

# Evaluación de la actividad antibacteriana en una mezcla de hidróxido de calcio y clorhexidina al 0.12% como irrigante pulpar

## Segunda parte Evaluación antimicrobiana de una solución de hidróxido de calcio y una mezcla de clorhexidina e hidróxido de calcio a diferentes concentraciones y etapas de tiempo diferentes

**Keyword:** chlorhexidine, calcium hydroxide, API-STHA, API-20E, API-20NE, and API Candida systems

**Descriptor:** Clorhexidina, hidróxido de calcio, sistema API-STHA, API-20E, API-20NE y API CANDIDA

### Resumen

El propósito de presente trabajo fue determinar la eficacia antibacteriana de una mezcla de hidróxido de calcio con clorhexidina al 0.12% en comparación de una solución de hidróxido de calcio, a diferentes concentraciones: al 0.5%, concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), solución sobre saturada y en pasta, sobre cepas bacterianas de *E. faecalis*, *E. mutans*, *B. subtilis*, *A. israelii* y una mezcla de todas estas cepas bacterianas, además de comparar su efectividad sobre bacterias obtenidas de conductos necróticos o infectados de los cuales se identificaron un 30% de los gérmenes obtenidos por el sistema sistemas API-STHA, y API-20E, API-20NE y API Candida (Laboratorios BioMerilux).

Los datos obtenidos fueron analizados por una T de Student con la cual se encontró diferencia significativa con un alfa de 0.001 y para la las pruebas de difusión en agar se utilizó una prueba de Anova al 0.05.

### Introducción

Actualmente sabemos que el principal factor etiológico de las enfermedades pulpares es la caries dental. La caries dental es una desmineralización superficial de los dientes provocada por los ácidos orgánicos, fundamentalmente el ácido láctico producido por los microorganismos de la placa dentobacteriana y la ingesta rica en carbohidratos fermentables (sacarosa). Se ha reconocido como al principal microorganismo productor del ácido láctico al *Streptococcus mutans*<sup>1</sup>.

Si la caries dental no es atendida, los microorganismos y las toxinas producidas durante este proceso pasarán a través de los túbulos dentinarios y afectarán a la pulpa dental. El mecanismo inicial de defensa de la pulpa es a través de la respuesta inflamatoria, acompañada con la formación de dentina esclerótica y reparativa. Cuando el proceso carioso avanza más rápido que la elaboración de la dentina reparativa, los vasos pulpares se dilatan y se pueden observar células inflamatorias crónicas<sup>2</sup>. Si el proceso carioso no es detenido, llegará el momento en el que existirá una franca exposición de la pulpa, lo que permite una gran penetración de bacterias, restos de dentina cariosa y productos de degradación, además de la saliva, lo que favorece el crecimiento y proliferación de microorganismos. En este sitio la pulpa reacciona con la infiltración de células inflamatorias (pulpitis aguda) para posteriormente convertirse en una pulpitis crónica. En este tipo de pulpitis se puede observar la presencia de abscesos pequeños por debajo de la región expuesta y microscópicamente se observa la presencia de leucocitos

Alberto Taketoshi Furuya Meguro\*

Salvador Arroniz Padilla\*\*

Sergio Vaca Pacheco\*\*\*

Gloria Luz Paniagua Contreras\*\*\*\*

Eric Monroy Péres\*\*\*\*\*

Luciano Hernández Gomes\*\*\*\*\*

\*Profesor de la especialidad en Endoperiodontología, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

\*\*Profesor de la especialidad en Endoperiodontología, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

\*\*\*Profesor de la Carrera de Biología Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

\*\*\*\*Profesora de la Carrera de Biología Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

\*\*\*\*\*Profesor de la Carrera de Biología Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

\*\*\*\*\* Profesor de la Facultad de Química de la UNAM

● Furuya, M.A.T., Arroniz, P.S., Vaca, P.S., Paniagua, C.G.L., Monroy, P.E., Hernández, G.L. Evaluación de la actividad antibacteriana en una mezcla de hidróxido de calcio y clorhexidina al 0.12% como irrigante pulpar. Segunda parte. *Evaluación antimicrobiana de una solución de hidróxido de calcio y una mezcla de clorhexidina e hidróxido de calcio a diferentes concentraciones y etapas de tiempo diferentes*. Oral Año 8. Núm. 24. Primavera 2007. 374-379

## abstract

The aim of this study was to determine the antibacterial effectiveness of calcium hydroxide with chlorhexidine 0.12% and to compare it with a calcium hydroxide 0.5% solution at minimum inhibitory concentration (MIC), an oversaturated solution and a paste, bacterial strains of *E. faecalis*, *E. mutans*, *B. subtilis*, *A. israelii*, and a mixture of all of them was used to determine the effectiveness. Besides comparing the effectiveness between bacterial strains obtained from necrotic or infected root canals were used with the same purpose. A 30% of all the bacterial obtained were identified with API-STHA, API-20E, API-20NE, and API Candida systems by Biomerilux Laboratories.

The data obtained was analyzed with a T-student and it a significant difference was found with an 0.001 alpha and for the diffusion agar test a 0.05 ANOVA test.

polimorfonucleares vivos o muertos y otras células necróticas, además de que se pueden observar áreas de polimorfonucleares rodeadas de pus y microorganismos<sup>3</sup>.

La inflamación pulpar crónica puede ser total o parcial a nivel coronal y por lo general el tejido pulpar de la porción radicular no se encuentra inflamado, sólo se observan vasos dilatados. De seguir la exposición pulpar se puede producir necrosis en algunos casos, y en otros el tejido pulpar apical puede permanecer inflamado por períodos prolongados. Es importante señalar que la evolución de la inflamación pulpar, con la formación de un tejido inflamatorio crónico, progresivamente involucran todo el tejido pulpar del diente y éste, por ser el único tejido conectivo del organismo que se encuentra localizado dentro de paredes rígidas, que son las estructuras dentarias, ocasiona la necrosis del tejido pulpar por isquemia o pérdida del aporte sanguíneo<sup>4</sup>.

Cabe señalar que aunque la caries dental es el principal factor de la penetración de los microorganismos hacia la pulpa, otra forma importante de penetración de microorganismos a la pulpa dental es por las enfermedades periodontales cuyos microorganismos causantes pasan a través de los conductos

laterales<sup>5</sup>.

La presencia de los microorganismos en los conductos necróticos con o sin infección periapical ha sido un tema ampliamente investigado. Se ha demostrado la existencia de un sinnúmero de gérmenes dependiendo de la zona de la cual se obtiene el cultivo bacteriano. No se ha podido determinar la relación existente entre un tipo de enfermedad y un germen específico debido, probablemente, a que los cultivos son de tipo mixto<sup>6</sup>.

Durante los años 50, los microorganismos más frecuentemente aislados eran de tipo aeróbico, ya que por lo general no se utilizaban técnicas anaeróbicas para el cultivo de los microorganismos<sup>7</sup>; posteriormente, en los años 60, se empezaron a utilizar técnicas de cultivo anaeróbico por lo que se pudo observar que las bacterias encontradas con mayor frecuencia eran los anaerobios facultativos, destacando entre estos: el *Streptococcus alfa-hemolítico*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Otras especies aisladas frecuentemente incluyeron: *Enterococos*, *Difteroides*, *Micrococos*, *Staphylococcus*, *Lactobacilos* y especies de *Candida*, *Neisseria* y *Veillonella*<sup>8,9</sup>.

No es sino hasta finales de los 70 y 80 cuando se logra un avance en el perfeccionamiento de las técnicas para aislar y cultivar a los microorganismos anaerobios estrictos al utilizar medios de cultivo prerreducidos. En una revisión bibliográfica realizada acerca de la inflamación e infección pulpar y periapical, Naidorf (1972)<sup>10</sup> indica que las infecciones mixtas son las más comunes y que, debido a la amplia variedad de microorganismos que pueden estar presentes, los hallazgos o las omisiones de los investigadores pueden deberse a las técnicas de cultivo utilizadas.

En un estudio realizado posteriormente, señalan que las infecciones piógenas bucales contienen una mezcla compleja de especies bacterianas donde se relacionan las bacterias anaerobias y las facultativas.<sup>11</sup>

Los gérmenes que con mayor frecuencia están presentes en los conductos radiculares son: *Streptococcus alfa*, *beta* y *gamma-hemolíticos* y *Staphylococcus aureus*<sup>12</sup>. En las lesiones periapicales sintomáticas e inflamatorias los microorganismos anaerobios Gram negativos son el principal factor etiológico. Estos microorganismos son responsables de la inhibición quimiotáctica y fagocítica de los neutrófilos, interfieren la síntesis de anticuerpos y también con la acción de los antibióticos<sup>13</sup>, además de ser productores de enzimas y endotoxinas<sup>14</sup>, lo que da como resultado su persistencia y el dolor periapical.

En estudios recientes se ha demostrado en este tipo de lesiones la presencia de gérmenes facultativos, que son capaces de vivir tanto en ausencia como en presencia de oxígeno. Entre estos microorganismos están las *Entero-bacterias*, *Escherichia coli*, *Proteus* y *Klebsiella*. Otro hallazgo de suma importancia es la presencia de *Pseudomonas* y de *Streptococcus faecalis* en las infecciones persistentes<sup>15</sup>.

La erradicación de los microorganismos presentes en los conductos radiculares se lleva a cabo a través de la eliminación de la dentina infectada, así como la eliminación de los restos pulpares y alimenticios alojados dentro de los conductos. Esto se logra con la instrumentación de los mismos y se ha comprobado que este procedimiento permite eliminar una gran cantidad de microorganismos<sup>16</sup>, pero pueden quedar algunos alojados en zonas que por su anatomía no pueden ser instrumentadas (túbulos dentinarios, conductos accesorios, etc.). Por este motivo es necesario utilizar agentes capaces de eliminar a los microorganismos. Para este fin se utilizan los medicamentos intraconductos, que tienen como objetivo la eliminación o disminución de la flora microbiana, la prevención o disminución del dolor, la reducción de la inflamación y la estimulación de la reparación periapical<sup>17</sup>, además del arrastre mecánico tanto del lodo dentinario como de los gérmenes.

La medicación intraconductos se realiza a través de la irrigación o la colocación directa del medicamento en el conducto.

#### **Hidróxido de Calcio**

El hidróxido de calcio se obtiene por la calcinación del carbonato cálcico lo que da como resultado un polvo fino blanco, insoluble en alcohol, poco soluble en agua y con un pH alcalino que fluctúa entre 12.4 y 12.8<sup>18</sup>.

El hidróxido de calcio posee un potencial antimicrobiano, capacidad dentinogénica y osteogénica<sup>19</sup>.

El pH del hidróxido de calcio (12.4 o mayor) juega un papel muy importante en sus efectos<sup>19</sup>, tanto para eliminar a los microorganismos, como en la reparación del tejido dañado. Los iones Ca+2 y OH- liberados actúan sobre la actividad enzimática en dos formas:

1.-Inhibición de enzimas bacterianas a nivel de la membrana citoplasmática, lo que provoca lisis bacteriana.

2.-Activación de la fosfatasa alcalina, que causa efecto mineralizador.

Las principales conclusiones, a través de diversos estudios, sobre el efecto bactericida del hidróxido de calcio son:

•El pH alto (12.4) tiene un efecto destructor sobre la membrana y las estructuras proteínicas de las células bacterianas.

•El tiempo que se encuentra en contacto con los gérmenes dentro del conducto, aunque éste es el que ha originado mayor controversia.

En diversos estudios comparativos se mencionan períodos de tiempo diferentes. Byström<sup>21</sup> que se necesitan cuatro para eliminar todos los gérmenes existentes en los conductos. Por otro lado, Sadafy y col<sup>22</sup>, mencionan que se requiere de un período mínimo de 24 horas para efectuar una desinfección eficaz.

Estrela<sup>23</sup> observó que el tiempo que tarda el hidróxido de calcio para efectuar su acción bactericida sobre *Micrococcus luteus* fue de 12 horas, 24 horas para *Fusobacterium nucleatum* y *Streptococcus*, 48 horas para eliminar a la *Escherichia coli* y 72 horas para *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. También se ha comprobado que existen gérmenes sobre los cuales la acción bactericida del hidróxido de calcio es nula, como es el caso de *Streptococcus faecalis*, que junto con *Actinomyces israeli* se han reportado como responsables de un gran número de fracasos endodónticos<sup>24,25</sup>.

Además, el hidróxido de calcio por su pH alcalino es un magnífico medicamento para neutralizar la zona afectada, ya que por su acción logra alcalinizar esta zona que tiene un pH ácido.<sup>26</sup>

#### **Clorhexidina (CHX)**

Esta compuesta de dos anillos clorofenólicos, y dos grupos de biguanida conectados por un puente central de hexametileno. Este compuesto es una base fuerte y dicatiónica a niveles de pH de más de 3.5, con dos cargas positivas en cada extremo del puente de hexametileno. La naturaleza dicatiónica de la clorhexidina la hace extremadamente interactiva con los aniones, lo cual es relevante para su eficacia, seguridad, y efectos secundarios locales. Esta se presenta en solución como digluconato, gluconato o acetato de clorhexidina.

Por sus propiedades catiónicas posee gran afinidad por la pared celular de los microorganismos lo que le permite modificar las estructuras celulares superficiales, haciendo que se pierda el equilibrio osmótico, y en consecuencia, la membrana plasmática resulta extruida, se forman vesículas y precipitan el citoplasma. Estas precipitaciones inhiben la reparación de la pared celular y causan la muerte de las bacterias<sup>27</sup>. La característica principal de su capacidad bactericida es su unión a las proteínas a través de los grupos carboxilos y otras moléculas con grupos similares (fosfatos), lo cual inhibe las funciones biológicas relacionadas<sup>28</sup>.

Se ha comprobado que la clorhexidina es eficaz contra organismos Gram positivos y Gram negativos, anaerobios, anaerobios facultativos y levaduras<sup>29</sup>. En este mismo estudio se observó que los gérmenes más susceptibles fueron: *Staphylococcus*, *Streptococcus mutans*, *S. salivarius* y *Escherichia coli*. *S. sanguis* fue medianamente susceptible, y *Proteus*, *Pseudomonas* y *Klebsiella* presentaron baja susceptibilidad. De los

microorganismos anaerobios aislados, los más susceptibles fueron bacterias propiónicas y los menos, cocos Gram negativos y *Veionella*.

Los efectos colaterales causados por la utilización de la CHX a nivel bucal son mínimos, y no producen alteraciones permanentes. Entre estas alteraciones se encuentran: coloración parda amarillenta de los dientes y la lengua. El grado de las pigmentaciones parece depender de la concentración del compuesto y varía de persona a persona, además pueden existir trastornos del gusto y descamación de la mucosa. Estas mani-festaciones indeseables pueden deberse al uso de la CHX por largo tiempo o en dosis inadecuadas<sup>30</sup>.

A nivel endodóntico la utilización de la CHX ha sido de uso reciente y se han efectuado varios estudios, en los cuales se ha visto la posibilidad de su utilización fundamentalmente como irrigante pulpar. Se ha comunicado que existe buena regeneración de los tejidos sin efectos tóxicos o irritantes causados por la CHX, comparados con otros agentes irrigantes tanto in vivo como in vitro<sup>31</sup>.

La principal ventaja que posee la clorhexidina es la capacidad de seguir liberándose por un lapso de 48 a 72 horas, posterior a su aplicación<sup>32</sup>, además de no ser tóxico ni agresivo a los tejidos periapicales, por estos motivos puede ser un buen sustituto en pacientes alérgicos al hipoclorito de sodio, en dientes con ápices muy abiertos.

#### Material y metodo

##### Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Esta fase se efectuó en el cepario de la Facultad de Química de la U.N.A.M. Consistió en comprobar la efectividad bactericida de una solución de hidróxido de calcio y agua bidestilada vs solución de hidróxido de calcio con Enjuague Oral B gingivitis con clorhexidina, sobre cepas clasificadas que conforme a los reportes de la literatura endodóntica, se ha demostrado su resistencia a la acción de la solución de hidróxido de calcio y que son causantes de los fracasos de los tratamientos endodónticos<sup>33,34</sup>. Estos gérmenes fueron: *Actinomyces israeli* (ATCC 12103), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), que fueron compradas al cepario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) donada por el cepario de la Facultad de Química de la U.N.A.M.

##### Fase experimental:

###### 1. Hidratación de cepas liofilizadas

El primer paso consistió en la desinfección de las ampollitas que contienen las cepas liofilizadas, mediante el uso de etanol al 96%, posteriormente bajo la flama de un mechero se procede a abrir las ampollitas y el liofilizado se hidrata con infusión Cerebro Corazón (BHI) hasta lograr una mezcla homogénea. La mezcla se introduce en un tubo de ensayo con tapón de rosca y se incuba a 37°C durante 24 horas.

Obtenida las cepas bacterianas puras (*E. faecalis* y *P. aureoginosas*), se procedió a preparar suspensiones en solución salina isotónica con la estandarización de McFarland al 0.5 (1.5 x 10<sup>8</sup> bacterias/mL).

Por otro lado se hicieron las diluciones de los medicamentos, en las siguientes proporciones: al 8%, 6%, 4% y 2% y se colocaron en tubos con tapón de rosca, las diluciones se efectuaron de la siguiente manera:

- 8% 9.2 de agua bidestilada y .08 gr de hidróxido de calcio.
- 6% 9.4 de agua bidestilada y .06 de hidróxido de calcio.
- 4% 9.6 de agua bidestilada y .04 gr de hidróxido de calcio.
- 2% 9.8 de agua bidestilada y .02 de hidróxido de calcio.

Para la mezcla de hidróxido de calcio con clorhexidina se utilizaron las mismas proporciones, sustituyendo el agua bidestilada por clorhexidina.

Posteriormente a cada tubo de solución se le agregaron 2 mL de la suspensión de *E. faecalis* o *P. aeruginosa* ajustadas a 1.5 x 10<sup>8</sup> bacterias/mL. Los tubos se incubaron a 37°C durante 24, 48 y 72 horas y posteriormente fueron cultivadas por el método de estrías en agar tioglicolato (Difco, Mich); y se efectuó

una siembra control, las cajas se incubaron a 35°C por 24 horas y se contó el número de colonias.

##### Actinomyces israeli

Debido a que *A. israeli* es una especie anaerobia de crecimiento lento se necesitó cambiar la técnica de cultivo y de prueba de los medicamentos, ya que la incubación prolongada de las soluciones de hidróxido de calcio provoca la precipitación de este compuesto.

Por estas razones, en tubos de ensayo con tapón de rosca se prepararon soluciones de hidróxido de calcio y de la mezcla propuesta al 2% y 8% además de una solución enjuague Oral B con clorhexidina al 0.12%.

Por otro lado, se preparó una suspensión de *A. israeli* ajustando su turbidez con el tubo 0.5 de la escala de McFarland. Para ello, con una pipeta Pasteur, se tomó una alícuota de un cultivo de *A. israeli* (mantenido en BHI en un tubo de ensayo sellado con aceite mineral para evitar la penetración de oxígeno) y se suspendió en BHI hasta obtener la turbidez deseada. Posteriormente se prepararon cinco tubos de ensayo colocando en cada uno 4 mL de la suspensión bacteriana anterior. Al primer tubo se le agregaron 2 mL de la solución de hidróxido de calcio al 2%, al segundo tubo se le agregaron 2 mL de solución de hidróxido de calcio al 8%, al tercer tubo se le agregaron 2 mL de la mezcla de hidróxido de calcio y clorhexidina al 2%, al cuarto tubo se le agregaron 2 mL de la mezcla al 8%, y por último el quinto tubo de ensayo se dejó con 2 mL de enjuague oral B gingivitis con clorhexidina al 0.12%. Se incluyó un tubo control sólo con bacterias. Todos los tubos fueron sellados con una capa de aceite mineral y se incubaron a 35°C por siete días. Al cabo de este tiempo se observaron y anotaron los resultados.

##### Concentraciones sobresaturadas

En esta fase se utilizaron soluciones de los medicamentos al 50%, 25%, 12.5% y 6.25%. Las soluciones se prepararon, por duplicado, de la siguiente manera:

###### Hidróxido de calcio solo

Al 50% se utilizaron 8 mL de BHI y se le agregó 4 g de Ca(OH)<sub>2</sub>.

25% 8 mL de BHI y 2 g de Ca(OH)<sub>2</sub>.

12.5% 8 mL de BHI y 1 g de Ca(OH)<sub>2</sub>.

6.25% 8 mL de BHI y 0.5 g de Ca(OH)<sub>2</sub>.

###### Clorhexidina

50% 4 mL de BHI y 4 mL de clorhexidina.

25% 6 mL de BHI y 2 mL de clorhexidina.

12.5% 7 mL de BHI y 1 mL de clorhexidina.

6.25% 0.5 mL de BHI y 0.5 mL de clorhexidina.

###### Solución de hidróxido de calcio y clorhexidina

50% 4 mL de BHI y 4 mL de la solución de Ca(OH)<sub>2</sub> y clorhexidina (50%).

25% 6 mL de BHI y 2 mL de la solución de Ca(OH)<sub>2</sub> y clorhexidina (50%).

12.5% 7 mL de BHI y 1 mL de la solución de Ca(OH)<sub>2</sub> y clorhexidina (50%).

6.25% 7.5 mL de BHI y 0.5 mL de la solución de Ca(OH)<sub>2</sub> y clorhexidina (50%).

###### Solución de hidróxido de calcio

50% 4 mL de BHI y 4 mL de la solución de Ca(OH)<sub>2</sub> y solución salina (50%).

25% 6 mL de BHI y 2 mL de la solución de Ca(OH)<sub>2</sub> y solución salina (50%).

12.5% 7 mL de BHI y 1 mL de la solución de Ca(OH)<sub>2</sub> y solución salina (50%).

6.25% 7.5 mL de BHI y 0.5 mL de la solución de Ca(OH)<sub>2</sub> y solución salina (50%).

Además se prepararon ocho tubos control que contenían 8 mL de BHI (control).

A continuación se hicieron cuatro series de 5 tubos con concentraciones de 50%, 25%, 12.5% y 6.25% y el tubo control, los cuales se etiquetaron con el nombre y concentración del medicamento. Cada serie de tubos se inoculó con 2 mL de una suspensión de las siguientes bacterias ajustadas a 0.5 de la escala de McFarland: (Serie 1) *E. faecalis* (ATCC 29212), (Serie 2) *P. aeruginosa* (ATCC 27853), (Serie 3) *S. mutans* (ATCC 6538)

y (Serie 4) *B. subtilis* (ATCC 6633).

Todos los tubos se incubaron a 35°C y se tomaron alícuotas a las 6, 24, 48 y 72 horas, las cuales fueron sembradas por estría en medio de agar BHI incubadas a 35 °C por 24 horas.

#### Prueba de difusión en pozos

En esta fase se determinó la efectividad antimicrobiana de una pasta de hidróxido de calcio y solución salina, una pasta de hidróxido de calcio y clorhexidina, solución de hidróxido de calcio sobre saturada y clorhexidina al 0.12% (enjuague oral B con clorhexidina). Se incluyó un control de agua bidestilada. La técnica utilizada fue difusión en pozos, utilizando agar Mueller Hinton, con inóculos bacterianos de 3 x 10<sup>8</sup> células/mL.

#### Procedimiento:

Se procedió a preparar cinco cajas de Petri con agar Muller Hinton a las cuales se le efectuaron pozos de 5 mm de diámetro para posteriormente efectuar un sembrado masivo utilizando un isopo estéril: La caja 1 se inocularó con *E. faecalis*, la caja 2 con *B. subtilis*, caja 3 con *P. aeruginosa*, la caja 4 con *S. mutans* y por último la caja 5 con una mezcla de todas las bacterias antes mencionadas.

Se procedió a colocar los medicamentos en los pozos de la siguiente manera:

Pozo 1: Agua bidestilada (control).

Pozo 2: Clorhexidina (Enjuague oral B con clorhexidina al 0.12%).

Pozo 3: Solución sobre concentrada de hidróxido de calcio (en agua bidestilada).

Pozo 4: Pasta de hidróxido de calcio con clorhexidina (enjuague oral B con clorhexidina al 0.12%).

Pozo 5: Pasta de hidróxido de calcio con agua bidestilada.

Las cajas se incubaron a 35°C por 24 horas para posteriormente medir los halos de inhibición y efectuar un análisis de varianzas con 0.5 grados de libertad y una prueba LSD.

#### Resultados

Resultados de la etapa a concentraciones mínimas inhibitorias (CMI).

La acción del hidróxido de calcio sobre el *E. faecalis* fue nula a todas las concentraciones a las 24, y 48 horas, requiriendo de 72 horas para poder ser efectivo, mientras que la solución de hidróxido de calcio con clorhexidina al 2% y 4% fue efectiva desde las 24 horas, lo que nos da el indicio de que el *E. faecalis* es más susceptible a la clorhexidina. Mientras que las concentraciones de 6 y 8% tardaron 48 horas para lograr el mismo efecto.

Solución	Número de colonias			
	8%	6%	4%	2%
24 horas	33	117	500	505
48 horas	10	75	98	115
72 horas	0	0	0	0

Tabla 1

Efecto de las soluciones del hidróxido de calcio sobre *E. faecalis*

Solución	Número de colonias			
	8%	6%	4%	2%
24 horas	15	4	0	0
48 horas	0	0	0	0
72 horas	0	0	0	0

Tabla 2

Efecto de las soluciones del hidróxido de calcio con clorhexidina sobre *E. faecalis*

Con la *P. aeruginosa* la acción del hidróxido de calcio requirió de 72 horas para ser efectivo a todas las concentraciones, mientras con la solución de hidróxido de calcio con clorhexidina a la concentración de 8%, se vio efectividad desde las 24 horas y las demás concentraciones fueron efectivas a las 48 horas.

Solución	Número de colonias			
	8%	6%	4%	2%
24 horas	100	125	133	150
48 horas	55	75	80	97
72 horas	0	0	0	0

Tabla 3

Efecto de las soluciones del hidróxido de calcio sobre *P. aeruginosa*

Solución	Número de colonias			
	8%	6%	4%	2%
24 horas	0	75	80	68
48 horas	0	0	0	0
72 horas	0	0	0	0

Tabla 4

Efecto de las soluciones del hidróxido de calcio con clorhexidina sobre *P. aeruginosa*

Nota: El Número de colonias se debe de multiplicar por 1000 para dar el total de colonias, además el contacto del medicamento con las cepas originó un retardo en el crecimiento, por lo que la observación se efectuó siempre 12 horas después.

Todos los controles presentaron un número incontable de colonias.

Tanto la solución de hidróxido de calcio con agua bidestilada, como la de hidróxido de calcio con clorhexidina no son efectivas sobre el *A. israeli*, y si lo es la clorhexidina al 0.12%.

#### Efectos de los medicamentos a concentraciones de 50%, 25%, 12.5 y 6.25% sobre *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *S. Mutans* y *B. subtilis*.

Todos los medicamentos probados fueron efectivos contra *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* y *E. mutans*, fueron efectivos desde las seis horas a todas las concentraciones, solo el enjuague Oral B (con clorhexidina al 0.12%) a las concentraciones de 6.25% y 12.5 % dieron resultados positivos de 133 colonias y 24 colonias, aumentando el número de colonias en la concentración de 6.25% a 259 colonias a las 24 horas y a las 72 horas incontables, lo cual nos indica que clorhexidina a concentraciones por debajo de 0.12% no es efectiva contra la *P. aeruginosa*.

Tabla 5

Hidróxido de calcio puro + BHI a las 6 horas

	6.25%	12.5%	25%	50%	control
<i>P. aeruginosa</i>	----	----	----	----	++++
<i>E. faecalis</i>	----	----	----	----	++++
<i>B. subtilis</i>	----	----	----	----	++++
<i>S. mutans</i>	----	----	----	----	++++

---- = 0 colonias

++++ = colonias incontables

(continuación Tabla 5)

Enjuague Oral B con clorhexidina al 0.12% + BHI

	6.25%	12.5%	25%	50%	control
<i>P. aeruginosa</i>	113	24	----	----	++++
<i>E. faecalis</i>	----	----	----	----	++++
<i>B. subtilis</i>	----	----	----	----	++++
<i>S. mutans</i>	----	----	----	----	++++

---- = 0 colonias  
++++ = colonias incontables

Solución de hidróxido de calcio y clorhexidina

	6.25%	12.5%	25%	50%	control
<i>P. aeruginosa</i>	----	----	----	----	++++
<i>E. faecalis</i>	----	----	----	----	++++
<i>B. subtilis</i>	----	----	----	----	++++
<i>S. mutans</i>	----	----	----	----	++++

---- = 0 colonias  
++++ = colonias incontables

Solución de hidróxido de calcio

	6.25%	12.5%	25%	50%	control
<i>P. aeruginosa</i>	----	----	----	----	++++
<i>E. faecalis</i>	----	----	----	----	++++
<i>B. subtilis</i>	----	----	----	----	++++
<i>S. mutans</i>	----	----	----	----	++++

---- = 0 colonias  
++++ = colonias incontables

(continuación Tabla 6)

Solución de hidróxido de calcio y clorhexidina

	6.25%	12.5%	25%	50%	control
<i>P. aeruginosa</i>	----	----	----	----	++++
<i>E. faecalis</i>	----	----	----	----	++++
<i>B. subtilis</i>	----	----	----	----	++++
<i>S. mutans</i>	----	----	----	----	++++

---- = 0 colonias  
++++ = colonias incontables

Solución de hidróxido de calcio

	6.25%	12.5%	25%	50%	control
<i>P. aeruginosa</i>	----	----	----	----	++++
<i>E. faecalis</i>	----	----	----	----	++++
<i>B. subtilis</i>	----	----	----	----	++++
<i>S. mutans</i>	----	----	----	----	++++

---- = 0 colonias  
++++ = colonias incontables

#### Resultados de la etapa de difusión

Se encontro mejor efecto antimicrobiano de la clorhexidina seguido de la pasta de hidróxido de calcio con clorhexidina.

	<i>E. aureus</i>	<i>P. Pseudo-monas</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. faecalis</i>	Mezcla de microorganismos
Clorhexidina	9 mm	6.4 mm	9 mm	9 mm	7 mm
Sol de hidro.	6.2 mm	6.6 mm	6.4 mm	6.4 mm	6.8 mm
Pasta de hidro.	5.3 mm	6.4 mm	7.2 mm	6.4 mm	7 mm
Mezcla de hidro y clor.	7 mm	7 mm	7.2 mm	6.6 mm	7.4 mm
Control	XXXX*	XXXX*	XXXX*	XXXX*	XXXX*

Tabla 7  
Prueba de difusión

Todos los controles resultaron positivos con un número incontable de bacterias

Al análisis estadístico ANOVA, se encontró una diferencia significativa con un alfa de 0.05 entre la acción germicida de las sustancias a evaluar, ya que la F calculada (3.4780) es mayor la a F de tablas (1.7184).

A la prueba LSD el medicamento que tiene mejor antimicrobiano es la clorhexidina, seguido de la pasta de hidróxido de calcio con clorhexidina, después la pasta de hidróxido de calcio y por último la solución de hidróxido de calcio.

La clorhexidina tiene mejor efecto sobre el *E. aureus*, *B. subtilis* y *E. Faecalis*.

Mientras que la pasta de hidróxido de calcio con clorhexidina tiene mejor efecto sobre la *P. aeruginosa*s y la mezcla de todos los microorganismos. (Ver gráfico 1 en la siguiente página).

#### Discusión

El período en el cual el hidróxido de calcio es efectivo para eliminar a los microorganismos varia desde una semana hasta cuatro semanas<sup>19</sup>, dependiendo del tipo de microorganismo, susceptibilidad al medicamento y la concentración del mismo, a este respecto se ha reportado que el hidróxido de calcio requiere

Tabla 6

Hidróxido de calcio puro + BHI a las 24 horas

	6.25%	12.5%	25%	50%	control
<i>P. aeruginosa</i>	----	----	----	----	++++
<i>E. faecalis</i>	----	----	----	----	++++
<i>B. subtilis</i>	----	----	----	----	++++
<i>S. mutans</i>	----	----	----	----	++++

---- = 0 colonias  
++++ = colonias incontables

Enjuague Oral B con clorhexidina al 0.12% + BHI

	6.25%	12.5%	25%	50%	control
<i>P. aeruginosa</i>	259	0	----	----	++++
<i>E. faecalis</i>	----	----	----	----	++++
<i>B. subtilis</i>	----	----	----	----	++++
<i>S. mutans</i>	----	----	----	----	++++

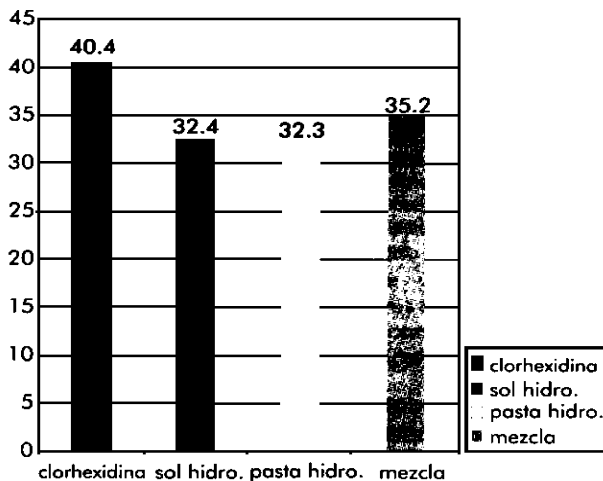
---- = 0 colonias  
++++ = colonias incontables

de 72 horas para eliminar a la *Pseudomonas aeruginosa*<sup>21</sup>, observación que fue verificada en el presente estudio a concentraciones mínimas inhibitorias (CIM), se comprobó en este estudio que a mayor concentración y tiempo en el cual está en contacto el medicamento con los microorganismos, el número de colonias disminuyen.

Los estudios efectuados sobre la inefectividad de la acción del hidróxido de calcio en contra del *Actinomyces israelii*<sup>23</sup> fueron corroborados, ya que no existió ninguna acción antimicrobiana con la solución de hidróxido de calcio a las concentraciones del 2% ni del 8% y la acción de la mezcla propuesta tampoco fue efectiva.

La potencialización de la mezcla se debe en primer lugar a su alto pH, y en segundo lugar a la incorporación de la clorhexidina, que por sí sola es capaz de eliminar a un número significativo de bacterias, muchas de las cuales son flora de los conductos radiculares infectados o necróticos<sup>9</sup>.

Gráfica 1  
mm de inhibición por la prueba  
de difusión en agar



### Conclusiones

- 1) Los resultados obtenidos en esta investigación son muy alentadores, las pruebas microbiológicas efectuadas, demostraron que si se logró una potencialización en la actividad antimicrobiana al mezclar hidróxido de calcio con clorhexidina.
- 2) La disminución bacteriana se relacionó con el tipo de microorganismo, susceptibilidad al medicamento, concentración del mismo y al tiempo en el cual esté en contacto con los microorganismos.
- 3) La efectividad antimicrobiana de la mezcla, esta dada en primer lugar por la clorhexidina en sí, aunado al pH que presenta al unirlo al hidróxido de calcio (12.6). El pH de la mezcla, por ser igual al del hidróxido de calcio también puede producir dentinogénesis, osteogénesis y control de exudados, por efecto de la liberación de los iones calcio e hidroxilo por efecto de la liberación de los iones calcio e hidroxilo. Además por ser un pH alcalino va a la neutralizar la zona infectada, ayudando a la eliminación de los microorganismos.
- 4) La mezcla propuesta comprobó ser efectiva contra el *E. Faecalis* y *P. Aeruginosas*.
- 5) Tanto el hidróxido de calcio con clorhexidina y la solución de hidróxido de calcio, no son efectivos contra el *Actinomyces israelii*.
- 6) A concentraciones mínimas inhibitorias no se recomienda el uso de la mezcla propuesta ya que causa retardo en el crecimiento y requiere de un lapso mayor para eliminar a los microorganismos.
- 7) Se debe de utilizar la mezcla propuesta a soluciones sobre saturadas ya que demostró su eficacia desde las seis horas.

- 8) Los efectos adversos de la clorhexidina como son el cambio de color de los órganos dentarios (color pardo amarillento), la pérdida de la sensación del sabor y la descamación, no se presentarían al utilizar la mezcla propuesta ya que se utilizaría en cavidades cerradas y por un tiempo mínimo.
- 9) No se recomienda la utilización de la mezcla propuesta como solución irrigadora en primera instancia, ya que existen soluciones irrigadoras que poseen mayor efectividad antimicrobiana (hipoclorito de sodio).
- 10) La utilización de la mezcla propuesta en forma de pasta se debe de utilizar solo en casos de infecciones persistentes, cuando se pretenda formar la apexificación de raíces infectadas.
- 11) Se recomienda en la medicación intra conductos con la mezcla de hidróxido de calcio y clorhexidina, cuando existan ápices abiertos, o alergia al hipoclorito de sodio. Aunque los resultados son halagadores, se recomienda continuar la investigación y efectuarlos in vivo.
- 12) Los microorganismos que con mayor frecuencia se encuentran en los conductos infectados o necróticos son los *Staphylococcus*.
- 13) La clorhexidina tiene mayor efecto bactericida sobre el *E. Faecalis*, *B. Subtilis* y *E. Mutans*, y el *A. Israeli*, mientras que la mezcla propuesta tiene mejor efecto sobre la *P. aeruginosa* y la mezcla del *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *B. Subtilis*, y *E. Mutans*.

### Bibliografía

- 1.-Wicox, M.D.P., Drucker, D.B. In vitro adherence of oral Streptococci in the presence of sucrose and its relationship to cariogenicity in the rat. Arch. Of Oral Biol. 1988, Vol 33: No. 2: 135-141.
- 2.-Okiji, T., Morita, I., Kobayashi, C., Sunada, I., Murota, S. Arachidonic-acid metabolism in normal and experimentally-inflamed rat dental pulp. Arch. Oral-Biol. 1987; 32(10): 723-7.
- 3.-Torneck, C.: A report of studies into changes in the fine structure of dental pulp in human caries pulpitis JOE, 7:8 1981
- 4.-Seltzer, S., Bender, I.B., Zionts, M. The dynamics of pulp inflammation: correlations between diagnostic data and actual histologic findings in the pulp. Oral Surg., 16:846, July, 1963.
- 5.-Böler, I.B., Seltzer, S. The effect of periodontal disease on the pulp. Oral Sur., 33:458, 1972.
- 6.-Sundqvist, G. Ecology of the root canal flora. JOE, 18:427, Sept. 1992.
- 7.-MacDonald, J.B., Hare, C.C., Wood, A.W.S. 1957. The bacteriological status of the pulp chambers in intact teeth found to be nonvital following trauma. Oral Surg. 10:318.
- 8.-Sulitzeanu, A., Beutner, E.H., Epstein, L.I. 1964. Bacteriological studies of pulp-involved teeth by cultural and microscopic methods JAm Dent Assoc. 69:300.
- 9.-Morse, D.R. 1981. Endodontic microbiology in the 1970s Int Endod J. 14:69.
- 10.-Naidorf, I.J. 1972. Inflammation and infection of pulp and periapical tissues Oral Surg. 34:486.
- 11.-Sunqvist, G.K., Eckerbom, Sjogren, Ut. Capacity of anaerobic bacteria from necrotic pulps to induce purulent infections. Infect Immun. 1979; 25: 685-93.
- 12.-Camling and Kohler, P. Infection with the bacterium Streptococcus Arch of Oral Biol. 1987. Vol 32.No. 11: 817-823.
- 13.-Estrela, C. César, O.V.S., Sydney, G.B., López, H.P., Pesce, H.F. Incidência de dor frente ao tratamento da inflamação periapical aguda e crônica. Rev. Bras. Odontol., v.53, n.4, p. 15-19, ago./set. 1996.
- 14.-Dahlén, G., Bergenholz, G. Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps. J Dent Res 1980. 59: 1033-40.
- 15.-Paul, A. Farber, DDS, Phd., Samuel, Seltzer, DDS. Endodontic Microbiology I. Etiology Journal of Endodontics 1988 p. 363-371.
- 16.-Bystron, A.; Sundqvist, G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. Scand. J. Dent. Res., v. 89, p.321-328, 1981.
- 17.-Ingle, Ide J, Barkland, K.Leif: Endodancia Ed. Mc Graw - Hill Interamericana 4 ed: P.668
- 18.-Fava, L. Calcium Hydroxide pastes: classifications and clinical indications. J-Int-Endod-J. 1999; 32:257-282.
- 19.-Maisto y Capurro. Root canal treatment with calcium hydroxide effect of an oily or a water soluble vehicle. 1981, 69, 7-17. Rev. Assoc. Odont. Argent.
- 20.-Estrela, C., Pesce, H.F. (1996) Chemical analysis of the liberation of calcium and hydroxyl ions from calcium hydroxide pastes in connective tissue in dog. Part I. Brazilian Dental Journal 41.6
- 21.-Byström, A., Claesson, R., Sundqvist, G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. Endodont. Dent. Traumatol. 1: 170, 1985.
- 22.-Safavi, K.E., Dowden, W.E., Intracaso, J.H., Longeland, K. A comparison of antimicrobial effects of calcium hydroxide and iodine potassium iodide. JOE 11: 454, 1985.
- 23.-Estrela, C., Pimento, Fc., Ito, I.Y., Bamman, L.L. In vitro determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide J. Endo. 1996 Sep. 29:5. 320.6
- 24.-Sundqvist, G., Figdor, D., Persson, S., Sjogren, 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. 85(1):86-93 1998 Jan.
- 25.-José, F., Siqueira, Jr., DDS, MSc, Milton de Uzeda, DDS, MSc, DSC. Intracanal Medicaments: Evaluation of the Antibacterial Effects of Chlorhexidine, Metronidazole, and Calcium Hydroxide Associated with Tree Vehicles. Journal of Endodontics 1997. 167: 169.
- 26.-Transtad, L., Andreass, J.O., Hasselgren, G., Kristerson, L e Riis. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. J Endodon 7(11):17-21 1981).
- 27.-Davies, A. The mode of action of chlorhexidine. Journal of Periodontal research 88: 12: 68-73. 1973
- 28.-Korman, K.S. Antimicrobial agents state of the science review. In Loe H. and Kleinman. D. editors Dental plaque control measure on oral hygiene practices Oxford 1986. IRL Press.
- 29.-Emilsson, G.C., Krasse, B., Westergren, G. Effect of a fluoride-containing chlorhexidine gel on bacteria in human plaque. J Dent. Res 84(6):377-380, 1976.
- 30.-Ellingsen, J., Ralla, Erihsenti. Extrinsic dental stain cause by chlorhexidine and other denaturing agents. J. Clin. Periodontol.:317, 1982.
- 31.-Wennerberg, A. Biological evaluation of root canal antiseptic using in vitro and in vivo methods. J. Dent. Res 88(1) 46-52, 1982.
- 32.-Medina, A. La clorhexidina como solución irrigadora en la terapia 2.5% sodium hipoclorito and 0.2 clorhexidina gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. J. Endod. 1998 Jul. 24:7. 472-6.
- 33.-Sundqvist, G., Figdor, D., Persson, S., Sjogren, 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. 85(1):86-93 1998 Jan.
- 34.-José, F. Siqueira, Jr., DDS, MSc., Milton de Uzeda, DDS, Msc, DSC. Intracanal Medicaments: Evaluation of the Antibacterial Effects of Chlorhexidine, Metronidazole, and Calcium Hydroxide Associated with tree Vehicles. Journal of Endodontics 1997. 167: 169.