

Estudio in Vitro para Conocer la Resistencia del Enterococo Faecalis ante Tres Vehiculos Distintos Combinados con Hidroxido de Calcio Como Medicamento Intraconducto

L.O. Jesús O. Bautista Gutiérrez
Socorro Maribel Liñán Fernández, PhD
Elsa Gabriela Valero Vélez, PhD
Claudia Adriana Rivera Albarrán, PhD
Aidé Terán Alcocer, PhD
María Carlota García Gutiérrez, PhD

Facultad de Medicina,
Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México

[Doi: 10.19044/esipreprint.11.2023.p91](https://doi.org/10.19044/esipreprint.11.2023.p91)

Approved: 02 November 2023

Posted: 05 November 2023

Copyright 2023 Author(s)

Under Creative Commons CC-BY 4.0

OPEN ACCESS

Cite As:

Bautista Gutiérrez L.O.J.O., Liñán Fernández S.M., Valero Vélez E.G., Rivera Albarrán C.A., Terán Alcocer A. & García Gutiérrez M.C. (2023). *Estudio in Vitro para Conocer la Resistencia del Enterococo Faecalis ante Tres Vehiculos Distintos Combinados con Hidroxido de Calcio Como Medicamento Intraconducto*. ESI Preprints.

<https://doi.org/10.19044/esipreprint.11.2023.p91>

Resumen

Introducción: Los vehículos de los medicamentos intraconductos, desempeñan un gran papel en el tratamiento endodóntico, poseen la capacidad de regular el efecto antimicrobiano en el conducto radicular
Objetivo: Analizar la sensibilidad *in vitro* del *Enterococcus faecalis* ante tres vehículos distintos combinados con hidróxido de calcio como medicamento intraconducto. **Material y métodos:** El diseño del presente estudio fue experimental *In vitro*. Se utilizaron cajas Petri, cada una de ellas con cultivo de Enterococo faecalis. En cada caja, se colocaron 5 discos de papel, cada uno de ellos embebidos en sustancias distintas; el primero fue embebido en la mezcla de hidróxido de calcio con hipoclorito de sodio, el segundo en hidróxido de calcio con propilenglicol, el tercero en hidróxido de calcio con solución fisiológica, y como controles la solución fisiológica (Control negativo) y la clorhexidina (control positivo), esto se llevó a cabo en 11 repeticiones. Todas las muestras se introdujeron a una incubadora a 36°C por

24 horas. Después se midieron los halos de inhibición mediante el programa Image-J. Se realizó una base de datos y posteriormente las tablas y gráficas para su análisis. Resultados: Se realizó la comparación de los halos de inhibición del hidróxido de calcio con hipoclorito de sodio, hidróxido de calcio con propilenglicol e hidróxido de calcio con solución fisiológica contra el *Enterococcus faecalis* en donde la combinación del hidróxido de calcio con hipoclorito de sodio resultó ser la más eficaz. Estos resultados fueron comparados con el grupo de clorhexidina (control positivo) encontrándose como resultado el valor de $p < 0.0001$, lo que comprueba que es estadísticamente significativo. Conclusiones: La clorhexidina es el medicamento intraconducto y el vehículo de elección para combatir el *Enterococcus faecalis*, no obstante, la mezcla de hipoclorito de sodio con hidróxido de calcio, también mostró poseer una capacidad inhibitoria del *Enterococcus faecalis*.

Palabras clave: Medicamento intraconducto, *Enterococcus faecalis*, vehículo, Hidróxido de calcio, Propilenglicol, Hipoclorito de sodio

In Vitro Study to Know the Resistance of *Enterococcus Faecalis* to Three Different Vehicles Combined with Calcium Hydroxide as and Intraduct Medication

L.O. Jesús O. Bautista Gutiérrez

Socorro Maribel Liñán Fernández, PhD

Elsa Gabriela Valero Vélez, PhD

Claudia Adriana Rivera Albarrán, PhD

Aidé Terán Alcocer, PhD

María Carlota García Gutiérrez, PhD

Facultad de Medicina,

Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México

Abstract

Introduction: Intracanal medication vehicles play a great role in endodontic treatment, they have the ability to regulate the microbial effect the root canal. Objective: To know the *in vitro* resistance of *Enterococcus faecalis* to three different vehicles combined with calcium hydroxide as intracanal medication. Material and methods: The design of the present study was experimental *in vitro*. Petri dishes were used, each one with a culture of *Enterococcus faecalis*. In each box, 5 paper discs were placed, each one embedded in different substances; the first was embedded in the mixture of

calcium hydroxide with sodium hypochlorite, the second in calcium hydroxide with propylene glycol, the third in calcium hydroxide with physiological solution, and as controls the physiological solution (Negative Control) and chlorhexidine (control positive), this was carried out in 11 repetitions. All samples were placed in an incubator at 36°C for 24 hours. The inhibition halos were then measured using the Image-J program. A database was made and later the tables and graphs for analysis. Results: The inhibition halos of calcium hydroxide with sodium hypochlorite, calcium hydroxide with propylene glycol and calcium hydroxide with physiological solution against *Enterococcus faecalis* were compared, where the combination of calcium hydroxide with sodium hypochlorite turned out to be the more effective. These results were compared with the chlorhexidine group (positive control), finding as a result the value of $p < 0.0001$, which proves that it is statistically significant. Conclusions: Chlorhexidine is the intracanal medication and the vehicle of choice to combat *Enterococcus faecalis*, however, the mixture of sodium hypochlorite with calcium hydroxide also showed a destructive capacity for *Enterococcus faecalis*.

Keywords: Intracanal medication, *Enterococcus Faecalis*, vehicle, Calcium hydroxide, Propylene glycol, Sodium hypochlorite

Introduction

En un diente sano, la pulpa se encuentra aislada del medio bucal y por lo tanto de manera estéril, sin embargo, al estar presente una patología pulpar, y al quedar expuesta, se infectará la pulpa, alojando gran cantidad de microorganismos, que al realizar un tratamiento de conductos se deben eliminar para lograr que esas bacterias no causen ninguna enfermedad periapical (Chong, 1992).

La eliminación de agentes patógenos y microorganismos, así como evitar la reinfección del conducto radicular, se consideran los dos principales objetivos a realizar en un tratamiento de conductos. Esto a causa de la anatomía variada de los conductos accesorios del conducto radicular, la gran adaptación y sobrevivencia de los microorganismos ante agentes causantes de su muerte (Siqueira 1997, Balvedi 2010).

El tratamiento químico-mecánico del conducto radicular, se considera lo más importante para lograr el control y eliminación de los microorganismos y sus productos. Es por ello que se han creado diferentes medicamentos para uso intraconducto, con el fin de lograr la eliminación bacteriana y reducir al mínimo una complicación endodóntica posterior (Behnen, 2001, Mohammadi 2011, Sukawat 2002).

Existen bacterias muy resistentes que se alojan en los tubulillos dentinarios, conducto radicular y el periápice, por lo que estas bacterias se

hospedan, crecen, se alimentan y multiplican, lo que genera múltiples patologías e incluso el fracaso del tratamiento endodóntico. Es por ello, que los medicamentos intraconducto entre citas, no deben ser descartados, para así eliminar de forma permanente la proliferación bacteriana. (Estrela 2006, de Almeida 2006, Cruz 2002).

Enterococo faecalis

Generalmente los Enterococos, pueden estar presentes en la microbiota del tracto gastrointestinal, tracto genitourinario y en la cavidad oral. Sin embargo, en condiciones de disbiosis, algunas especies, como el *Enterococcus faecalis*, pueden ser causantes de la periodontitis, infección del conducto radicular y abscesos periapicales. (Rôças, 2004).

Hidróxido de calcio

El hidróxido de Calcio, fue introducido a la odontología cerca de los años 1920-1930 por Hermann, y desde su inicio se ha indicado como un material altamente indicado para tratar los procesos patológicos en que se requiera promover la cicatrización y curación deseada (Siqueira, 1996).

Es desde entonces considerado uno de los medicamentos para uso intraconducto más eficaz, pues logra deposición de los tejidos duros y la curación de la pulpa y los tejidos periapicales cuando se encuentran vitales, y cuando la pulpa ha sido retirada, se considera un excelente apósito temporal para realizar el tratamiento de conductos, pues posee un efecto antimicrobiano (Siqueira 1996, Siqueira 1997).

El hidróxido de calcio, proviene de una roca caliza de forma natural, formada principalmente de carbonato de calcio (CaCO_3), se forma al cristalizarse dicho compuesto, su presentación es un polvo blanco, inodoro y cuyo peso molecular es de 74.08. Posee baja solubilidad en agua y un PH de 12.5-12.8, por lo que se considera muy eficaz para realizar el control de exudados, detener la reabsorción radicular e inducir el cierre apical, aun cuando éste se coloque por un periodo corto de tiempo y posteriormente debe ser completamente eliminado para evitar una reinfección (Siqueira 1996, Siqueira 1998, Mohammaddi 2012, Kim 2002).

El hidróxido de calcio, se considera como el material ideal para el tratamiento de conductos para dientes diagnosticados con periodontitis apical, ya que los iones hidroxilo, deberían actuar de forma directa en la pulpa, para lograr la difusión hacia la dentina y generar los cambios del ambiente en la porción radicular y lograr así la reducción bacteriana, esto dependiendo de la disponibilidad de iones de calcio e hidroxilo y el vehículo utilizado (Fava 1999, Estrela 2001, Turk 2009)

Se ha demostrado que el hidróxido de calcio aparte de sus propiedades y características ya descritas, Adicionalmente, se ha propuesto

que tiene un gran impacto en los mediadores de inflamación, en las interleucinas, principalmente la IL-1, factor de necrosis tumoral (TNF) y el péptido de la calcitonina (CGRP), aunque no se ha determinado la forma correcta de acción (Khan, 2008).

Vehículos para uso intraconducto

Los vehículos dentro de las pastas colocadas de forma intraconducto, desempeñan un gran papel en el éxito del tratamiento y de forma general, ya que mejora las propiedades del medicamento intraconducto (Siqueira 1997).

Los vehículos e irrigantes del conducto radicular, deben tener características, tales como causar la eliminación bacteriana, no ser tóxico para los tejidos, y por último que logre la disolución de los tejidos orgánicos remanentes del conducto radicular, con el fin de lograr la limpieza de forma adecuada y evitar la reinfección (Safavi, 2000).

Vehículos acuosos

Las mezclas o apósitos que son preparados con vehículos acuosos se consideran uno de los métodos más prácticos para su preparación con el hidróxido de calcio (Siqueira 1996).

Vehículos viscosos

Existe una variedad de vehículos a base de aceite los más comunes son Aceite de oliva, ácidos grasos, Paraclorofenol alcanforado y Eugenol (Siqueira, 1996).

La glicerina, se considera uno de los principales vehículos viscosos, ya que posee varias características para ser un vehículo, es una sustancia incolora, olor característico, higroscópico y con un sabor dulce. Permite mezclarse con distintas sustancias como acetona, agua, alcohol (Siqueira, 1996).

Propilenglicol

El propilenglicol (1,2- propanodiol), se considera un alcohol dihidrico, por lo que lo hace una buena elección para el tratamiento endodóntico, posee una fórmula química $C_3H_7(OH)_2$, cuyo peso molecular es de 76,09. El propilenglicol, es un vehículo incoloro, sabor dulce y olor ligero acre, el propilenglicol posee una toxicidad baja y se han realizado experimentos con animales y no han demostrado ningún tipo de efectos adversos (Pacios, 2004).

Solución fisiológica

La solución fisiológica produce desbridamiento y una excelente lubricación del conducto radicular, sin embargo, ésta no produce ningún tipo

de modificación o destrucción bacteriana o tisular, por lo que se considera débil para realizar limpieza y desinfección de los conductos (Leonardo, 2005).

Hipoclorito de sodio

Las infecciones dentales, provenientes de la pulpa dental y por consiguiente el conducto radicular, pueden producir patologías en la superficie periapical, por lo que se trata de evitar la aparición de cualquier alteración, debiendo así, eliminar por completo los restos de tejido pulpar y las bacterias que se habían alojado en el interior del diente a tratar (Byström 1983, Bystrom 1985).

El hipoclorito de sodio en concentraciones desde 0.5% a 6% se considera un irrigante eficaz para la práctica odontológica, pues tiene la capacidad de destruir materia orgánica, así como magnesio y carbonato, dando así su característica antimicrobiana, sin embargo, puede presentar como efecto secundario el deterioro de la dentina (Basrani 2007, Duarte 2009).

Se ha demostrado que el hipoclorito de sodio en un cambio de concentración (1 a 6%), mejoró la acción del químico, logrando una mayor penetración y por lo tanto una mejor acción antibacteriana, sin embargo, la eliminación completa de los tubulillos dentinarios no se logra de forma total, por lo que se indica la colocación de medicamentos intraconducto, sobre todo cuando hay presencia de abscesos periapicales (Giardino 2017, Senia 1971).

La desnaturalización e hidrolización de proteínas se debe a la acción de las bases fuertes, por lo que contribuye a la descomposición de los restos de tejido pulpar, por lo que, para obtener mejores efectos de este tipo, se ha demostrado que el hidróxido de calcio, en conjunto con el hipoclorito de sodio ha mejorado sus resultados de forma positiva (Hasselgren, 1988).

Materiales y metodos

Se realizó un estudio con diseño experimental *In vitro*.

Se llevó a cabo la esterilización del instrumental y discos de papel a 121° C por 30 minutos, se preparó el medio de cultivo (Agar Cerebro-Corazón) según las especificaciones del fabricante. La mezcla antes descrita se colocó en un matraz, y éste en el plato caliente (Con movimiento), se evitó que alcanzara la ebullición.

Se colocó la mezcla (tapada) dentro del autoclave por 10 minutos, evitado que sobrepase los 126° C, ya finalizado este proceso se permitió que la mezcla alcanzara la temperatura ambiente, para posteriormente colocar la mezcla en las 11 cajas Petri y permitir la gelificación.

Ya que el medio de cultivo se encontró gelificado, se realizó la siembra del *Enterococcus faecalis*, por lo que se abrió el frasco de la bacteria (Permanecer cerca de la flama de fuego, para evitar la contaminación), se introdujo un hisopo estéril en el frasco y embeberlo de la solución para realizar el sembrado en la caja Petri (Asegurándonos de tocar toda la superficie), se taparon las cajas Petri.

Ya que se realizó la siembra de la bacteria, se cerró el frasco, flameando la tapa ligeramente. Se taparon las cajas Petri y fueron marcadas con el número de muestra y la posición para cada disco de papel.

Se pesó 1 gramo de hidróxido de calcio en 3 tantos, se midieron 25 microlitros, de cada vehículo (Solución fisiológica, hipoclorito de sodio y propilenglicol)

Se mezcló el hidróxido de calcio y el hipoclorito, previamente medidos y pesados, dónde se sumergieron 11 discos de papel, esto en una loseta de vidrio estéril (se realiza este paso con los 3 vehículos distintos y los dos controles).

Se colocaron los discos de papel previamente sumergidos en las distintas mezclas y en los controles, según lo rotulado en las cajas Petri, así para las 11 repeticiones.

Ya que fueron colocados todos los discos se cerraron las cajas Petri y fueron puestas en una bolsa de plástico y rotuladas. Fueron introducidas en una incubadora a 36° C por 24 horas. Para posteriormente obtener los resultados y la toma de fotografías.



- 1.-Hidróxido de calcio + solución fisiológica
- 2.- Hidróxido de calcio + Hipoclorito de sodio
- 3.- Hidróxido de calcio + Propilenglicol
- 4.- Solución fisiológica (Control negativo)
5. – Clorhexidina (Control positivo)

Se realizó la medición del halo de inhibición con el programa Image-J (Obteniendo la medida del diámetro del área de inhibición, con previa calibración de la escala para obtener los resultados en milímetros), Se realizó una hoja de recolección de datos en Word (Windows 10), para colocar las medidas obtenidas. Se crearon las tablas de cada uno de los resultados con su

respectivo gráfico, para poder plasmar los resultados obtenidos. (Windows 10) y finalmente se realizó el estudio estadístico.

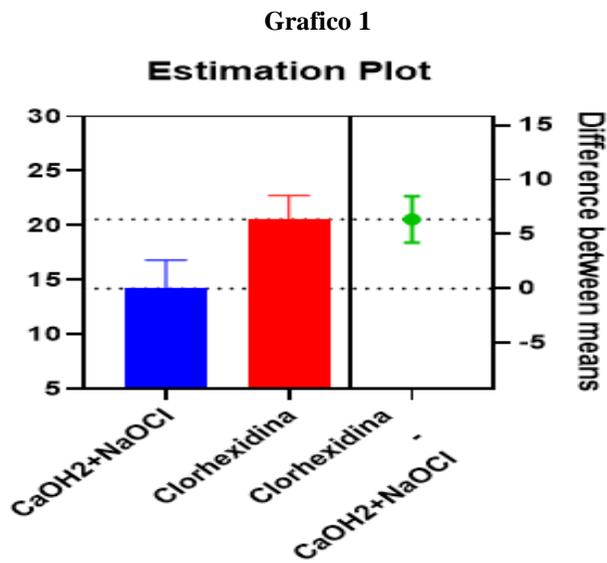
Resultados

Se realizó la comparación de los halos de inhibición obtenidos del hidróxido de calcio con hipoclorito de sodio, hidróxido de calcio con propilenglicol e hidróxido de calcio combinado con solución fisiológica, contra el *Enterococcus faecalis* para así conocer cuál de ellos produce mayor grado de inhibición bacteriana.

Tabla 1. Comparacion de valores obtenidos en halo de inhibition entre hidroxido de calsio con hipoclorito de sodio vs clorhexidina				
Valor de p		CaOH ₂ + NaOCl		Clorhexidina
X +/- D.E. (Rango)				
HALO INHIBICION	DE	14.19 +/- 2.612 (9.44 - 19.08)	20.54 +/- 2.174 (16.72 - 25.20)	< 0.0001
X: Media de población, D.E.: desviación estándar. Prueba t de student				

FUENTE: hoja de recolección de datos

Como resultado se obtuvo que el hidróxido de calcio combinado con hipoclorito de sodio resulto ser el medicamento más eficaz, el hidróxido de calcio combinado con propilenglicol y solución fisiológica no mostraron ningún tipo de inhibición bacteriana, éstos resultados de igual manera fueron comparados con los dos grupos control clorhexidina y solución fisiológica (Grupo positivo y negativo respectivamente). Como resultado estadístico se encuentra el valor de $p = < 0.0001$, lo que comprueba que el resultado es estadísticamente significativo.



FUENTE: hoja de recolección de datos

Discusion

En este estudio experimental, se comparó la eficacia del hidróxido de calcio como medicamento intraconducto, mezclado con vehículos distintos para poder valorar cuál es el que mejor funciona para combatir al *Enterococcus faecalis* en un tratamiento de conductos.

Como lo mencionaba Behnen (2001), el éxito del tratamiento endodóntico, radica en el correcto tratamiento del conducto radicular de forma química y mecánica, esto con la finalidad de lograr la muerte y desinfección de los microorganismos que habitan en el conducto y que son responsables de la patología pulpar y periapical.

Se analiza la postura del Dr. Siqueira, donde especifica que el hidróxido de calcio funciona de forma óptima, aún en un corto periodo de tiempo, en el presente estudio se utilizó hidróxido de calcio en combinación con vehículos, en zonas infectadas por el *Enterococcus faecalis*, dejándose actuar por 24 horas, obteniendo la presencia de un halo de inhibición, es por ello que se coincide con el criterio del Dr. Siqueira, ya que aún en un corto periodo de exposición del hidróxido de calcio con su vehículo pueden generar la muerte y destrucción de los microorganismos, en éste caso del *Enterococcus faecalis*.

El propilenglicol se consideraba como uno de los principales vehículos para colocación en el conducto radicular, ya que posee un alto

poder germicida, sin embargo, bajo las condiciones *in vitro* de este estudio no hubo ningún halo de inhibición en ninguna de las siembras (Pacios, 2004). Esto puede deberse a que el propilenglicol no posee ningún efecto antimicrobiano.

Pacios (2004) menciona que el uso de la solución fisiológica en el tratamiento de conductos proporciona una correcta consistencia de la mezcla, ya que posee una alta tensión superficial y viscosidad, lo que la hace una mezcla adecuada para poder ser manejada y colocada en el conducto radicular, pues la fluidez que proporciona, puede incluso llegar a penetrar en los tubulillos dentinarios o en zonas de difícil acceso de forma mecánica, por lo que su efecto positivo sería de forma química, obteniéndose un resultado favorable, sin embargo en este estudio el hidróxido de calcio en solución fisiológica no tuvo ningún efecto bactericida.

El hipoclorito de sodio es un excelente antimicrobiano y solvente de tejidos orgánicos ya que se forma el ácido hipocloroso cuando éste entra en contacto con partículas orgánicas, generando así la destrucción de éstas. Las concentraciones de este vehículo varían y deben ser correctamente seleccionadas, ya que, si se opta por la utilización de concentraciones elevadas, se considera tóxico y puede llegar a lesionar a los tejidos circundantes, y por lo contrario la utilización del hipoclorito de sodio en concentraciones menores, se consideran ineficaces para la destrucción bacteriana y la disolución orgánica (Basrani, 2007).

En el método experimental llevado a cabo en la presente investigación, se tomó en cuenta lo expresado por el Dr. Giardino y se utilizó el hidróxido de calcio en combinación con el hipoclorito de sodio a la concentración de 5.25%, donde obtuvieron resultados favorables, pues se logró la inhibición bacteriana de *Enterococcus faecalis* previamente sembrados, lo que indica que hay una adecuada sinergia entre el hipoclorito de sodio y el hidróxido de calcio para atacar a las bacterias presentes en el conducto radicular.

La clorhexidina es una buena opción para la colocación como medicamento intraconducto, pues es capaz de lograr la eliminación del *Enterococcus faecalis*, debido a su excelente propiedad física, la cual es la sustantividad, ésta consiste en la absorción del compuesto para posteriormente dar una lenta liberación (Paquette, 2007).

De Almeida (2006), aportó que la clorhexidina debería ser considerada como la mejor opción para lograr la eliminación de bacterias del conducto radicular, en específico al *Enterococcus faecalis*, pues logra el objetivo principal de la medicación intraconducto, el cual es reducir o eliminar por completo las bacterias presentes, aun las más resistentes, es por ello que en este estudio se concuerda totalmente con este autor.

Conclusion

El *Enterococcus faecalis*, es una de las bacterias que encontramos con mayor frecuencia en los fracasos endodónticos, es por ello que se deben realizar todas las maniobras y procedimientos requeridos para eliminar estos microorganismos del conducto radicular para garantizar el éxito en los tratamientos de conductos.

La clorhexidina es uno de los medicamentos que mayor inhibición bacteriana logra contra el *Enterococcus faecalis*, por lo que fue utilizado como control positivo, sin embargo, el hipoclorito de sodio en combinación con el hidróxido de calcio demostró ser un vehículo eficaz para la destrucción del *Enterococo faecalis*, pues en todas las repeticiones del método experimental se observó un halo de inhibición bacteriana. Caso contrario con la mezcla de propilenglicol con hidróxido de calcio y la mezcla de solución fisiológica con hidróxido de calcio, pues no mostraron ningún tipo de inhibición bacteriana.

Se recomienda realizar mayor cantidad de estudios de inhibición bacteriana con distintos medicamentos intraconducto, de forma *in vivo* y no solo de forma *in vitro*.

Conflicto de intereses: Los autores no declararon ningún conflicto de intereses.

Disponibilidad de los datos: Todos los datos están incluidos en el contenido del artículo.

Declaración de financiación: Los autores no obtuvieron financiación para esta investigación.

References:

1. Balvedi RPA, Versiani MA, Manna FF, Biffi JCG. A comparison of two techniques for the removal of calcium hydroxide from root canals. *International Endodontic Journal*. 2010 Jun 8;43(9):763–8.
2. Basrani BR, Manek S, Sodhi RNS, Fillery E, Manzur A. Interaction between Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine Gluconate. *Journal of Endodontics*. 2007 Aug;33(8):966–9.
3. Behnen M, West L, Liewehr F, Buxton T, Mcphersoniii J. Antimicrobial Activity of Several Calcium Hydroxide Preparations in Root Canal Dentin. *Journal of Endodontics*. 2001 Dec;27(12):765–7.
4. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*. 1983 Mar;55(3):307–12.

5. Byström A, Sunqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *International Endodontic Journal*. 1985 Jan;18(1):35–40.
6. Chong Bs, Ford Trp. The role of intracanal medication in root canal treatment. *International Endodontic Journal*. 1992 Mar;25(2):97–106.
7. Cruz EV, Kota K, Huque J, Iwaku M, Hoshino E. Penetration of propylene glycol into dentine. *International Endodontic Journal*. 2002 Apr;35(4):330–6.
8. De Almeida G, B. P. F., Vianna, M. E., Sena, N. T., Zaia, A. A., Ferraz, C. C. R., & de Souza Filho, F. J. (2006). *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 102(4), 544-550.
9. Duarte, M. A. H., Midena, R. Z., Zeferino, M. A., Vivan, R. R., Weckwerth, P. H., Dos Santos, F. & Tanomaru-Filho, M. (2009). Evaluation of pH and calcium ion release of calcium hydroxide pastes containing different substances. *Journal of endodontics*, 35(9), 1274-1277.
10. Estrela C, Bammann LL, Pimenta FC, Pécora JD. Control of microorganisms *in vitro* by calcium hydroxide pastes. *International Endodontic Journal*. 2001 Jul;34(5):341–5.
11. Estrela C, Estrela CRA, Decurcio DA, Hollanda ACB, Silva JA. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. *International Endodontic Journal*. 2006 Feb;40(2):85–93.
12. Fava LRG, Saunders WP. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *International Endodontic Journal*. 1999 Jul;32(4):257–82.
13. Giardino L, Cavani F, Generali L. Sodium hypochlorite solution penetration into human dentine: a histochemical evaluation. *International Endodontic Journal*. 2016 Apr 17;50(5):492–8.
14. Hasselgren G, Olsson B, Cvek M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. *Journal of Endodontics*. 1988 Mar;14(3):125–7.
15. Khan AA, Sun X, Hargreaves KM. Effect of Calcium Hydroxide on Proinflammatory Cytokines and Neuropeptides. *Journal of Endodontics*. 2008 Nov;34(11):1360–3.
16. Kim SK, Kim YO. Influence of calcium hydroxide intracanal medication on apical seal. *International Endodontic Journal*. 2002 Jul;35(7):623–8.

17. Mário Roberto Leonardo. Endodoncia : tratamiento de conductos radiculares, principios técnicos y biológicos. Sao Paulo: Artes Médicas Latinoamérica; 2005.
18. Mohammadi Z, Dummer PMH. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *International Endodontic Journal*. 2011 May 2;44(8):697–730.
19. Mohammadi Z, Shalavi S, Yazdizadeh M. Antimicrobial Activity of Calcium Hydroxide in Endodontics: A Review. *Chonnam Medical Journal*. 2012;48(3):133.
20. Pacios MG, de la Casa ML, de los Ángeles Bulacio M, López ME. Influence of different vehicles on the pH of calcium hydroxide pastes. *Journal of Oral Science*. 2004;46(2):107–11.
21. Rocas I, Siqueirajr J, Santos K. Association of *Enterococcus faecalis* With Different Forms of Periradicular Diseases. *Journal of Endodontics*. 2004 May;30(5):
22. Safavi K, Nakayama T. Influence of Mixing Vehicle on Dissociation of Calcium Hydroxide in Solution. *Journal of Endodontics*. 2000 Nov;26(11):649–51.
23. Senia ESteve, Marshall FJames, Rosen S. The solvent action of sodium hypochlorite on pulp tissue of extracted teeth. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*. 1971 Jan;31(1):96–103.
24. Siqueira JF, de Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *Journal of Endodontics*. 1996 Dec;22(12):674–6.
25. Siqueira JF, de Uzeda M. Intracanal medicaments: Evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *Journal of Endodontics*. 1997 Mar;23(3):167–9.
26. Siqueira JF, de Uzeda M. Influence of different vehicles on the antibacterial effects of calcium hydroxide. *Journal of Endodontics*. 1998 Oct;24(10):663–5.
27. Sukawat C, Srisuwan T. A Comparison of the Antimicrobial Efficacy of Three Calcium Hydroxide Formulations on Human Dentin Infected with *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics*. 2002 Feb;28(2):102–4.
28. Turk BT, Sen BH, Ozturk T. *In vitro* antimicrobial activity of calcium hydroxide mixed with different vehicles against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2009 Aug;108(2):297–301.