine hydrochloride oral rinses in management of burning mouth syndrome. A clinical trial. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* (1999) 88, 683–686.
 20. Passali, D., Volonte, M., Passali, G. C., Damiani, V. & Bellussi, L. Efficacy and safety of ketoprofen lysine salt mouthwash versus benzylamine hydrochloride mouthwash in acute pharyngeal inflammation: a randomized, single-blind study. *Clinical Therapeutics* (2001) 23, 1508–1518.
 21. Siqueira JF Jr, Machado AG, Silveira RM, Lopez HP, de Uzeda M. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with tree irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal in vitro. *International Endodontic Journal* (1997) 30, 279–82.
 22. Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, Hababbeh N, Qualtrough A, Worthington H, Drucker DB, antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal* 37, 438–446. (2004).
 23. Álvarez A, Espigares E y Gálvez R. Valoración de desinfectantes. Método de dilución-neutralización. *Hig. San. Amb.*, 2001; 1:1-7.
 24. Gomes BPFA, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB Souza-Filho FJ *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine digluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal* (2001) 34, 424-8.
 25. Vianna ME, Gomes BPFA, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ *in vitro* evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral radiology and Endodontics* (2004) 97, 79-84.
 26. Heiling I, Chandler NP Antimicrobial effect of irrigant combination within dentinal tubules. *International Endodontic Journal* (1998) 31, 8-14.
 27. Greenstein G, Berman C, Jaffin R Chlorhexidine adjunct to periodontal therapy. *Journal of Periodontology* (1986) 57, 370-6.
 28. Jeansane M, White R. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *Journal of Endodontics* (1994) 20, 276-8.
 29. Lekshmy DS, Kamath PM. Antimicrobial efficacy of 0.2% and 2% Chlorhexidine and sodium hypochlorite as root canal irrigants: An in-vivo study. *Endodontology* (2001) 13,57-62.

30. Önçag O, Hoşgör M, Hilmioğlu S, Zekioğlu O, Eronat C, Burhanoglu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *International Endodontic Journal* 36, 423-432, 2003.
31. Sassone LM, Fidel R, Fidel S, Vieira M, Hirata R Jr. The influence of organic load on the antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine *in vitro*. *International Endodontic Journal* 36, 848-852, 2003.
32. Estrela C, Ribeiro RG, Estrela C. RA, Pecora JD, Sousa Neto MD. Antimicrobial Effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Braz dent J* 2003 14(1): 58-62 Wilson M, Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. *Journal of Medical Microbiology* 1996, 44, 79-87.
33. Escribano Paton C, Ruiz Martinez L, Montaña Puig F, Ruiz España N. Actividad antibacteriana de la benzidamina HCL. *RODE* 2003 vol 8 (3) 287-292.
34. Monder T, Yucel-Lindberg T. Benzylamine reduces prostaglandin production in human gingival fibroblast challenged with interleukin-1 β or tumor necrosis factor α . *Acta Odontol Scand* 1999;57;40-5.