

EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL HIDRÓXIDO DE CALCIO EN DOS PREPARACIONES EN PRESENCIA DE *ENTEROCOCCO FAECALIS*

¹ Leonor Martínez S., ² Hilda Patricia Acosta L., ² Martha Lucely Duarte M.
¹ Residente de II año, posgrado de endodoncia, U. Santo Tomás,
Docente, U. Santo Tomás, ² Residente de II año, posgrado de endodoncia, U. Santo Tomás

Autor responsable de correspondencia: Dra. Leonor Martínez S.
Correo electrónico: leonormasa@yahoo.com

RESUMEN

Objetivo: Analizar el efecto antimicrobiano de dos diferentes mezclas de hidróxido de calcio, con propilenglicol y con gluconato de clorhexidina sobre *Enterococo faecalis* (ATCC 29212).

Materiales y métodos: Mediante un estudio experimental in vitro, se evaluó el efecto del hidróxido de calcio puro, del hidróxido de calcio con gluconato de clorhexidina al 13% y del hidróxido de calcio con propilenglicol sobre el crecimiento de *Enterococo faecalis*. Se utilizaron diluciones de *E. faecalis* de 1.5×10^7 y 1.5×10^8 en tripticasa soya, a las que se agregaron 100 mgs de cada medicamento. Posteriormente, se sembraron en un medio de Agar Mueller Hinton, en los siguientes tiempos: 1, 20, 60, 80 y 120 minutos de contacto directo con la cepa de *E. faecalis*. Se llevaron a incubación a 37° Centígrados para observar las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) a las 24, 48 y 72 horas. Las lecturas de las siembras se realizaron bajo la supervisión de un solo operador.

Resultados: Se encontraron algunas UFC al minuto de estar el hidróxido de calcio puro en contacto directo con el microorganismo. A diferencia de los demás grupos del estudio, en los que, desde un minuto, los recuentos de UFC fueron cero. El gluconato de clorhexidina utilizado al 13% mostró un mejor comportamiento. Sin embargo, los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas. [Martínez L, Acosta H, Duarte ML. Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana del hidróxido de calcio en dos preparaciones en presencia de *Enterococo faecalis*. Ustasalud Odontología 2004; 3: 71 - 76]

Palabras clave: Hidróxido de calcio, Gluconato de clorhexidina, Propilenglicol, *Enterococo faecalis*.

IN VITRO ASSESSMENT OF ANTIMICROBIAN ACTIVITY OF CALCIUM HYDROXIDE IN TWO PREPARATIONS IN PRESENCE OF *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

ABSTRACT

Objective: To assess the antimicrobial effect of two different mixes of calcium hydroxide: with propylenglycol and with chlorhexidine gluconate on *Enterococcus faecalis* (ATCC29212).

Material and methods: Through an experimental in vitro study two agents were tested: pure calcium hydroxide, calcium hydroxide with 13% chlorhexidine gluconate, and calcium hydroxide with propylenglycol. *E. faecalis* dilutions at 1.5×10^7 and 1.5×10^8 in soy trypticase were used, to which 100 mg. of each agent were added. They were cultured in Agar Mueller Hinton medium at these intervals: 1, 20, 60, 80, and 120 minutes in direct contact with *E. Faecalis* strain. They were then incubated at 37° Centigrades, to observe Colony Forming Units (CFU) at 24, 48, and 72 hours. Culture readings were conducted under supervision of one sole operator.

Results: Some CFU's were found after one minute of direct contact between microorganism and pure calcium hydroxide, in contrast with other study groups whose CFU readings were zero after one-minute contact. Chlorhexidine gluconate used at 13% showed a better performance; however, results showed no statistically significant differences.

Key words: Calcium hydroxide, Chlorhexidine gluconate, Propylenglycol, *Enterococcus faecalis*.

Recibido para publicación: 10 de agosto de 2004. Aceptado para publicación: 12 de octubre de 2004.

INTRODUCCIÓN

El éxito de la terapia pulpar depende del correcto debridamiento y esterilización, así como de la obturación del conducto radicular que debe asegurar un selle permanente del conducto. Siendo controversial para muchos odontólogos el uso o no de medicamentos intraconductos, el hidróxido de calcio sigue siendo el material más estudiado y empleado entre citas, para el tratamiento de infecciones radiculares primarias y en retratamientos endodónticos.^{1,2}

El hidróxido de calcio se utiliza en trauma, reabsorciones externas, lesiones cariosas profundas con ápices abiertos para estimular la formación de tejido calcificado. En presencia de reabsorciones internas, en dientes no vitales con infecciones bacterianas de larga evolución y en casos de fracasos endodónticos, en los cuales actúa controlando el crecimiento bacteriano y estableciendo un medio favorable para la reparación periapical;^{1,2} en caso de reabsorciones externas creando un ambiente favorable para su detención.^{3,5}

Numerosas y variadas bacterias aerobias, anaerobias estrictas y facultativas componen una lesión perirradicular; sin embargo, parece ser que la flora es muy diferente en los dientes con lesiones periapicales persistentes y en los casos de fracaso de una terapia endodóntica.⁶ Uno de los microorganismos más frecuentes es *Enterococo faecalis* debido a que es capaz de sobrevivir en un medio ambiente alcalino con un pH de 11.5, que lo hace resistente en muchas ocasiones a las diferentes terapias endodónticas.⁶

El hidróxido de calcio es usado en diferentes mezclas, con vehículos como: gluconato de clorhexidina y propilenglicol, entre otros, los cuales, al ser llevados al conducto de manera adecuada buscan potenciar la acción antimicrobiana de éste.⁷

El propósito de este estudio fue analizar el efecto antimicrobiano de dos diferentes mezclas de hidróxido de calcio: con propilenglicol y con gluconato de clorhexidina, sobre *Enterococo faecalis* (ATCC 29212), mediante un método experimental in vitro.

Enterococo faecalis es un microorganismo utilizado exitosamente en previas investigaciones, fue seleccionado en este estudio por ser un patógeno asociado con la

periodontitis apical persistente, en dientes tratados endodónticamente; es un microorganismo facultativo, fácil de cultivar, y es uno de los más resistentes de la flora del conducto radicular.

MATERIALES Y METODOS

Se realizó un estudio experimental in vitro con cuatro grupos utilizando *Enterococo faecalis*, cepa estandarizada ATCC 29212, obtenida a través del INAS (Instituto Nacional de Salud).

1. *Enterococo faecalis* (Control positivo).
2. *Enterococo faecalis* vs. Ca(OH)₂ (Eufar®)
3. *Enterococo faecalis* vs. Mezcla de Ca(OH)₂ (Eufar®) + Gluconato de clorhexidina al 13% (SIGMA®).
4. *Enterococo faecalis* vs. Mezcla de Ca(OH)₂ (Eufar®) + Propilenglicol (Laboratorios León).

Se definió una muestra de conveniencia representada por ensayos dobles en 1, 20, 60, 80 y 120 minutos y dos diluciones, de acuerdo con la escala de McFarland, que indica la cantidad de microorganismos por ml. De esta manera, se seleccionaron las diluciones de 10⁻⁷ y 10⁻⁸ para cada grupo de estudio. Se realizó un recuento de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC), en tres tiempos de lectura para verificar el crecimiento de la cepa a 24, 48 y 72 horas.

Se realizó una descripción inicial de los resultados, según el recuento de UFC para cada grupo de estudio en los diferentes períodos de tiempo en promedios y rangos. La comparación de los promedios entre los grupos de estudio se realizó aplicando un análisis de varianza ANOVA, de mediciones repetidas.

La base de datos se elaboró en Excel y el análisis en STATA 6.0 considerando un nivel de significancia < 0.05.^{8,9}

RESULTADOS

La evaluación de la reproducibilidad de los recuentos, se determinó al comparar los promedios de UFC, por ensayo, considerando la dilución y el grupo de estudio. Los datos se presentan en la Tabla 1, cuyo análisis permite confirmar que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas (p > 0.19) por ensayo; los

Dilución	Grupo	Ensayo	Media ± DE	P
10 ⁻⁷	1	1	179 ± 22	0.28
		2	162 ± 23	
	2	1	6 ± 13	0.92
		2	5 ± 12	
	3	1	0	--
		2	0	
	4	1	2 ± 2	0.19
		2	0.6 ± 1	
10 ⁻⁸	1	1	39 ± 26	0.76
		2	34 ± 23	
	2	1	0	--
		2	0	
	3	1	0	--
		2	0	
	4	1	0.8 ± 1.3	0.21
		2	0	

Tabla 1. Análisis de reproducibilidad de los recuentos a las 24 horas por dilución y grupo de estudio.

T. de lectura	Grupo	Dilución	Media ± DE	P
24	1	10 ⁻⁷	171 ± 23	<0.0001
		10 ⁻⁸	37 ± 23	
	2	10 ⁻⁷	6 ± 12	0.15
		10 ⁻⁸	0	
	3	10 ⁻⁷	0	0.15
		10 ⁻⁸	0	
	4	10 ⁻⁷	1 ± 1.6	0.15
		10 ⁻⁸	0.4 ± 1	

Tabla 2. Análisis de las diferencias de recuentos de UFC por grupo de estudio y dilución a las 24 horas.

recuentos son reproducibles y se valida la técnica de siembra. Hallazgos similares se detectaron a las 48 y 72 horas de lectura.

Los recuentos de UFC, a las 24 horas, mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las diluciones para el grupo 1, lo cual estuvo a favor del procedimiento técnico (Tabla 2).

Los grupos 2 y 4 no mostraron diferencias estadísticamente significativas, probablemente debido al bajo recuento; el grupo 3 no permitió detectar crecimiento bacteriano. Se observaron hallazgos similares a las 48 y 72 horas de lectura.

La tendencia de los recuentos para cada grupo de estudio se muestra en las Figuras 1 a 6. El grupo control (gru-

po 1) muestra la tendencia normal de crecimiento bacteriano, con fase exponencial, plateau y descenso.

En el grupo de Ca(OH)₂ puro, en la dilución de 10⁻⁷ se observaron al minuto, (tiempo 0), pocas UFC; a partir de los 20 minutos, el recuento de UFC fue nulo; mientras en la dilución de 10⁻⁸, a partir del minuto, el recuento de UFC fue 0.

En el grupo de Ca(OH)₂ con gluconato de clorhexidina (grupo 3) y en el grupo de Ca(OH)₂ con propilenglicol (grupo 4) en las dos diluciones utilizadas, a partir del minuto, el recuento de UFC fue cero. Los mismos recuentos de UFC fueron observados en las lecturas realizadas a las 48 y 72 horas (Figuras 3 - 6).

Por otra parte, el análisis de varianza de mediciones repetidas permitió establecer que no hay diferencias estadísticamente significativas en los tiempos de exposición de la cepa en las diluciones 10⁻⁷ y 10⁻⁸ en cada uno de los tres tiempos de lectura (Tabla 3).

T. de lectura	Dilución	* p (T. de exp.)	P (Grupo)
24	10 ⁻⁷	0.096	0.097
	10 ⁻⁸	0.21	0.38
48	10 ⁻⁷	0.09	0.09
	10 ⁻⁸	0.36	0.38
72	10 ⁻⁷	0.09	0.09
	10 ⁻⁸	0.38	0.36

*P (probabilidad-análisis de varianza de mediciones repetidas)

Tabla 3. Resultados del análisis de varianza de mediciones repetidas para evaluar el efecto del tiempo y el grupo de tratamiento sobre los recuentos de UFC en cada tiempo de lectura y dilución.

Por otro lado, al comparar los promedios de recuentos entre los grupos 2, 3 y 4, es decir, entre Ca(OH)₂ puro, Ca(OH)₂ con gluconato de clorhexidina y Ca(OH)₂ con propilenglicol, tampoco se detectaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 4).

DISCUSIÓN

El hidróxido de calcio fue el medicamento seleccionado para este estudio, ya que es el medicamento intraconducto más utilizado y controvertido, en cuanto a su eficacia contra *E. faecalis*.¹⁰ La actividad

Tiempo	Dilución	Grupo	Media \pm DE	P*
24	10^{-7}	2	5.8 \pm 12.2	0.43
		3	0	
		4	1.3 \pm 1.6	
	10^{-8}	2	0	
		3	0	
		4	0.4 \pm 1.0	
48	10^{-7}	2	4.8 \pm 10.2	0.30
		3	0	
		4	1 \pm 1.8	
	10^{-8}	2	0	
		3	0	
		4	0.1 \pm 0.3	
72	10^{-7}	2	5.6 \pm 11.9	0.29
		3	0	
		4	1 \pm 1.8	
	10^{-8}	2	0	
		3	0	
		4	0.1 \pm 0.32	

Tabla 4. Análisis de varianza de los recuentos por tiempo de lectura, dilución y grupo de estudio.

antimicrobiana del hidróxido de calcio, dada por su pH alto, está relacionada con la liberación de iones hidróxido en medio acuoso, que requiere un tiempo ideal para la destrucción efectiva del microorganismo. El efecto letal de los iones hidróxidos sobre el *E. faecalis* es probablemente debido a los siguientes mecanismos: a) daño en la membrana citoplasmática bacteriana, b) desnaturalización de proteínas y c) daño en el DNA.¹¹

Para que el hidróxido de calcio, sea efectivo contra las bacterias localizadas en el interior de los túbulos dentinales, el ión hidróxido del hidróxido de calcio, debe difundirse en concentraciones suficientes y exceder la capacidad buffer, reaccionando a niveles de pH suficientes para destruir la bacteria.

Otro mecanismo que explica su actividad antimicrobiana es la capacidad que tiene el hidróxido de calcio para absorber dióxido de carbono, esencial para las bacterias; por tanto, su uso podría interrumpir la interrelación nutricional eliminando algunas bacterias necesarias para el crecimiento de otras, o permitiendo la presencia de bacterias, que inhiben el crecimiento de otras.

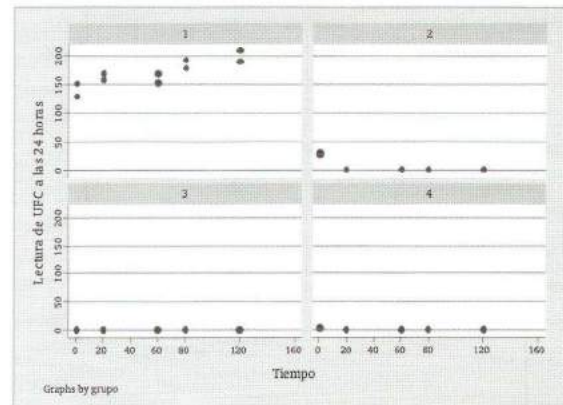


Figura 1. Recuento de colonias por grupo de estudio y tiempo en dilución 10^{-7} a las 24 horas.

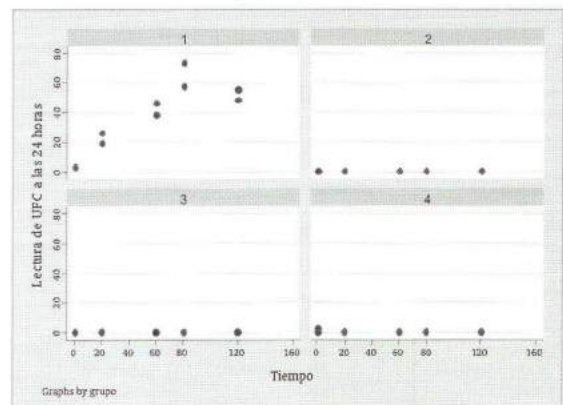


Figura 2. Recuento de colonias por grupo de estudio y tiempo en dilución 10^{-8} a las 24 horas.

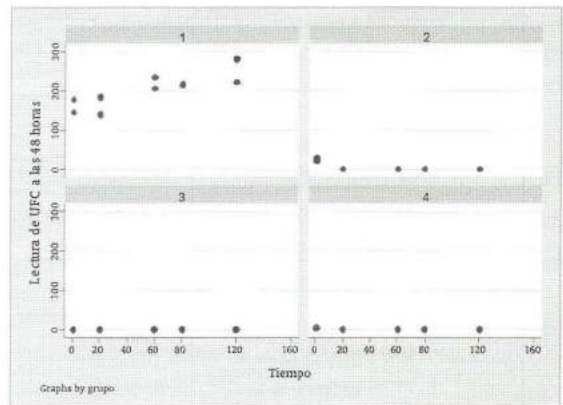


Figura 3. Recuento de colonias por grupo de estudio y tiempo en dilución 10^{-7} a las 48 horas.

El tiempo necesario para un efecto óptimo del hidróxido de calcio, en el conducto infectado no se conoce aún. Puede estar relacionado con la presencia o ausencia de exudado del conducto, tipo de microorganismo involucrado, localización del microorganismo en el conducto y presencia o ausencia de smear layer. En este estudio, en el que se utilizó hidróxido de calcio mezclado con dos vehi-

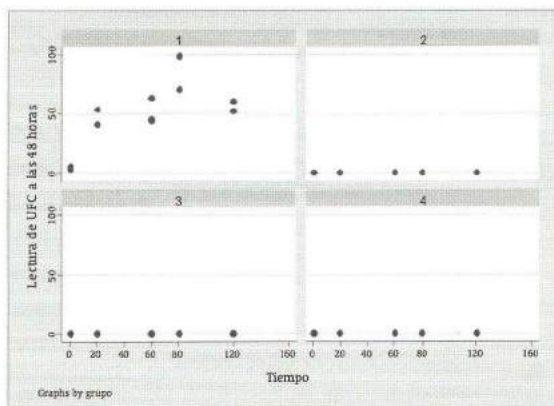


Figura 4. Recuento de colonias por grupo de estudio y tiempo en dilución 10^8 a las 48 horas.

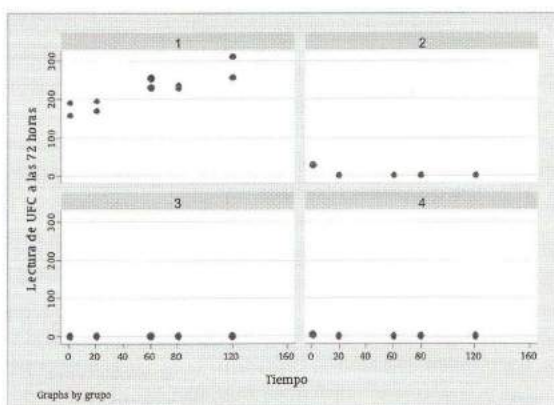


Figura 5. Recuento de colonias por grupo de estudio y tiempo en dilución 10^7 a las 72 horas.

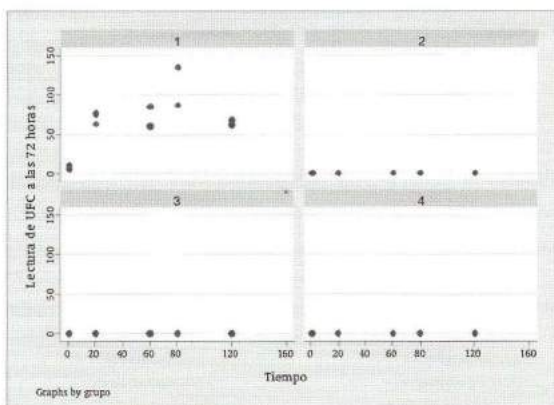


Figura 6. Recuento de colonias por grupo de estudio y tiempo en dilución 10^8 a las 72 horas.

culos (gluconato de clorhexidina y propilenglicol) se presentó una acción antimicrobiana similar, al estar en contacto directo con el medio de cultivo en un periodo de 20 minutos.

El grupo de hidróxido de calcio puro mostró al minuto de estar en contacto con el microorganismo pocas UFC, y a

partir de los 20 minutos el recuento de UFC fue cero. A diferencia de los grupos en los que se utilizaron vehículos de gluconato de clorhexidina y propilenglicol, los cuales presentaron una actividad antimicrobiana mayor, a partir del minuto en contacto directo con el microorganismo. Sin embargo, en el análisis de varianza de mediciones repetidas, no se estableció diferencia estadísticamente significativa, en los diferentes tiempos de exposición de *E. faecalis* con los diferentes grupos de estudio.

Los vehículos seleccionados para este estudio fueron el propilenglicol, ampliamente utilizado, ya que permite la liberación lenta de los iones hidroxilo obteniéndose buenos resultados en la neutralización del contenido del conducto y el gluconato de clorhexidina, utilizado como enjuague bucal en pacientes con enfermedad periodontal y como irrigante en dientes tratados endodónticamente. Es un efectivo agente contra las bacterias Gram positivas y Gram negativas; es bien absorbido por los tejidos de la membrana bucal y tejido dental con una prolongada y gradual liberación de niveles terapéuticos; además es biocompatible. El gluconato de clorhexidina usado en este estudio fue al 13%, para analizar su efecto en altas concentraciones, al estar mezclada con hidróxido de calcio. En este estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, entre los dos vehículos usados.

Se seleccionó *E. faecalis* debido a su frecuente presencia en fracasos endodónticos, a pesar de que en dientes sin tratar endodónticamente su porcentaje es muy bajo.¹² Además, es un microorganismo facultativo Gram positivo, fácilmente reproducible bajo condiciones in vitro.

La evaluación de la reproducibilidad de los recuentos de *E. faecalis* se determinó al comparar los recuentos de UFC, por ensayo; no se detectaron diferencias estadísticamente significativas. Esto indicó que los recuentos fueron reproducibles y que la técnica de siembra en el laboratorio fue válida.

En este estudio se utilizaron las diluciones 10^7 y 10^8 , con el fin de permitir un fácil recuento de UFC, en el grupo control de la cepa, y además para que el número de cepas presentes en las diluciones fuera significativo al entrar en contacto con el antimicrobiano.

Aunque las pruebas de laboratorio, de cualquier clase, son las primeras recomendaciones en un estudio relacio-

nado con la efectividad de los medicamentos intraconductos, los resultados del método de UFC, como otras pruebas in vitro, dependen de la solubilidad y de la difusión de los materiales en el medio, la sensibilidad de los medicamentos, la fuente bacteriana, la cantidad de bacterias inoculadas, pH de los sustratos, condiciones de almacenamiento, tiempo de incubación y actividad metabólica de los microorganismos. Por lo tanto, las UFC podrían estar relacionadas con la solubilidad y difusión de los materiales utilizados más que con la eficacia verdadera contra los microorganismos.¹³

En conclusión, el hidróxido de calcio utilizado en un modelo in vitro, elimina *E. faecalis* al estar 20 minutos en contacto directo con el microorganismo, sin tener en cuenta el vehículo utilizado. La formulación de gluconato de clorhexidina fue eficiente en la eliminación de *E. faecalis*; sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los vehículos utilizados.

Los vehículos mostraron éxito en el modelo in vitro; sin embargo, deberían ser cuidadosamente analizados antes de su extrapolación a la clínica.

Se sugiere realizar futuras investigaciones y utilizar el hidróxido de calcio con diferentes vehículos en presencia de otras bacterias, que se encuentran en las patologías endodónticas y bajo condiciones anaerobias, para así tener conocimiento del comportamiento del medicamento en otras condiciones ambientales.

El efecto del hidróxido de calcio, al estar en contacto directo con *Enterococo faecalis* durante 20 minutos, debe ser tenido en cuenta, en las terapias intraconducto del medicamento entre citas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Caliskan M, Sen BH. Endodontic treatment of teeth with apical periodontitis using calcium hydroxide: a long term study. Dent Traumatol 1996; 12: 215 - 221.
2. Grecca FS, Leonardo MR, da Silva LA, Filho MT, Borges MA. Radiographic evaluation of periradicular repair after endodontic treatment of dog's teeth with induced periradicular periodontitis. J Endod 2001; 27: 610 - 612.
3. Caliskan M, Türkün M. Periapical repair and apical closure of a pulpless tooth using calcium hydroxide. Oral Surg 1997; 84: 683 - 687.

4. Thater M, Marechaux SC. Induced root apexification following traumatic injuries of the pulp in children: follow-up study. J Dent Child 1988; 55: 190 - 195.
5. Leonardo MR, da Silva LA, Leonardo R de T, Utrilla LS, Assed S. Histological evaluation of therapy using a calcium hydroxide dressing for teeth with incompletely formed apices and periapical lesions. J Endod 1993; 19: 348 - 352.
6. Han GY, Park SH, Yoon TC. Antimicrobial activity of Ca(OH)₂ containing pastes with *Enterococcus faecalis* in vitro. J Endod 2001; 27: 328 - 332.
7. Behnen MJ, West LA, Liewehr FR, Buxton TB, McPherson JC 3rd. Antimicrobial activity of several calcium hydroxide preparations in root canal dentin. J Endod 2001; 27: 765 - 767.
8. Microsoft Excel 5.0, Microsoft Corporation 1997.
9. Stata Corporation 1999. Stata statistical software. Release 6.0. College Station TX: Stata Corporation.
10. Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of tubules. J Den Res 1987; 66: 1375 - 1379.
11. Siqueira Junior JF, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. Int Endod J 1999; 32: 361 - 369.
12. 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 1998; 85: 86 - 93.
13. Gomez BP, Ferraz CC, Garrido FD, Rosalen PL, Zaia AA, Texeira FP, de Souza Filho FJ. Microbial susceptibility to calcium hydroxide pastes and their vehicles. J Endod 2002; 28: 758 - 761.