



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO

**MAESTRÍA EN ESTOMATOLOGÍA
TERMINAL EN ENDODONCIA**

TESIS

Evaluación de la actividad antibacteriana de las nanopartículas de cobre activadas con láser diodo contra *Enterococcus faecalis*

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN ESTOMATOLOGÍA
CON OPCIÓN TERMINAL EN ENDODONCIA**

Presenta:

**DIANA LAURA LARA VÁZQUEZ
221450004**

**Directora de tesis y disciplinaria: D.C. Carolina Sámano Valencia
ID: 100526470**

**Director (a) Metodológico: D.C. Cristian Dionisio Román Méndez
ID: 100392244**

Asesora: M.E. Briseida Rojas Huerta

**Asesor externo: D.C. Bernardino Isaac Cerda Cristerna
Universidad Veracruzana Río Blanco**

**Lector: M.E. Graciela Galán Torres
ID:100426288**

Junio 2023.



BUAP

Oficio No. FESIEP/CIFE/075/2023

C. Diana Laura Lara Vázquez
Alumna de la Maestría en Estomatología
con opción en Terminal en Endodancia
Matrícula No.: 21450004
Facultad de Estomatología
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
PRESENTE

Sirva este medio para enviarle un cordial saludo, asimismo, el que suscribe MQ. Farid Alfonso Dipp Velázquez Secretario de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; por este medio me permito informar a Usted, que, está Secretaría de Posgrado aprueba la impresión de la Tesis titulada:

"Evaluación de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de cobre activadas con láser diodo contra ENTEROCOCCUS FAECALIS".

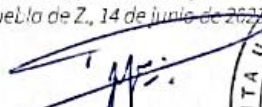
misma que presentará para realizar su examen profesional y obtener el grado de Maestra en Estomatología con opción en Terminal en Endodancia; para su conocimiento y atención correspondiente.

Sin otro particular, reitero a Usted mi más atenta y distinguida consideración.

Atentamente

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z., 14 de junio de 2023


MQ. Farid Alfonso Dipp Velázquez
Secretario de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Estomatología



*Se anexa: Formato de Impresión de Tesis (Original) - p.s.c y a.

*C.e.p. Archivo

*MTRG. FJMA/DR.FADV/jmesth

Facultad
de Estomatología

31 Poniente 1304, Col. Volcanes,
Puebla, Pue. C. P. 72410
01 (222) 229 55 00 Ext. 6400

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA
SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS RECEPCIONAL

Para obtener el Grado de: Maestra en Estomatología con opción terminal en Endodoncia

Registro CIFE: 2021028. Fecha: miércoles 14 de junio del 2023.

Título de la Tesis: "Evaluación de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de cobre activadas con láser diodo contra Enterococcus faecalis."

Nombre del alumno: Diana Laura Lara Vázquez.

Matrícula: 221450004.

Domicilio: Priv. 23 B sur #2309 Int. 5 Col. Centro

Tel: 74*71 40 88 17.

Fecha de ingreso a la Facultad: lunes 06 de enero del 2020.

Firma: 

Director de Tesis: DC. Carolina Sámano Valencia.

Grado académico: Doctora en Ingeniería y Ciencias Materiales.

Adscripción: Facultad de Estomatología.

ID: 100526470

Tel: 44*48 19 18 22

Firma: 

Director Disciplinario: DC. Carolina Sámano Valencia.

Grado académico: Doctora en Ingeniería y Ciencias Materiales.

Adscripción: Facultad de Estomatología.

ID: 100526470

Tel: 44*48 19 18 22

Firma: 

Director Metodológico: DC. Cristian Dionisio Román Méndez. Grado académico: Doctor en Ciencias Químico-Biológicas.

Adscripción: Facultad de Estomatología.

ID: 100392244.

Tel: 22*21 83 83 36.

Firma: 

Lector: ME. Graciela Galán Torres.

Grado académico: Maestría en Endodoncia.

Adscripción: Facultad de Estomatología.

ID: 100426288

Tel: 24*41 50 36 54.

Firma: 

Nombre y firma de aprobación responsable de la Maestría en Estomatología con Opción terminal en Endodoncia

CME. Alejandro Gerardo Martínez Guerrero

Firma: 

La Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología, autoriza la impresión de la Tesis.

MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez



Fecha: miércoles 14 de junio del 2023.

V.- AGRADECIMIENTOS

El llegar a poder escribir unas palabras en este apartado significa culminar una etapa en mi vida la cual, talvez sea la más importante, así mismo esto es un sueño que nunca hubiera sido posible sin la confianza que tuvieron en mí mis maestros.

Gracias a cada uno de los Doctores que me acompañaron cada día de la semana, por qué sin su guía y apoyo esto no se hubiera logrado de forma tan exitosa, un agradecimiento especial al Dr. Alejandro por confiar en mí desde el día uno en mi etapa de pasante, gracias especiales también a la Dra. Briseida, la cual me acompañó en la creación de este proyecto, siempre con los mejores consejos para hacer esto lo mejor posible.

Este proyecto también tiene mucho de la Dra. Carolina y el Dr. Dionicio, gracias por los días en los que estuvieron al pendiente de esto, por las dudas resultas y por el tiempo dedicado, gracias por su gran vocación, amabilidad y paciencia.

Un día, la Dra. Briseida me dijo algo que he tenido presente en todo este tiempo y le agradezco mucho, me dijo: "Puede que en la siguiente generación que te toque encuentres hermanas para toda la vida" y así fue, gracias a Odette, Alma y Tanya por las risas que siempre hacen falta en un momento de estrés, gracias por acompañarme en este camino en el cual nuestro sueño era el mismo.

Este camino no hubiera sido posible ni siquiera soñarlo sin mi familia, gracias especiales a mi mamá, siempre tan incondicional y apapachadora que con ella sé que todo es posible si la tengo a mi lado, gracias a mi papá por darme la fuerza y el carácter que a veces se necesita tener en el posgrado, gracias a mis hermanas Jade, Mari por ser fuente de inspiración, amor y apoyo para mí a pesar de estar lejos, y gracias especiales a mi Dani Lara que me acompañó incondicionalmente día a día en estos dos años siempre haciéndome reír y escuchándome, sin duda esto fue más fácil gracias a ti. Gracias familia por apoyar mis sueños, espero poder devolver un poco de lo mucho que me dan.

Quiero agradecer especialmente a Jorge, el cual fue la mejor tablita salvavidas en este camino, gracias por hacerlo más fácil, por dar tanta paz cuando se necesita, por ayudarme en incontables situaciones, gracias por tanto amor y compañía, ojalá fuera tan buena en esto como lo crees que soy. Gracias por acompañarme en esta etapa a ti, a Nico y a Pepino; mi nueva familia.

Y gracias por último a toda persona que de una forma u otra estuvo aquí o de alguna manera al pendiente de que este proyecto se pudiera lograr.

Gracias a todos, sin ustedes no estaría aquí y este sueño no hubiera podido ser cumplido.

VI.- ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE.....	13
2. INTRODUCCIÓN.....	15
3. ANTECEDENTES.....	16
3.1 ANTECEDENTES GENERALES.....	16
3.1.1 Generalidades de la infección endodóntica	16
3.1.2 Tipos de infección endodóntica.....	16
3.1.3 <i>Enterococcus faecalis</i>	17
3.1.4 Irrigación.....	17
3.1.5 Características del irrigante ideal.....	18
3.1.6 Protocolos actuales de desinfección.....	18
3.1.7 Nanopartículas.....	19
3.1.8 Nanopartículas de cobre.....	20
3.1.9 Láser.....	20

3.1.10 Tipos de láser	20
3.1.11 El láser en endodoncia.....	21
3.1.12 Láser biolase.....	21
3.2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	22
3.2.1 Nanopartículas de cobre.....	22
3.2.2 Láser en endodoncia.....	23
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	27
5. JUSTIFICACIÓN.....	28
6. HIPÓTESIS.....	29
7. OBJETIVOS	29
7.1 OBJETIVO GENERAL.....	29
7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
8.1 DISEÑO DEL ESTUDIO.....	29

8.2 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	29
8.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	30
8.3.1 Criterios de inclusión	30
8.3.2 Criterios de exclusión.....	30
8.3.3 Criterios de eliminación.....	30
8.4 VARIABLES	30
8.5 CONCORDANCIA Y FIABILIDAD	31
8.6 UBICACIÓN ESPACIO-TEMPORAL.....	31
8.7. PROCEDIMIENTOS.....	31
8.7.1 Nanopartículas de cobre.....	31
8.7.2 Cultivo de cepa bacteriana.....	32
8.7.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	32
8.7.4 Grupos experimentales.....	33
8.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	34

9. RESULTADOS.....	35
10.- DISCUSIÓN	38
11. CONCLUSIÓN.....	41
12. BIBLIOGRAFÍA	42

VII.- ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

1. Tabla 1. Variables.....	30
2. Tabla 2. Concentraciones de nanopartículas.....	31
3. Tabla 3. Cantidades para crear diluciones.....	32
4. Tabla 4. Resultados.....	36
5. Tabla 5. Porcentaje de bacterias presentes.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Figura 1. Componentes de láser biolase.....	21
2. Figura 2. Nanopartículas de cobre y etilenglicol.....	31
3. Figura 3. Llenado de esterclaves.....	32
4. Figura 4. Láser diodo biolase.....	33
5. Figura 5. Activación de láser diodo.....	33
6. Figura 6. Concentraciones de nanopartículas.....	35
7. Figura 7. Crecimiento bacteriano.....	35

VIII.- ABREVIATURAS

- **SCR:** Sistema de conductos radiculares
- **NaOCl:** Hipoclorito de sodio
- **EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético
- **CHX:** Clorhexidina
- **PSA:** Paracloroanilina
- **NP:** Nanopartícula
- **ROS:** Especie reactiva de oxígeno
- **RES:** Sistema retículo endotelial
- **LAI:** Irrigación activada por láser
- **PIPS:** Transmisión foto acústica iniciada por fotones
- **CMI:** Concentración mínima inhibitoria
- **SC II:** Sulfato cúprico o de cobre
- **HC:** Hidróxido de calcio
- **DL:** Laser diodo
- **PDT:** Terapia fotodinámica convencional
- **ICG:** Fotosensibilizador verde de indiocianina
- **AgNPs:** Nanopartículas de plata
- **AuNPs:** Nanopartículas de oro
- **ChNPs:** Nanopartículas de quitosano
- **CuNPs:** Nanopartículas de cobre
- **UFC:** Unidades formadoras de colonias
- **MB:** Azul de metileno
- **CLSM:** Microscopia de barrido láser confocal

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS NANOPARTÍCULAS ACTIVADAS CON LÁSER EN ENDODONCIA (FASE 2)

1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

En el tratamiento de conductos radiculares la parte más importante es la desinfección, la cual se logra por medio de irrigantes para tratar de penetrar en las complejidades anatómicas y así obtener un mayor grado de desinfección. Se ha luchado contra el *Enterococcus faecalis* ya que tiende a desarrollar mecanismos de resistencia contra los medicamentos intraconducto y los desinfectantes como el hipoclorito de sodio, por lo cual en la actualidad se sigue en la búsqueda de un irrigante ideal y se ha hablado del uso de alternativas, por ejemplo las nanopartículas metálicas, como las de cobre, que tienen acción bactericida relacionada con su capacidad para dar y aceptar electrones, así como el uso de láser el cual penetra fácilmente en conductos curvos debido a sus fibras flexibles y de pequeño tamaño.

El objetivo de esta investigación fue determinar la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de cobre activadas con láser diodo contra *Enterococcus faecalis*.

En este estudio se propuso crear una solución irrigante con nanopartículas de cobre, la cual se probó a distintas concentraciones (300 µg/ml a 1000 µg/ml).

Se dividieron en 2 grupos: grupo 1 con activación de láser diodo por 30 segundos y grupo 2 sin activación alguna, únicamente las nanopartículas de cobre. En los resultados del presente estudio en ambos grupos se obtuvo la misma capacidad de eliminación de bacterias teniendo una concentración mínima inhibitoria de 700 µg/ml, la cual es alta comparada con el estudio de Seyedeh y cols., en el 2021 en donde, utilizando nanopartículas de plata, se obtuvo una concentración mínima inhibitoria de 400 a 500 µg/ml.

Con base a los resultados obtenidos en este estudio se puede afirmar que las nanopartículas de cobre tienen actividad antimicrobiana contra el *E. Faecalis*, la cual podrá seguir siendo estudiada para llegar a mejores resultados en combinación con el láser, así como lograr una concentración mínima inhibitoria más baja que la obtenida.

Palabras clave: antibacterial, copper nanoparticles, laser, irrigant, endodontics, root canal treatment.

2. INTRODUCCIÓN

Las patologías pulpares y periapicales van acompañadas de una colonización bacteriana que va a afectar el sistema de conductos radiculares (SCR), lo que provoca una inflamación en el área la cual podría ocasionar daños en los tejidos periapicales.

La desinfección del SCR es complicada ya que este cuenta con una anatomía compleja que pudiera alojar diferentes tipos de bacterias dentro de los túbulos dentinarios. Actualmente para la desinfección del SCR se utiliza una preparación mecánica y el uso de algunos irrigantes químicos, pero hay un porcentaje del 35% en el cual el conducto radicular permanece sin cambios después de esta preparación.

Los irrigantes endodónticos no tienen la capacidad para llegar a zonas más profundas dentro de los túbulos dentinarios, de tal forma que no logran eliminar en su mayoría la biopelícula ni hacer que desaparezca la infección intraconducto ya que dichas bacterias son persistentes debido a que cuentan con adhesinas, enzimas y formación de biopelículas, es por esto que se investigan protocolos de desinfección.

Actualmente se ha hablado sobre las nanopartículas de cobre (CuNPs) las cuales podrían ser empleadas favorablemente para la desinfección de los conductos. Las CuNPs tienen la capacidad de dañar la membrana celular de las bacterias y se han investigado como medicación intraconducto y como irrigantes. Se requieren más estudios sobre el uso de las CuNPs durante la desinfección química pero se pueden tomar en cuenta por su gran potencial antimicrobiano, bajo costo y disponibilidad en el mercado.

Por otro lado, la tecnología láser ha ganado campo en endodoncia ya que se ha demostrado que puede penetrar dentro de los túbulos dentinarios y alcanzar microorganismos de difícil acceso, lo que podría ayudar a la desinfección del SCR ya que cuenta con propiedades antibacterianas y costo reducido comparado con otros sistemas láser.

En este estudio se probó el uso de únicamente CuNPs y también en combinación con láser diodo, esto intentando eliminar el *E. Faecalis*, que es el microorganismo que ocasiona las patologías endodónticas persistentes. De igual manera, se evaluaron diferentes concentraciones de CuNPs para arrojar la concentración mínima inhibitoria (CMI) contra *E. Faecalis*.

3. ANTECEDENTES

3.1 ANTECEDENTES GENERALES

3.1.1 Generalidades de la infección endodóntica

La cavidad pulpar es el centro del órgano dentario, se encuentra rodeada por estructuras duras que son el esmalte, la dentina y el cemento y de esta cámara pulpar va a surgir el SCR cuya función es obtener la irrigación necesaria así como la inervación para el desarrollo del órgano dentario (1).

El SCR es complejo debido a que puede existir uniones entre los conductos o dividirse e incluso unirse nuevamente. Entre estas uniones o divisiones podemos encontrar istmos que se van a hallar entre los conductos radiculares que pueden contener restos de tejidos pulpares y lodillo dentinario el cual se debe eliminar correctamente o nos puede llevar a un fracaso en el tratamiento (2).

La pulpa dental sana está apartada del medio ambiente de la cavidad bucal, haciendo que se encuentre en una especie de esterilidad. Cuando suceden lesiones cariosas o traumatismos se crea una vía de acceso para las bacterias hacia la cavidad pulpar y esto conlleva a una inflamación pulpar que a su vez se puede desarrollar en necrosis de los tejidos pulpares; de igual manera la necrosis puede desencadenar periodontitis apical (3).

El tratamiento indicado para la periodontitis apical es el tratamiento de conductos, este consiste en desinfectar y conformar el SCR (4). Es importante la completa eliminación de las bacterias ya que de no ser así, seguirán desarrollando lesiones periapicales (5). Durante la conformación del conducto radicular, este se ensancha para así lograr que el irrigante penetre y se eliminen completamente los residuos que se crearon durante dicha conformación, estos residuos también pueden eliminarse mediante remoción mecánica e irrigación (4)(6).

3.1.2 Tipos de infección endodóntica

Existen infecciones endodónticas primarias, secundarias y persistentes mediadas por la carga bacteriana existente dentro del SCR.

Las infecciones primarias se constituyen en su mayoría por microorganismos anaerobios Gram negativos, aunque también se encuentran hongos y virus. Cuando estos microorganismos comienzan a colonizar y proliferar pueden conducir a una infección aguda o crónica dependiendo del tipo de huesped (7)(8).

En la infección secundaria se van a encontrar microorganismos que colonizan el SCR una vez que el tratamiento de conductos haya terminado, aquí encontraremos mayor presencia de bacterias Gram positivas al igual que anaerobias facultativas y estrictas (9).

La literatura menciona que en fracasos de tratamientos endodónticos se encuentra el 67% de presencia de *E. Faecalis* y en las infecciones endodónticas primarias se encuentra presente en el 18%. (10). Esto demuestra que el *E. Faecalis* es el microorganismo que ocasiona las enfermedades periradiculares (11).

En las infecciones endodónticas terciarias se encuentran microorganismos tanto de la infección primaria como secundaria que han sobrevivido. Esto puede ser ocasionado por su capacidad para sobrevivir como adaptación a las condiciones ambientales, el potencial de óxido reducción y tener un acceso directo al área periapical y ocasionar enfermedades (12).

3.1.3 *Enterococcus faecalis*

El *Enterococcus faecalis* es un coco Gram positivo facultativo, su tamaño va de 0.5 a 0.8 μm , para su crecimiento se necesitan temperaturas de 10 °C a 45 °C, siendo 35 °C la temperatura ideal, esta bacteria puede desarrollarse aún en concentraciones altas de cloruro de sodio (6.5%), de igual forma tiene gran capacidad para sobrevivir en medios con pH ácido y alcalino, siendo necesario un Ph mayor a 11 para su eliminación (13)(14).

Este microorganismo se encuentra en las infecciones primarias de un 20% a un 30% y en infecciones secundarias de un 67 % a un 77 %; su composición genética y morfológica única lo hacen crear una biopelícula muy resistente a distintos antimicrobianos (1).

El *E. Faecalis* se localiza en un porcentaje del 60 al 90 % en dientes con tratamiento de conductos, lo cual lo hace uno de los principales responsables de la patología endodóntica persistente (15). Entre los factores que le otorgan resistencia, se encuentra la ya mencionada biopelícula así como su actividad antimicrobiana y la función de adhesión al colágeno lo que le permite penetrar en los túbulos dentinarios de 250 – 400 μm (14)(16)(17).

3.1.4 Irrigación

Es muy importante el uso de un desinfectante químico durante el tratamiento endodóntico, ya que con la instrumentación se crea lodillo dentinario, el cual penetra en las diferentes irregularidades del conducto radicular y para su eliminación es indispensable el uso de estos desinfectantes químicos tanto para irrigación como para medicación intraconducto entre citas (18).

3.1.5 Características del irrigante ideal

- Tener un espectro antimicrobiano amplio y eficacia elevada contra los diferentes microorganismos.
- Capacidad de disolución de tejidos pulpaes.
- Inactivación de endotoxinas.
- Prevenir la creación de lodillo dentinario.
- No tóxicos.
- No cáusticos en tejidos periapicales.
- No alérgicos (19).

3.1.6 Protocolos actuales de desinfección

El hipoclorito de sodio (NaOCl) se encuentra como el estándar de oro en las soluciones irrigantes del SCR. Entre mayor sea su concentración, mayor efectividad tendrá. Entre sus propiedades se encuentra la capacidad para eliminar bacterias, destruir biopelículas y la disolución del tejido orgánico (18).

En un estudio de Yamada y cols., en 1983, se llegó a la conclusión de que el NaOCl a una concentración de 5.25% no eliminaba el lodillo dentinario aunque el conducto pareciera limpio, para lo que se necesitaba el uso de una solución quelante como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 17%, por lo cual se propuso un protocolo para la desinfección del conducto el cual consta de aplicar 10 ml de EDTA seguido de 10 ml de NaOCl ya que de esta forma se obtiene una desinfección de residuos orgánicos así como inorgánicos (20).

Se ha demostrado que los quelantes eliminan el lodillo dentinario en aproximadamente un minuto. Dejar esta sustancia por más de un minuto comprometerá la dureza de la dentina y su módulo de elasticidad así como debilitar la dentina radicular (19).

El protocolo de irrigación más efectivo fue descrito por Van der Sluis en el 2010, que consta de 3 ciclos de 20 segundos de NaOCl al 5.25% con activación ultrasónica (21).

A pesar de las propiedades antimicrobianas y de disolución del NaOCl, este sigue siendo altamente tóxico, por lo cual se han buscado alternativas como la clorhexidina (CHX) que se recomienda por su conocida acción antimicrobiana y su capacidad de ser absorbida por los tejidos duros del diente y así ser liberada gradualmente, lo cual se denomina sustantividad (5). Se ha evidenciado que el uso de la CHX es efectivo contra *E. Faecalis* ya que está va a causar desintegración celular al entrar en contacto con la superficie de la bacteria, la cual esta cargada negativamente. Dentro de sus desventajas se encuentra que no tiene gran penetración en zonas de difícil acceso, no tiene capacidad de disolver tejidos, y al entrar en contacto con el NaOCl genera una amina aromática tóxica la cual se ha informado que llega a ser cancerígena, la cual se denomina paracloroanilina (PCA) (22)(23).

3.1.7 Nanopartículas

Con la intención de crear nuevos materiales con mejores propiedades se ha creado la nanotecnología, la cual estudia una escala atómica o molecular y sus beneficios potenciales (24). Esta misma tecnología trabaja a dimensiones con nano escala en el ámbito de la medicina y la odontología.

Las nanopartículas (NP) son diminutas partículas de consistencia sólida que llegan a tener un diámetro de 1 a 100 nm. Tienen propiedades físico-químicas, ya que con su tamaño a nano escala proporcionan una mayor reactividad química la cual tiene función antibacteriana (25).

Se sabe que la actividad antibacteriana con la que cuentan las NP se atribuye al tamaño de estas ya que pueden entrar en contacto con las membranas celulares bacterianas al igual que su capacidad de liberar iones metálicos (26).

Tienen la capacidad de entrar en contacto con la membrana de las bacterias debido a su gran área de superficie y la alta densidad de carga, de tal forma que estas NP pueden ser beneficiosas para la eliminación de microorganismos resistentes y la formación de biopelículas (25).

Se ha mencionado el uso de NP tanto de cobre, plata, oro, titanio y zinc de los cuales aún no se descubre por completo el efecto bactericida que generan, por lo cual se describen tres mecanismos por los cuales tienen esta capacidad bactericida (27):

- Generan cambios en la permeabilidad de la membrana, provocando salida de lipopolisacáridos, proteínas y biomoléculas intracelulares, lo que ocasionan al aglomerarse y comenzar un proceso de disolución al entrar en contacto con la membrana plasmática (28).
- Crean especies reactivas de oxígeno (ROS) que generan daños en las estructuras celulares (29).
- Atracción de iones metálicos provenientes de las NP en la membrana celular, seguido por una interrupción de producción de adenosín trifosfato (ATP) la suspensión de replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN) (30).

Es importante mantener el tamaño ideal para el uso de las nanopartículas, el cual debe ser de 10 a 100 nm, ya que, si es menor a esta cantidad, se desecharán más fácilmente y al ser más grandes, serán secuestradas más fácilmente por el sistema retículo endotelial (RES) (31).

3.1.8 Nanopartículas de cobre

Se atribuye la actividad antimicrobiana de las NP metálicas a su capacidad para atraer iones positivos a las membranas celulares, las cuales van a estar cargadas negativamente y esto genera que cambien su estructura celular y la función de su ADN provocando su muerte (32).

En cuanto al cobre, este va a tener un proceso continuo de dar y recibir electrones y este genera un radical hidroxilo que puede ocasionar una reacción perjudicial en macromoléculas celulares como lo podría ser la oxidación de lípidos y proteínas, ocasionando una liberación de radicales hidroxilo tóxicos. De igual forma elimina el hierro en los grupos de hierro-azufre que va a pelear con el zinc en las uniones de las proteínas y esto a su vez destruye membranas y anula la respiración celular (33).

La acción antimicrobiana del cobre no solo se da en microorganismos bacterianos, si no que también se encuentra presente en virus y menormente en hongos (26)(34). Al igual que otras nanopartículas metálicas, las NP de cobre tienen características químicas y antimicrobianas, sumado a esto, el cobre es de menor costo y es más estable química y físicamente (35).

En el 2013 los autores Sierra y cols., establecieron el uso del cobre en la endodoncia, donde se mencionó que el sulfato de cobre tenía actividad antimicrobiana más alta en concentraciones inferiores que la clorhexidina (13)(36).

3.1.9 Láser

El autor Theodore Maiman, en 1960, creó el primer láser de trabajo que emitía un haz de luz color rojo intenso. Un láser es un dispositivo que transforma la luz de varias frecuencias con la capacidad de mover las ondas que son capaces de movilizar el calor y la potencia cuando este se enfocan a corta distancia (37).

Durante los años 70 y 80 se enfocó en otros dispositivos, como el CO₂ y el neodimio YAG (Nd: YAG), que se creía tenían mejor interacción con los tejidos duros. Para la década de los 80s ya se había incorporado su uso a los tejidos blandos para los cirujanos orales. (38). Las longitudes de onda que tiene el láser han sido favorables para la actividad antimicrobiana ya que el calor provocado afecta la estructura de las células bacterianas (39).

3.1.10 Tipos de láser

- Láser de infrarrojo cercano (810 nm a 1340 nm): tiene afinidad por el agua y la hidroxiapatita, aunque es muy baja, la cual tiene como resultado mayor penetración en los túbulos dentinarios.
- Láser de infrarrojo medio (2780 nm y 2940 nm): tiene una mayor absorción por el agua que se encuentra en la dentina, su actividad bactericida es superficial

porque su efecto fototérmico genera ablación de la dentina.

- Láser de dióxido de carbono (10,600 nm): tiene mayor afinidad por la hidroxiapatita, pero también al agua. Su aplicación en endodoncia es limitada (40).

3.1.11 El láser en endodoncia

La tecnología láser aplicada a la endodoncia, investigada inicialmente en 1971, se expandió en la década de 1990 con el desarrollo de sistemas de suministro de fibra óptica. Las nuevas tecnologías como los impulsos de longitud reducida, las puntas de disparo radial y despojado, las técnicas de irrigación activada por láser (LAI) y la transmisión fotoacústica iniciada por fotones (PIPS) han simplificado el uso del láser en endodoncia al tiempo que minimizan los efectos térmicos no deseados en las paredes dentinales (39).

En el 2010 se confirmó el uso de laser infrarrojos cercanos de (940 nm y 980 nm) con una fibra óptica de 200 nm para la activación los irrigantes con diferentes potencias, las cuales era de 4 W a 10 Hz y 2.5 W a 25 Hz, y de esta forma eliminar los restos de tejido y el lodillo dentinario (41).

3.1.12 Láser Biolase

El láser de diodo Epic™ 10 es un láser para uso en odontología. Este cuenta con una consola laser y una pieza de mano, a la cual se le pueden adaptar diferentes tipos de puntas desechables y se activa con un pedal inalámbrico. Dicho laser tiene funciones como la incisión, escisión, vaporización y coagulación de tejidos blandos, así como su uso en la endodoncia en el tratamiento del dolor. (Figura 1) (42).

Figura 1. Componentes de láser biolase

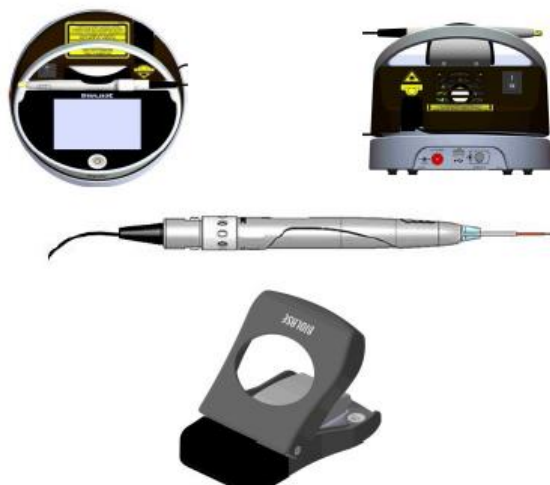


Figura 1. Consola láser, pieza de mano y pedal inalámbrico.
Imagen tomada del manual del usuario de EPIC 10, n.º de pieza 5400321-01, rev. H.

3.2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

3.2.1 Nanopartículas de cobre

En la búsqueda de diferentes métodos para la eliminación de bacterias, tomando en cuenta las actuales investigaciones con nanopartículas, se han llegado a estudiar las nanopartículas de plata, zinc, oro y cobre, entre otras, por su gran capacidad bactericida (43). Esta capacidad se puede atribuir a la interacción de los diferentes tipos de cargas entre el metal y la membrana, las cuales crean cambios en su morfología, ocasionando la muerte bacteriana. Actualmente, de las nanopartículas que se tiene mayor información son de las de zinc y plata (44).

En cuanto al uso del cobre, en el 2011 se estableció que este tiene actividad bactericida debido a que tiene la capacidad de destruir la membrana bacteriana, desnaturalizar el ADN y bloquear la respiración celular (33).

Sierra y cols., en el 2013, determinaron la actividad antimicrobiana del sulfato de cobre (II) o cúprico (SC-II) contra *E. Faecalis*. Utilizaron una técnica de microdilución en caldo triticasa y glicerol al 50%, en el que se determinó la CMI del SC-II y del hidróxido de calcio (HC). La CMI tuvo un resultado para el SC-II de 1,5-12 mM y el HC fue >32 mg/ml. Las diferencias arrojadas en este estudio fueron significativas entre los antimicrobianos que se utilizaron; también se encontró que el SC-II mostró mejor actividad antimicrobiana a bajas concentraciones, aunque superiores a la CHX y menores que al HC (13).

Sánchez – Sanhueza y cols., en el 2015, realizaron un estudio en el cual se tenían 36 conductos radiculares humanos extraídos e infectados con *E. Faecalis*. Para eliminar esta cepa se utilizó sulfato de cobre y los resultados se determinaron por un recuento de placa de *E. Faecalis* que se obtuvo en diferentes tiempos de incubación. En los resultados se encontró un recuento bacteriano disminuido después del cuarto día, lo que reafirma el efecto antimicrobiano del sulfato de cobre (45).

Sánchez – Sanhueza y cols., en el 2016, dieron a conocer en su estudio que las CuNPs serían una buena opción durante el tratamiento de endodoncia como irrigante o como medicación intraconducto. También mencionaron que las CuNPs podían mejorar sus capacidades al combinarse con polímeros para mejorar su biocompatibilidad, aumentar el tiempo de liberación, disminuir la recolonización bacteriana y reducir la biopelícula bacteriana (36)

Galleguillos Morales, en el 2016, probó la efectividad de las CuNPs como medicamento intraconducto. En este estudio se infectaron dientes con *E. Faecalis*, los cuales se medicaron posteriormente con CuNPs en diferentes concentraciones. Para este estudio se utilizó un grupo control que contenía HC y un grupo extra sin medicamento. La medicación intraconducto se dejó en un periodo de 7 – 8 días. Posteriormente se realizó un recuento de UFC. Los resultados muestran que las CuNPs tienen un efecto antimicrobiano de 150

ppm y 300 ppm, lo que es similar a los resultados reportados por el HC. También se menciona que las CuNPs llegan a remover bacterias del SCR y de igual forma alteran su morfología (1).

En el 2018, Mardones y cols., realizaron un estudio para evaluar la actividad de las CuNPs como medicación intraconducto contra el *E. Faecalis* en el cual realizaron una suspensión de CuNPs que contenía ácido ascórbico, almidón y acetato de cobre. Dicha suspensión se calibró hasta tener 1000 µg/ml de CuNPs. Se tenía un grupo experimental y un grupo control cultivados durante 24 horas para observar crecimiento bacteriano y posteriormente obtener un recuento de las UFC. En los resultados obtuvieron que las CuNPs tienen efecto antibacteriano similar al UltraCal XS®. La CMI establecida fue de 150 µg/ml, y la concentración mínima bactericida fue de 225 µg/ml. Las CuNPs no obtienen capacidad antibacteriana dependiente del pH porque entran en la membrana bacteriana y dañan el ADN, lo que ocasiona muerte celular (32).

En el 2016, Han y cols., estudiaron las CuNPs combinadas con láser diodo y determinaron que las CuNPs son una nueva generación de elementos fototérmicos de bajo costo, gran estabilidad y poca citotoxicidad.

Se puede concluir que estas nanoestructuras de CuS tienen una gran área de superficie, muchos poros, gran biocompatibilidad y su excreción del cuerpo vivo es más fácil. Dichas características les confieren su potencial en aplicaciones como agentes fototérmicos y como administradores de medicamentos (46).

3.2.2 Láser en endodoncia

Durante el tratamiento de conductos es importante el uso de irrigantes que ayudan a la eliminación bacteriana y de biopelículas. Para aumentar el efecto de estos irrigantes se ha hablado de la activación con aparatos sónicos, ultrasónicos y láser (47)(48). Estos crean una mayor velocidad de movimiento y flujo que permite llegar a áreas del SCR de difícil acceso con una jeringa de irrigación únicamente (49)(50) lo cual ayuda a reducir la carga bacteriana (51).

Afkhami y cols., en el 2017 hicieron un estudio en el que compararon la eficacia de las nanopartículas de plata (AgNPs), un láser diodo (DL) de 810 nm y la terapia fotodinámica convencional. Se tuvieron 65 dientes unirradiculares extraídos inoculados con *E. Faecalis* durante 4 semanas y que a su vez se dividieron en 4 grupos: el grupo DL: irradiación con DL a 810 nm (1 W, 4 veces durante 10 segundos), el grupo AN: 5 minutos de irrigación con 5 ml de AgNPs (100 ppm), el grupo ICG / DL: PDT convencional con ICG (1 mg / mL) / DL de 810 nm (200 mW, 30 segundos), y el grupo AN / ICG / DL: PDT modificado con AgNPs / ICG / DL de 810 nm (200 mW, 30 segundos). Se realizó un grupo control en el que se usaba una irrigación de 5 ml de NaOCl al 2.5% durante 5 minutos. Se evaluaron las UFC y

se obtuvo que en la terapia fotodinámica convencional con ICG, el láser diodo a 810 nm y las AgNPs tuvieron buenos resultados como complementos para la desinfección del conducto radicular (52).

Kushwaha y cols., en el 2018, realizaron un estudio en el que evaluaron la eficacia antimicrobiana de las AgNPs y las nanopartículas de oro (AuNPs) con láser ND: YAG (L) y sin la activación de éste para eliminar *E. Faecalis*. En este estudio se utilizaron 120 dientes inoculados con *E. Faecalis* en un periodo de 24 horas. Se crearon 4 grupos: en el grupo 1 se encuentran las AgNPs con irrigación de 50 µl de 100 ppm durante 3 minutos, el grupo 2 de AuNPs se irrigó con 50 µl de 100 ppm, en el grupo 3 se encuentran las AgNPs en combinación con el láser YAG con irradiación de potencia de 1.5 W durante 60 segundos al igual que el grupo 4 con las AuNPs en combinación con láser YAG. Se añadió un grupo control que consta de irrigación con CHX al 2% durante 20 minutos. Para los resultados se determinó la UFC en la que la mayor reducción se encontró en la combinación del grupo 3 (53).

En el 2019, Maliszewska y cols., realizaron un estudio in vitro para investigar el efecto de las AuNP en la reducción de la dosis de radiación láser para eliminar eficazmente el *E. Faecalis*. Para este estudio, una vez que se obtuvo la muestra de *E. Faecalis* y el inóculo de esta, se dividió en los siguientes grupos: tratamiento solo con AuNP; tratamiento con AuNP e irradiación con láser; tratamiento con MB a la concentración de 6.25 mg L⁻¹ solamente; tratamiento con MB a la concentración de 6.25 mg L⁻¹ e irradiación con láser; tratamiento con MB a la concentración de 6.25 mg L⁻¹ y las AuNP solamente; tratamiento con MB a la concentración de 6,25 mg L⁻¹ y las AuNP con irradiación láser. Los pocillos que se expondrían a laser se expusieron a distintos tiempos (5, 10, 15, 30 y 45 min). Se prepararon también 10 pocillos con suspensión bacteriana en el cual se activó el láser para determinar su efecto sobre las bacterias. Se determinó el número de unidades formadoras de colonias. En sus resultados se encontró una eficacia sinérgica de la destrucción de *E. Faecalis* cuando se aplicó la mezcla MB + AuNPs como agente fotosensibilizante. Este efecto letal se obtuvo después de 30 min de activación con láser, por lo cual la viabilidad celular bacteriana se redujo en un porcentaje del 99.92% (54)

Balagopal y cols., en el 2019, examinaron y valoraron la eficiencia antibacteriana del NaOCl al 5%, una solución de nanopartículas de quitosano (ChNPs) al 0.2% y otra solución de AgNPs al 0.01% frente a *E. Faecalis* activados y no activados con LD. Se incluyeron 70 premolares mandibulares de una sola raíz. Las muestras se incubaron y se esterilizaron en autoclave, posteriormente se inocularon de *E. Faecalis* y se incubaron a 37°C durante 7 días. Los especímenes se dividieron en 7 grupos (n=10). Grupo 1: Sin tratamiento (control negativo), grupo 2: 5% NaOCl sin activación (control positivo), grupo 3: 5% NaOCl con activación de diodo láser, grupo 4: 0.01% AgNP sin activación, grupo 5; 0.01% AgNP con activación por láser de diodo, grupo 6: 0.2% ChNP sin activación y grupo 7:0.2% ChNP con activación por láser de diodo. Se hizo un lavado final de los irrigantes y activación seguido del recuento de las unidades formadoras de colonias. El láser diodo en combinación con NaOCl al 5% y solución de ChNP al 0,2% tuvo efectos significativos en la reducción de

colonias microbianas de *E. Faecalis* comparado con otros grupos experimentales. También se expuso que todos los grupos activados por láser, sin importar las soluciones, tuvieron mejores resultados estadísticamente significativos comparados con sus contrapartes sin láser (55).

Roshdy y cols., de igual forma en el 2019, realizaron un estudio en el que se evaluó un irrigante con ChNPs contra *E. Faecalis* las cuales iban a ser activadas con láser. Para este estudio se utilizaron 60 premolares unirradiculares inoculados con *E. Faecalis* durante 15 días. Posteriormente se dividieron 2 grupos, en el que el grupo 1 consistía en una desinfección únicamente con los irrigantes y en el grupo 2 se activaban estos irrigantes con DL a 980 nm con una potencia de 2 W durante un periodo de 5 segundos. Para los resultados se determinó las UFC.

El grupo en el que se obtuvo una mayor reducción bacteriana fue el 2 (ChNPs activado con láser). Con base a los datos obtenidos en este estudio, se concluye que las ChNPs se pueden usar como irrigante endodóntico y la activación de estas con laser puede utilizarse como terapia combinada contra *E. Faecalis* (56).

En el 2019, Sadony y Abozaid estudiaron la capacidad de desinfección de las ChNPs combinadas con un DL de 970 nm para eliminar *E. Coli*. Para este estudio se utilizaron 40 dientes unirradiculares que se infectaron con *E. Coli* durante 15 días. Estas muestras se dividieron en 4 grupos. Grupo 1: grupo control solo con bacterias; grupo 2: bacterias y ChNPs, este grupo se subdividió en 2 grupos dependiendo del tiempo de incubación que se tuvo (60 y 90 segundos); grupo 3: bacterias y activación con DL, este también se subdividió en 2 grupos dependiendo del tiempo de activación del láser (60 y 90 segundos); grupo 4: se tenían bacterias, ChNPs y activación con DL, dividiéndose en 2 subgrupos dependiendo el tiempo de activación del láser. Sobre los resultados, se evaluó la UFC para cada muestra. El valor de desinfección medio más alto se encontró en los 60 segundos, mientras que el valor medio mínimo era a los 90 segundos. Los resultados muestran un efecto antibacteriano con la irradiación del DL y las ChNPs (57).

Abdelgawad y cols., en el 2020, estudiaron la eficiencia de la activación de la CHX y las AgNPs con un DL de 810 nm o un endoactivador sónico comparados con una aguja de salida lateral. En este estudio se prepararon 69 premolares los cuales fueron inoculados con *E. Faecalis* y se dividieron en 3 grupos. Grupo 1: DL con potencia de 1 W; grupo 2: endoactivador sónico; grupo 3: aguja con salida lateral. De igual forma estos grupos se subdividieron en 3 grupos dependiendo la solución irrigante, las cuales fueron CHX, AgNPs y agua destilada. Para los resultados se utilizó la microscopía de barrido láser confocal (CLSM). En cuestión de activación, el láser obtuvo resultados más altos y el endoactivador tuvo los resultados más bajos. En cuanto al tipo de irrigante, las AgNPs combinadas con DL tuvieron un porcentaje de bacterias muertas del 78%, la agitación con aguja de salida lateral obtuvo un 76.47% y la activación sónica obtuvo un porcentaje del 72.94%. Se concluye que la activación del irrigante con DL combinado con AgNPs y CHX tuvo mejores resultados que el endoactivador y la aguja de salida lateral (58).

Seyedeh y cols., en el 2021 realizaron un estudio en el cual el objetivo era comparar los efectos antibacterianos de un láser diodo con una longitud de onda de 940 nm y nanopartículas de plata al igual que los efectos sinérgicos de ambas técnicas contra *Enterococcus faecalis*, ellos utilizaron 90 dientes humanos unirradiculares los cuales fueron decoronados y preparados con limas rotatorias. Las muestras se irrigaron con NaOCl y EDTA al 17%. Luego se esterilizaron en autoclave y se contaminaron con *E. Faecalis* en una suspensión ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml) durante 21 días. Las muestras se fijaron en un microtubo y se dividieron aleatoriamente en 4 grupos experimentales (n=20) y un grupo de control negativo (n=10) de la siguiente manera: Grupo 1: hipoclorito de sodio al 5%, Grupo 2: nanopartícula de plata, Grupo 3: láser de diodo, y Grupo 4: láser de diodo y nanopartícula de plata activando 15 segundos 3 veces de forma similar al grupo de láser. Hubo una reducción significativa para el grupo 1 en comparación con los otros grupos y este grupo tuvo una disminución extrema de los recuentos de colonias. También hubo una diferencia importante entre las nanopartículas de plata y los grupos de láser de diodo en los recuentos bacterianos y las nanopartículas de plata tuvieron más eficiencia que el láser diodo (59).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

En el tratamiento de conductos radiculares, la desinfección incluye la eliminación de lodillo dentinario y de los tejidos pulpares. En la instrumentación se puede crear lodillo dentinario por un barrido de las paredes del conducto radicular, por lo que se necesita una solución que penetre y elimine dicho lodillo. Hasta el momento no se ha formulado una solución irrigante que funcione como un irrigante ideal. Pensando en las variaciones anatómicas del SCR y la poca capacidad de los irrigantes para desinfectar por completo el espacio del conducto radicular, se necesita encontrar nuevos protocolos de desinfección más efectivos, con el objetivo de eliminar al *E. Faecalis*, el cual puede causar fracasos en el tratamiento endodóntico. Como opciones para este nuevo protocolo de desinfección tenemos las NPs metálicas, las cuales tienen efecto antimicrobiano al entrar en contacto con la membrana celular. También se menciona el uso de láser ya que puede penetrar en los túbulos dentinarios y ocasionar la muerte bacteriana a mayor profundidad, por lo que se propone el uso combinado de CuNPs y láser, lo cual puede potenciar la actividad antimicrobiana de las CuNPs contra el *E. Faecalis*.

Con lo mencionado anteriormente, surge la siguiente pregunta de investigación:

¿Las nanopartículas de cobre activadas con láser diodo inhiben el crecimiento del *Enterococcus faecalis*?

5. JUSTIFICACIÓN

Para una correcta limpieza durante el tratamiento endodóntico es necesario la desinfección mecánica y química para tratar de eliminar *E. Faecalis*, el cual puede resultar en una infección persistente ya que, por la complejidad anatómica del SCR, los irrigantes no llegan a zonas profundas, lo que conlleva a una desinfección baja que puede ocasionar el fracaso del tratamiento.

Con el desarrollo de cepas bacterianas resistentes, incluso a los antibióticos, se han tenido que investigar medicamentos con un mayor espectro antimicrobiano. Las NPs tienen mayor área de superficie y al interactuar directamente con la membrana celular cargada negativamente, podrán ejercer su efecto antimicrobiano.

La información descrita en artículos anteriores menciona el uso de las CuNPs en odontología, así como en la endodoncia para eliminar bacterias resistentes y al ser un antibacteriano de contacto se disminuiría el tiempo necesario, siendo así capaces de ser utilizadas como irrigante o medicamento intraconducto. Aún se requiere más información e investigación sobre la actividad de estas CuNPs como desinfectantes del conducto radicular.

El DL tiene buena desinfección ya que penetra en la dentina y destruye bacterias con su efecto fototérmico. El DL tiene distintas puntas de activación, delgadas y flexibles lo que les permite llegar a partes donde el acceso está muy limitado. Aún no se encuentra información sobre el uso de las CuNPs y DL, por lo cual se plantea esta investigación para buscar alternativas de desinfección del SCR.

En este estudio se espera una eliminación del *E. Faecalis* con la combinación de las CuNPs y el DL y se pueda obtener un protocolo de irrigación endodóntica más favorable y así aumentar la tasa de éxito en un tratamiento endodóntico.

6. HIPÓTESIS

Hi: Las nanopartículas de cobre activadas con láser diodo inhiben el crecimiento de *Enterococcus faecalis*.

Ho: Las nanopartículas de cobre activadas con láser diodo no inhiben el crecimiento de *Enterococcus faecalis*.

7. OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de cobre activadas con láser diodo contra el *Enterococcus faecalis*.

7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la concentración mínima inhibitoria de las nanopartículas de cobre activadas con láser diodo contra el *Enterococcus faecalis*.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria de las nanopartículas de cobre sin activar con láser diodo contra el *Enterococcus faecalis*.
- Determinar la actividad antimicrobiana del láser diodo contra el *Enterococcus faecalis*.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

- De acuerdo a la intervención del investigador, este estudio es experimental.
- De acuerdo a la medición del fenómeno en el tiempo, es un estudio prospectivo.
- De acuerdo al número de mediciones, será un estudio transversal.
- Según la captación de la información, es un estudio *in vitro*, realizado en el laboratorio.
- Según la población en estudio, será una investigación analítica.

8.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

- Estudio experimental *in vitro*, por lo que no se llevará a cabo un cálculo del tamaño de muestra.
- Diluciones en etilenglicol a distintas concentraciones de nanopartículas de cobre de 25 nm, en su estado purificado.
- Cepa de *E. Faecalis* (ATCC 51299)

8.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN

8.3.1 Criterios de inclusión

- Nanopartículas de cobre de 25 nm, en su estado purificado.
- La cantidad y dilución adecuada de las nanopartículas de cobre utilizadas.
- Cepa de *E. Faecalis* (ATCC 51299)

8.3.2 Criterios de exclusión

- Nanopartículas de cobre que no se encuentren en estado purificado.
- Nanopartículas de cobre que no sean del tamaño preestablecido.
- Cepa de *E. Faecalis* contaminada con otras bacterias.

8.3.3 Criterios de eliminación

- Nanopartículas de cobre que en solución muestran posible contaminación.
- Muestras que por algún factor externo no se hayan logrado preparar con el proceso preestablecido.

8.4 VARIABLES (definición conceptual, definición operacional, escala y categoría) (Tabla1)

Tabla 1. Variables

VARIABLES INDEPENDIENTES				
VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	CATEGORÍA	ESCALA
NANOPARTÍCULAS COBRE	Partículas sólidas de cobre con un diámetro de 1 a 100 nm, con capacidad antimicrobiana.	(Número o cantidad o porcentaje) de nanopartículas de cobre para inhibir crecimiento bacteriano.	Cualitativa policotómica nominal	µg/ml.
LÁSER DIODO	Herramienta que utiliza la luz láser como fuente de energía. Esta energía al interactuar con el tejido irradiado consigue efectos terapéuticos. Posee una longitud de onda de 800nm a 980nm.	Activador de nanopartículas para inhibir crecimiento bacteriano.	Cualitativa dicotómica nominal	nm
VARIABLES DEPENDIENTES				
VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	CATEGORÍA	ESCALA
CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA	Concentración más baja de un agente antimicrobiano donde no se observa desarrollo bacteriano (bacteriostático).	Cantidad de nanopartículas de cobre activadas con láser necesarias para inhibir el crecimiento del <i>Enterococcus faecalis</i> .	Cuantitativa de razón	µg/ml.

Tabla 1. Variables independientes y dependientes
Fuente propia.

8.5 CONCORDANCIA Y FIABILIDAD

- Se aprendió la técnica de macrodilución con un experto.
- Prueba piloto, en la cual el investigador realizó el procedimiento junto al experto para hacer un primer análisis de resultados bajo su supervisión y evaluar viabilidad, tiempo, costo y acontecimientos adversos.
- El resultado del estudio se tomó como el promedio de 5 pruebas realizadas.

8.6 UBICACIÓN ESPACIO-TEMPORAL

Laboratorio de investigación en microbiología oral de la facultad de estomatología de la B.U.A.P. y laboratorio de biomateriales en el período enero - mayo 2023.

8.7. PROCEDIMIENTOS

8.7.1 Nanopartículas de cobre

La suspensión acuosa de CuNPs se realizó con la dilución de las CuNPs de 25 nm (Sigma Aldrich) en etilenglicol para mantenerlas estables durante 2 meses (60), en el cual se creó una solución concentrada a partir de 3 mg de nanopartículas de cobre en 1 ml de etilenglicol de la cual partiríamos para obtener las concentraciones determinadas de las nanopartículas por dilución (Tabla 2) (Figura 2).

Tabla 2. Concentraciones de nanopartículas

Tubo	Concentración de nanopartículas de cobre ($\mu\text{g/ml}$)
1	300 $\mu\text{g/ml}$
2	400 $\mu\text{g/ml}$
3	500 $\mu\text{g/ml}$
4	600 $\mu\text{g/ml}$
5	700 $\mu\text{g/ml}$
6	800 $\mu\text{g/ml}$
7	900 $\mu\text{g/ml}$
8	1000 $\mu\text{g/ml}$

Tabla 2. Concentraciones de nanopartículas de 300 $\mu\text{g/ml}$ a 1000 $\mu\text{g/ml}$. Fuente propia.



Figura 2. CuNPs y etilenglicol. Fuente propia.

8.7.2 Cultivo de cepa bacteriana

Se utilizó una cepa de *E. Faecalis* (ATCC 51299) que se cultivó en infusión cerebro-corazón (BHI) a 37° C por 24 horas. Posteriormente se sembró por estría cruzada en agar BHI a 37° por 24 horas para su posterior utilización.

8.7.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

La CIM es la concentración más baja de un antimicrobiano que es bacteriostático. Esta se utiliza para evaluar la función antimicrobiana de diversos compuestos al medir el efecto de concentraciones decrecientes durante un período definido en términos de inhibición del crecimiento de la población microbiana.

Para la determinación de la CMI en este estudio se utilizó el método de macrodilución (61). Se dispuso de una batería en 18 esterclaves de vidrio del mismo calibre bajo criterios de bioseguridad y esterilidad. Se agregó a cada tubo caldo cerebro-corazón (BHI), la suspensión bacteriana de 24 horas de crecimiento, ajustada a un estándar de 0.5 del nefelómetro de McFarland, equivalente a 1.5×10^8 UFC /ml, y la solución concentrada de CuNPs. En la tabla 3 se observan las cantidades exactas para obtener la concentración de CuNPs deseada, así como los testigos positivos y negativos de crecimiento bacteriano (Tabla 3) (Figura 2).

Tabla 3. Cantidades para crear las diluciones

	CuNPs	Medio de cultivo BHI	Concentrado de CuNPs	Inoculo de <i>E. Faecalis</i>
1	300 µg/ml	900 µl	100 µl	10 µl
2	400 µg/ml	867 µl	133 µl	10 µl
3	500 µg/ml	834 µl	166 µl	10 µl
4	600 µg/ml	800 µl	200 µl	10 µl
5	700 µg/ml	770 µl	230 µl	10 µl
6	800 µg/ml	740 µl	260 µl	10 µl
7	900 µg/ml	700 µl	300 µl	10 µl
8	1000 µg/ml	670 µl	330 µl	10 µl
9	Control +	1000 µl	0 µl	10 µl
10	Control -	925 µl	75 µl clorhexidina	10 µl

Tabla 3. Cantidades para las diluciones.
Fuente propia.



Figura 3. Colocación de BHI, suspensión bacteriana y concentrado de CuNPs en esterclaves.
Fuente propia.

8.7.4 Grupos experimentales

Se dividió en 2 grupos.

Grupo 1 con activación de láser diodo.

En este grupo se procedió a activar las muestras con el láser diodo Epic X de biolase con una potencia de 1.5 W y longitud de onda de 940 nm, el cual se activó durante 30 segundos basándose en el artículo publicado en el 2017 de Afkhami donde utilizó AgNPs y DL contra el *E. Faecalis*, lo cual le arrojó mejores resultados (52). Los esterclaves se incubaron a 37°C por 24 horas (Figura 4 y Figura 5).



Figura 4. Láser diodo Epic X de biolase a 1.5W. Fuente propia.



Figura 5. Activación de Láser diodo Epic X de biolase por 30 segundos. Fuente propia.

Grupo 2 sin activación de láser diodo.

En este grupo, una vez que se había colocado la cantidad de BHI, CuNPs y suspensión bacteriana, se incubaron los esterclaves a 37°C por 24 horas sin ningún tipo de activación.

Transcurrido esto, de manera visual, se identificó la presencia o ausencia del crecimiento bacteriano. La CMI se obtiene con la mínima concentración en donde no se observa turbidez, la cual es compatible con crecimiento bacteriano.

En el control positivo no se usaron CuNPs y en el control negativo se utilizó CHX al 2% para su eliminación.

8.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó el análisis de los datos por estadística descriptiva, frecuencias y porcentajes, pues las variables del estudio son dicotómicas y solo miden la presencia o ausencia de las bacterias.

9. RESULTADOS

Los resultados mostraron una turbidez correspondiente a un crecimiento bacteriano en las concentraciones más bajas de dilución de CuNPs que fueron 300 $\mu\text{g/ml}$ Y 400 $\mu\text{g/ml}$ tanto para el grupo de laser como para el grupo sin laser. A partir de la concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$ no se podía apreciar turbidez en ninguna concentración tanto para el grupo con láser como para grupo sin láser (Figura 6).

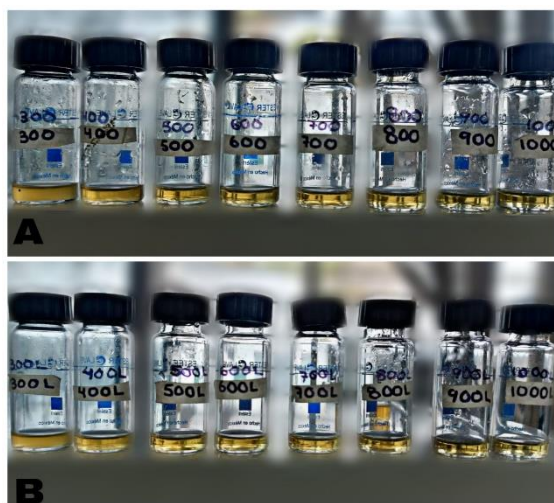


Figura 6.
Figura 6A. Grupo sin activación de láser.
Figura 6B. Grupo con activación de láser.
Fuente propia.

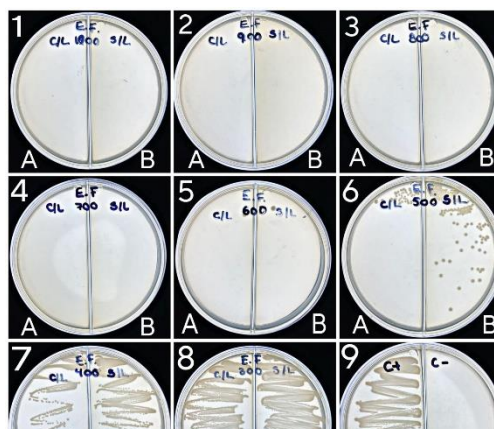


Figura 7.
1.- 1000 $\mu\text{g/ml}$. 2.- 900 $\mu\text{g/ml}$. 3.- 800 $\mu\text{g/ml}$.
4.- 700 $\mu\text{g/ml}$. 5.- 600 $\mu\text{g/ml}$. 6.- 500 $\mu\text{g/ml}$.
7.- 400 $\mu\text{g/ml}$. 8.- 300 $\mu\text{g/ml}$.
En donde lado A es el grupo con activación de láser y lado B es el grupo sin activación de láser.
9.- Control + A, Control – B.
Fuente propia.

Para corroborar que realmente hubiera un efecto bactericida, se decidió sembrar el contenido de cada esterilizado en placas de agar BHI por medio de estría cruzada, las cuales se incubaron a 37°C por 24 horas para su posterior lectura.

En las concentraciones de 300 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$ y 600 $\mu\text{g/ml}$ siempre hubo crecimiento de colonias bacterianas en las placas de agar tanto para el grupo con láser como para el grupo sin láser. Para las concentraciones de 700 $\mu\text{g/ml}$ a 1000 $\mu\text{g/ml}$ no hubo crecimiento bacteriano en ningún grupo (Figura 7).

Basándonos en estos resultados la concentración mínima inhibitoria para ambos grupos fue de 700 $\mu\text{g/ml}$, ya que en ninguna repetición de este estudio hubo crecimiento bacteriano a dicha concentración.

El control positivo tuvo crecimiento bacteriano en todas sus repeticiones y el control negativo, en el cual se utilizó CHX, inhibió por completo el crecimiento bacteriano. (Figura 6-9). Los resultados se encuentran tabulados en la tabla 3, tabla 4 y tabla 5.

Tabla 4. Resultados de crecimiento bacteriano en las 5 pruebas realizadas

Tubo	Concentración de nanopartículas de cobre (µg/ml)	Crecimiento bacteriano (Prueba 1)	Crecimiento bacteriano (Prueba 2)	Crecimiento bacteriano (Prueba 3)	Crecimiento bacteriano (Prueba 4)	Crecimiento bacteriano (Prueba 5)
1	300 µg/ml	+	+	+	+	+
2	400 µg/ml	+	+	+	+	+
3	500 µg/ml	-*	-*	-*	-*	-*
4	600 µg/ml	-*	-*	-*	-*	-*
5	700 µg/ml	-	-	-	-	-
6	800 µg/ml	-	-	-	-	-
7	900 µg/ml	-	-	-	-	-
8	1000 µg/ml	-	-	-	-	-
9	Control +	+	+	+	+	+
10	Control -	-	-	-	-	-
Concentración de nanopartículas de cobre (µg/ml) / Activadas con láser diodo						
1	300 µg/ml	+	+	+	+	+
2	400 µg/ml	+	+	+	+	+
3	500 µg/ml	-*	-*	-*	-*	-*
4	600 µg/ml	-*	-*	-*	-*	-*
5	700 µg/ml	-	-	-	-	-
6	800 µg/ml	-	-	-	-	-
7	900 µg/ml	-	-	-	-	-
8	1000 µg/ml	-	-	-	-	-
9	Control +	+	+	+	+	+
10	Control -	-	-	-	-	-

* Crecimiento positivo en placa de agar BHI

Fuente propia.

Tabla 5. Porcentaje de bacterias presentes

Porcentajes de presencia de bacterias en las diferentes concentraciones de CuNPs										
	Concentración de CuNPs activadas y sin activar con láser									
Presencia de bacterias	300 µg/ml	400 µg/ml	500 µg/ml	600 µg/ml	700 µg/ml	800 µg/ml	900 µg/ml	1000 µg/ml	Control +	Control -
Si	100%	100%	100%	100%	0 %	0 %	0 %	0 %	100%	
No	0 %	0 %	0 %	0 %	100%	100%	100%	100%		100%

Fuente propia.

10.- DISCUSIÓN

El principal objetivo del tratamiento de conductos radiculares es prevenir o tratar la periodontitis apical, lo cual va a implicar la limpieza y la conformación del sistema de conductos radiculares (4). En esta parte la eliminación de bacterias de los conductos es muy importante para dicho tratamiento ya que las bacterias mantienen las lesiones periapicales como persistentes (5).

El *Enterococcus faecalis* es un coco Gram positivo capaz de adaptarse y sobrevivir en entornos adversos y es un patógeno capaz de tolerar un pH alcalino de 11.5 por largos periodos de tiempo (62).

Debido a la dificultad para eliminar bacterias multi resistentes como *E. Faecalis* del conducto radicular con sustancias antibacterianas convencionales, en los últimos años se han introducido nuevas estrategias como el uso de nanoparticulas metálicas y el uso láser para intentar mejorar la desinfección endodóntica.

El cobre tiene acción antibacteriana debido a su capacidad de dar y recibir electrones, lo que ocasiona un radical hidroxilo que a su vez ocasiona una oxidación de proteínas y lípidos (33), por lo tanto, las propiedades antibacterianas que presenta el cobre en su presentación de nanopartícula podrían tener aplicaciones en endodoncia para favorecer la desinfección de los conductos radiculares (36).

El láser diodo puede penetrar fácilmente en conductos curvos debido a sus fibras flexibles y de pequeño tamaño, mejor distribución de la luz y, por lo tanto, mejor desinfección del conducto. Los láseres diodo interfieren ligeramente con el agua y la hidroxiapatita y potencian su efecto bactericida con actividad térmica fotosensible en áreas inaccesibles de la dentina, por lo tanto estas propiedades han llevado a su uso en la desinfección de los conductos radiculares. (60)

Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio fue determinar la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de cobre activadas con láser diodo y sin activar contra *Enterococcus faecalis* la cual, basándonos en la concentración mínima inhibitoria para ambos grupos, fue de 700 µg/ml.

Kushwaha y cols., en el 2018, investigaron la actividad de las AgNPs y las AuNPs las cuales activaron con láser YAG contra *E. Faecalis*. En el grupo de las AuNPs y láser se utilizó una irrigación de 50 µl de 100 ppm con activación de láser con una potencia de 1.5 W durante 60 segundos en el cual se encontraron mejores resultados en la combinación del grupo de láser y las AgNPs (53). Maliszewska y cols., en el 2019 investigaron el efecto de las AuNPs con dosis de radiación láser contra *E. Faecalis*. En los grupos de láser más las NPs, el láser se activó durante varios periodos de tiempo que iban desde 5 minutos hasta 45 minutos; en sus resultados se encontró un efecto bactericida después de la activación del láser durante 30 minutos (54).

Los resultados de esta investigación difieren con los estudios anteriores ya que el crecimiento bacteriano basado en la turbidez fue exactamente igual tanto en el grupo con láser como en el grupo sin láser; esto se podría explicar posiblemente por la diferencia de tiempo de activación del láser. En nuestro estudio se activó el láser durante un periodo de 30 segundos según Afkhami y cols., en el 2017 (52), ya que los artículos anteriores mencionan un tiempo de exposición al laser de incluso 45 min, lo que ayuda a un mayor movimiento y contacto con la pared celular para su eliminación; sin embargo, este tiempo de activación es prolongado y no tan factible de aplicar clínicamente.

Abdelgawad y cols., en el 2020, estudiaron la activación de la CHX y las AgNPs en conjunto con láser diodo de 810 nm y el endoactivador sónico contra una aguja de salida lateral. En este grupo el láser utilizó a una potencia de 1 W activado durante 10 segundos, 3 veces. En los resultados, el mayor porcentaje de eliminación de bacterias fue en el grupo de AgNPs con DL seguida de la aguja de salida lateral y, por último, la activación sónica. Ninguno de estos resultados tuvo diferencias significativas (58).

De igual forma Seyedeh y cols., en el 2021 realizaron un estudio en el cual el objetivo era comparar los efectos antibacterianos de un láser diodo con una longitud de onda de 940nm y nanopartículas de plata y los efectos sinérgicos de ambas técnicas contra *Enterococcus faecalis*. En el grupo de láser diodo y nanopartículas de plata, se limpió el conducto radicular con 5 ml de suspensión de nanopartículas de plata de 100 ppm mediante una jeringa de insulina. Después de 5 minutos, el láser diodo se irradió a 940 nm con 1 watio de potencia en modo continuo durante 15 segundos 3 veces y el grupo de solo nanopartículas de plata el conducto radicular se limpió con 5 ml de suspensión de nanopartículas de plata de 20nm con una jeringa de insulina durante 5 minutos. Los resultados mostraron que las AgNP podían disminuir la viabilidad celular en concentraciones de 400 a 500 µg/ml los cuales no tuvieron diferencias significativas entre las nanopartículas de plata y el grupo láser en cuanto al número de colonias bacterianas encontradas (59).

Los resultados de este estudio pueden parecerse más a los dos últimos artículos citados anteriormente ya que no se encontró una diferencia significativa entre el uso de láser y el solo uso de la nanopartícula, esto posiblemente se debe al tiempo de exposición que se generó con el láser el cual es menor, ya que en este estudio se activó el láser 30 segundos comparado con el mayor tiempo reportado en los artículos que fue de 45 minutos, en los cuales el láser tiene un efecto bactericida superior en conjunto con las nanopartículas.

También se observó la diferencia de concentraciones, encontrándose que para las AgNP se requiere menor concentración que los 700 µg/ml reportados para las CUNPs en este estudio. La diferencia esta relacionada con el tipo de material y el tamaño de las nanopartículas, así como los tiempos de activación a las que fueron sometidas cuando se probaron con láser.

Aún no hay estudios que evalúen el uso del láser en conjunto con las CuNPs para poder tener una comparación más precisa en cuanto a nuestra metodología.

Los resultados obtenidos en este estudio no mostraron un nivel de desinfección mayor en cuanto al uso de láser, ya que los resultados nos indican la misma eliminación de bacterias que cuando no se utilizó el láser, lo que si se podría afirmar en este estudio es que por sí solo el cobre tiene un efecto bactericida y este es eficaz para la eliminación del *E. Faecalis*, lo cual tiene mucha relevancia en el ámbito de la endodoncia, ya que dicha bacteria es la más comúnmente encontrada en infecciones endodónticas y la más difícil de eliminar.

Durante este estudio se tuvieron algunas limitaciones como el tiempo para realizarlo ya que el láser diodo no se encontraba disponible. Se sugiere para investigaciones futuras aumentar el tiempo de activación del láser diodo, así como su potencia para ver si se logran resultados más favorecedores. De igual forma se podría obtener una concentración mínima inhibitoria más precisa al crear concentraciones de nanopartículas específicas entre los rangos de 100 µg/ml.

11. CONCLUSIÓN

Se concluye que por sí solas las nanopartículas de cobre tienen un efecto bactericida en una concentración de 700 µg/ml, y no se encontraron diferencias en la reducción bacteriana cuando las nanopartículas fueron activadas con el láser diodo durando 30 segundos, por lo que se acepta la hipótesis nula.

Para futuros estudios se sugiere más investigación, probar con distintos tiempos de activación del láser, así como potencias de láser para obtener resultados más favorecedores en cuanto a su uso. También se podrían crear nuevas concentraciones de nanopartículas de cobre y obtener una concentración mínima inhibitoria más precisa. Finalmente se podría completar la evaluación del efecto antibacteriano con un conteo de bacterias que permita obtener resultados cuantitativos.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Galleguillos Morales CA. Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de nanopartículas de cobre frente a *Enterococcus faecalis*. 2016;1–29.
2. Ricucci D, Siqueira JF. Biofilms and apical periodontitis: Study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod*. 2010;36(8):1277–88.
3. Nair PNR. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine and the causes of endodontic failures. *Int Am Assoc Dent Res*. 2004;15(6):348–81.
4. Deleu E, Meire MA, De Moor RJG. Efficacy of laser-based irrigant activation methods in removing debris from simulated root canal irregularities. *Lasers Med Sci*. 2015;30(2):831–5.
5. Filho MT, Leonardo MR, Da Silva LAB. Effect of irrigating solution and calcium hydroxide root canal dressing on the repair of apical and periapical tissues of teeth with periapical lesion. *J Endod*. 2002;28(4):295–9.
6. Rocas I, Siqueira J, Santos K. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular. *J Endod*. 2004;30(19):315–20.
7. Hernández Viguera S, Donoso Zúñiga M, Jané-Salas E, Salazar Navarrete L, Segura-Egea JJ, Velasco-Ortega E, et al. Viruses in pulp and periapical inflammation: a review. *Odontology*. 2016;104(2):184–91.
8. Singh H. Scient Open Access Exploring the World of Science Microbiology of Endodontic Infections. *J Dent oral Heal*. 2016;2(5):2–5.
9. Jhajharia K. Microbiology of endodontic diseases : A review article. 2019;5(1):227–30.
10. 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(1):86–93.
11. Neelakantan P, Cheng CQ, Mohanraj R, Sriraman P, Subbarao C, Sharma S. Antibiofilm activity of three irrigation protocols activated by ultrasonic, diode laser or Er: YAG laser in vitro. *Int Endod J*. 2015;48(6):602–10.
12. Siqueira JF. Microbial causes of endodontic flare-ups. *Int Endod J*. 2003;36(7):453–63.
13. Sierra M, Sanhueza A, Alcántara R, Sánchez G. Antimicrobial evaluation of copper sulfate (II) on strains of *Enterococcus faecalis*. In vitro study. *J Oral Res*. 2013;2(3):114–8.
14. Nakajo K, Komori R, Ishikawa S, Ueno T, Suzuki Y, Iwami Y, et al. Resistance to acidic and alkaline environments in the endodontic pathogen *Enterococcus faecalis*. *Oral Microbiol Immunol*. 2006;21(5):283–8.
15. Łysakowska ME, Ciebiada-Adamiec A, Sienkiewicz M, Sokołowski J, Banaszek K. The cultivable microbiota of primary and secondary infected root canals, their susceptibility to antibiotics and association with the signs and symptoms of infection. *Int Endod J*. 2016;49(5):422–30.
16. Haapasalo M, Ørstavik D. In vitro Infection and Disinfection of Dentinal Tubules. *J Dent Res*. 1987;66(8):1375–9.
17. Zhang C, Du J, Peng Z. Correlation between *Enterococcus faecalis* and Persistent Intraradicular Infection Compared with Primary Intraradicular Infection: A Systematic Review. *J Endod*. 2015;41(8):1207–13.
18. El karim I, Kennedy J, Hussey D. The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2007;103(4):560–9.
19. Zehnder M. Root Canal Irrigants. *J Endod*. 2006;32(5):389–98.
20. Yamada RS, Armas A, Goldman M, Lin PS. A scanning electron microscopic comparison of a high volume final flush with several irrigating solutions: Part 3. *J Endod*. 1983;9(4):137–42.

21. van der Sluis LWM, Vogels MPJM, Verhaagen B, Macedo R, Wesselink PR. Study on the Influence of Refreshment/Activation Cycles and Irrigants on Mechanical Cleaning Efficiency During Ultrasonic Activation of the Irrigant. *J Endod.* 2010;36(4):737–40.
22. Vianna ME, Gomes BPF, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;97(1):79–84.
23. Basrani BR, Manek S, Sodhi RNS, Fillery E, Manzur A. Interaction between Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine Gluconate. *J Endod.* 2007;33(8):966–9.
24. Balaji P, Jhaveri H. Nanotechnology: The future of dentistry. *J Indian Prosthodont Soc.* 2009;5(1):15.
25. Song W, Ge S. Application of Antimicrobial Nanoparticles in Dentistry. *Molecules.* 2019;24(6):1033.
26. Ren G, Hu D, Cheng EWC, Vargas-Reus MA, Reip P, Allaker RP. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *Int J Antimicrob Agents.* 2009;33(6):587–90.
27. Trepiana D. Síntesis De Suspensiones De Nanopartículas De Cobre Y Quitosano, Y Evaluación De Sus Propiedades Antimicrobianas Frente a Streptococcus Mutans. *Univ Chile.* 2015.
28. Khan S, Alam F, Azam A, Khan AU. Gold nanoparticles enhance methylene blue-induced photodynamic therapy: A novel therapeutic approach to inhibit Candida albicans biofilm. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:3245–57.
29. Fang J, Lyon DY, Wiesner MR, Dong J, Alvarez PJJ. Effect of a fullerene water suspension on bacterial phospholipids and membrane phase behavior. *Environ Sci Technol.* 2007;41(7):2636–42.
30. Lok CN, Ho CM, Chen R, He QY, Yu WY, Sun H, et al. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J Proteome Res.* 2006;5(4):916–24.
31. Kishen A, Applications C. Nanotechnology in Endodontics. *Nanotechnology in Endodontics.* 2015.
32. Mardones J, MI G, Díaz C, Galleguillos C, Covarrubias C. In Vitro Antibacterial Properties of Copper Nanoparticles as Endodontic Medicament against Enterococcus faecalis. *J Dent Oral Disord.* 2018;4(6).
33. Grass G, Rensing C, Solioz M. Metallic Copper as an Antimicrobial Surface. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(5):1541–7.
34. Prado V, Vidal R, Durán C. Aplicación de la capacidad bactericida del cobre en la práctica médica. *Rev Med Chil.* 2012;140(10):1325–32.
35. Jamshidi A, Jahangiri- M. Synthesis of Copper Nanoparticles and its Antibacterial Activity against Escherichia coli. *Asian J Biol Sci.* 2014;7(4):183–6.
36. Sánchez-Sanhueza G, Fuentes-Rodríguez D, Bello-Toledo H. Copper Nanoparticles as Potential Antimicrobial Agent in Disinfecting Root Canals: A Systematic Review. *Int J Odontostomatol.* 2016;10(3):547–54.
37. Y. Kimura PW-S& KM. Laser in Endodontics.pdf. *Int Endod J.* 2000;33:173–85.
38. Rechmann P, Goldin DS, Hennig T. Er:YAG lasers in dentistry: an overview. *Lasers Dent IV.* 2003;3248(3):2.
39. Olivi G. Laser Use in Endodontics: Evolution from Direct Laser Irradiation to Laser-Activated Irrigation. *J Laser Dent J Laser Dent.* 2013;2121(22):58–71.
40. Schoop U, Kluger W, Moritz A, Nedjelic N, Georgopoulos A, Sperr W. Bactericidal effect of different laser systems in the deep layers of dentin. *Lasers Surg Med.* 2004;35(2):111–6.
41. Hmud R, Kahler WA, George R, Walsh LJ. Cavitation Effects in Aqueous Endodontic

- Irrigants Generated by Near-infrared Lasers. *J Endod.* 2010;36(2):275–8.
42. Arte E, Notación D, Anderson C, Maronde M, Stokes R, Cianflone C, et al. Manual del usuario. 2001.
 43. Allaker RP. Critical review in oral biology & medicine: The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. *J Dent Res.* 2010;89(11):1175–86.
 44. Cioffi N, Ditaranto N, Torsi L, Picca RA, Sabbatini L, Valentini A, et al. Analytical characterization of bioactive fluoropolymer ultra-thin coatings modified by copper nanoparticles. *Anal Bioanal Chem.* 2005;381(3):607–16.
 45. Sánchez-Sanhueza G, Alcántara-Dufeu R, Carrillo L, Mansilla H, Novoa C, Bello-Toledo H. Ex vivo Effect of Copper Sulfate on *Enterococcus faecalis* in Root Canals. *Int J Odontostomatol.* 2015;9(3):505–10.
 46. Han L, Zhang Y, Chen XW, Shu Y, Wang JH. Protein-modified hollow copper sulfide nanoparticles carrying indocyanine green for photothermal and photodynamic therapy. *J Mater Chem B.* 2016;4(1):105–12.
 47. de Gregorio C, Estevez R, Cisneros R, Heilborn C, Cohenca N. Effect of EDTA, Sonic, and Ultrasonic Activation on the Penetration of Sodium Hypochlorite into Simulated Lateral Canals: An In Vitro Study. *J Endod.* 2009;35(6):891–5.
 48. Cachovan G, Schiffner U, Altenhof S, Guentsch A, Pfister W, Eick S. Comparative antibacterial efficacies of hydrodynamic and ultrasonic irrigation systems in vitro. *J Endod.* 2013;39(9):1171–5.
 49. Lee S, Wu M, Wesselink PR. The effectiveness of syringe irrigation and ultrasonics to remove debris from simulated irregularities within prepared root canal walls S.-J. *Int Endod J.* 2004;37:672-678.
 50. Ford TRP, Crum LA. 8. Ahmad, Ultrasonic debridement of root canals- An insight into the mechanisms involved, *J Endod* 1987.pdf. 1987;13(3):93–101.
 51. Meire MA, De Prijck K, Coenye T, Nelis HJ, De Moor RJG. Effectiveness of different laser systems to kill *Enterococcus faecalis* in aqueous suspension and in an infected tooth model. *Int Endod J.* 2009;42(4):351–9.
 52. Afkhami F, Akbari S, Chiniforush N. *Enterococcus faecalis* Elimination in Root Canals Using Silver Nanoparticles, Photodynamic Therapy, Diode Laser, or Laser-activated Nanoparticles: An In Vitro Study. *J Endod.* 2017;43(2):279–82.
 53. Kushwaha V, Yadav R, Tikku A, Chandra A, Verma P, Gupta P, et al. Comparative evaluation of antibacterial effect of nanoparticles and lasers against Endodontic Microbiota: An in vitro study. *J Clin Exp Dent.* 2018;10(12):e1155–
 54. Maliszewska I, Wróbel J, Wanarska E, Podhorodecki A, Matczyszyn K. Synergistic effect of ethylene blue and biogenic gold nanoparticles against *Enterococcus faecalis*. *Photodiagnosis Photodyn Ther [Internet].* 2019;27(April):218–26.
 55. Balagopal S, James V, Sebatni A, M N, Hemasathya BA, Chandrasekaran C, et al. Nano-Engineered Irrigating Solutions and Lasers – an Antibacterial Study Against *Enterococcus Faecalis*. *Int J Med Biomed Stud.* 2019;3(12):23–8.
 56. Roshdy N, Kataia EM. Assessment of antibacterial activity of 2.5 % NaOCl, chitosan nanoparticles against *Enterococcus faecalis* contaminating root canals with and without diode laser irradiation: an in vitro study. *ACTA Odontol Scand.* 2019;77(1):39–43.
 57. Sadony DM, Abozaid HE. Antibacterial effect of chitosan nanoparticles in combination with diode laser on *E. coli* bacterial strain. *Egypt Dent J.* 2019;65(3):2543–9.
 58. Abdelgawad LM, Asmail N, Latif SA, Saafan AM. Efficacy of diode laser and sonic agitation of chlorhexidine and silver-nanoparticles in infected root canals. *Brazilian Dent Sci.* 2020;23(3):1–9.

59. Seyedeh SH, Maryam S, Banafsheh P, Mohammad YA. Antibacterial Effects of a 940 nm Diode Laser With/ Without Silver Nanoparticles Against *Enterococcus faecalis*. *J Lasers Med Sci*. 2021;24:12-73.
60. Dang TMD, Le TTT, Fribourg-Blanc E, Dang MC. The influence of solvents and surfactants on the preparation of copper nanoparticles by a chemical reduction method. *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol*. 2011;2(2): 1-7.
61. Picazo JJ, García Rodríguez JA, Cantón R, Elías J, M^a S, Gomez L, et al. Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. 2000;39.
62. Ghorbanzadeh A, Bahador A, Sarraf P, Ayar R, Fekrazad R, Asefi S. Ex vivo comparison of antibacterial efficacy of conventional chemomechanical debridement alone and in combination with light-activated disinfection and laser irradiation against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020 Mar;29:101648.