

01475



Universidad Nacional Autónoma  
de México

*DIVISION DE POSGRADO E INVESTIGACION*

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

**EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA**

**DE UNA MEZCLA DE HIDROXIDO DE CALCIO Y  
CLORHEXIDINA AL 0.12%**

Trabajo para obtener el grado de Maestro en Ciencias  
Presentado por el Esp. Alberto Taketoshi Furuya Meguro

TUTOR

DR. SALVADOR ARRONIZ PADILLA

ASESORES:

DR. SERGIO BACA PACHECO  
QFB. LUCIANO HERNÁNDEZ GÓMEZ  
QFB, GLORIA PANIAGUA DE BACA  
QFB. AGUSTINA SALAS ORTEGA



México, D.F.

OCTUBRE 2005

M: 350297



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Agradecimientos:**

A mi padre Jorge Choji Furuya Ishida, que en paz descansa, que este trabajo sea un homenaje póstumo a su memoria en agradecimiento de su apoyo, amor y enseñanzas.

A mi madre Elena Meguro Yamazaki y hermanos Jorge y Yuriko Furuya Meguro gracias por todo su apoyo y comprensión.

A mi esposa Teresita por su ayuda, paciencia y cariño.

A mis hijos Jorge y Verónica con amor y cariño, que este trabajo les sirva de ejemplo para superarse

Al Dr. Salvador Arroniz Padilla gracias por todo lo que me has enseñado, además de darme tu amistad desinteresadamente.

Al Dr. Sergio Baca Pacheco y su esposa Gloria por su gran amistad y apoyo desinteresado

Al QFB, Luciano Hernández Gómez por y tu amistad y apoyo para la realización del presente trabajo.

A la QFB. Agustina Salas Ortega gracias por su apoyo y conocimientos.

A los Honorables Miembros del Jurado gracias

A todos los amigos y compañeros de trabajo gracias por su apoyo .

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.  
NOMBRE: Alberto Taketashi  
Furuya Meguro  
FECHA: 2/18/2005  
FIRMA: [Firma]

## RESUMEN:

El propósito del presente estudio fue determinar si se logra sinergismo para el efecto bactericida del hidróxido de calcio al mezclarlo con la clorhexidina para ser utilizado como medicamento intraconductos en Endodoncia, además comprobar la efectividad antimicrobiana sobre el *Actinomyces israeli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosas*, *Bacilos subtilis*, *Streptococcus mutans* y una mezcla de estos microorganismos. Además se determinó la concentración mínima inhibitoria, y el efecto de los medicamentos propuestos a concentraciones, saturadas y sobresaturadas, también se identificaron los gérmenes obtenidos de conductos necróticos o infectados por medio de los sistemas API 20E NE para enterobacterias, API STAPH, para *Staphylococcus ssp.* API 20 E para Enterobacterias y API CANDIDA para *Candida spp.*

La I etapa experimental consistió en comparar la eficacia antimicrobiana de los medicamentos propuestos a una concentración de 5%, sobre gérmenes extraídos de conductos necróticos o infectados.

Etapa II consistió en determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y el tiempo en el cual son más efectivas las soluciones antes mencionadas sobre *P. aeruginosas*, *E. faecalis* y *A. Israeli*

Etapa III se comprobó la actividad germicida de las mismas soluciones pero a concentraciones más saturadas y diluyéndolas a 50%, 25%, 12.5 y 6.25 sobre cepas identificadas (*E. faecalis*, *P. aeruginosas*, *B. subtilis*, *E. mutans* u una mezcla de todos estos microorganismos)

Etapa IV se valoró la efectividad de los medicamentos en forma de solución sobre concentradas y de pasta a través de la prueba de difusión en agar sobre los gérmenes antes mencionados.

Palabras clave:

Medicación intraconductos, irrigantes, hidróxido de calcio, clorhexidina, identificación bacteriana, Api.

## INDICE

	Página
Introducción	3
Marco teórico	4
Planteamiento del problema	15
Objetivos y metas	16
Hipótesis	17
Material y método	19
Criterios de inclusión y exclusión	21
Etapa experimental I	21
Etapa experimental II	27
Etapa experimental III	31
Etapa experimental IV	33
Resultados	34
Análisis de resultados	42
Discusión	49
Conclusiones	52
Anexos	58

## INTRODUCCION

El control microbiológico en el tratamiento de conductos ha sido un tema ampliamente estudiado debido a su importancia. Se ha observado que la preparación biomecánica ayuda a la eliminación de un gran número de gérmenes, pero pueden quedar algunos en zonas anatómicas de los conductos radiculares, como es el caso de los conductos accesorios y túbulos dentinarios, que por su ubicación forma y forma no permiten la eliminación completa del tejido afectado ni de los microorganismos, lo que facilita la proliferación de éstos.

Los intentos para tratar de solventar este problema han sido muchos y muy variados. Actualmente se ha observado que la aplicación de medicamentos intraconductos es un método muy efectivo para eliminar a los microorganismos persistentes después de la instrumentación mecánica de los conductos. Además, los irrigantes ayudan a la lubricación de los instrumentos, evitan su ruptura y permiten eliminar los restos pulpares y la viruta dentinaria desprendida durante la instrumentación.

Los agentes irrigantes que han demostrado su eficacia como antibacterianos en estudios clínicos y de laboratorio a través de los años son: el hipoclorito de sodio y el hidróxido de calcio. El hidróxido de calcio posee, además, propiedades benéficas sobre los tejidos como son: la dentinogénesis u osteogénesis, las cuales permiten la reparación de los tejidos afectados y su formación.

El propósito de este trabajo de investigación fue aumentar la capacidad antimicrobiana del hidróxido de calcio, sin disminuir sus propiedades benéficas, al utilizarlo mezclado con clorhexidina.

La clorhexidina es un agente antimicrobiano que ha demostrado su efectividad en odontología, su principal uso es como agente antiplaca. Además se ha utilizado como irrigante intraconductos, con resultados prometedores, pero no ha podido superar ni al hipoclorito de sodio en su acción antimicrobiana, ni al hidróxido de calcio en la reparación de los tejidos afectados.

## MARCO TEORICO

El principal factor etiológico de las enfermedades pulpares es de origen microbiológico, esto fue ampliamente demostrado por Kakehashi y col.<sup>1</sup> en un estudio en el que utilizaron a dos grupos de ratones: uno libre de gérmenes y otro normal. A ambos grupos se les efectuaron comunicaciones pulpares en los molares para que estuvieran en contacto con la cavidad oral y la saliva. Al observar posteriormente a los ratones normales notaron que presentaban destrucción de la pulpa dental y lesiones periapicales, mientras que los ratones libres de gérmenes no sólo no presentaron ninguna alteración, sino que existieron intentos de reparación en la zona dañada a través de la formación de puentes dentinarios. Con este estudio se demostró la capacidad de reparación de la pulpa dental en ausencia de infecciones.

Actualmente se sabe que el principal factor etiológico de las alteraciones inflamatorias y destructivas de la pulpa dental es la caries dental. Diversos estudios han demostrado que la caries es causada por un proceso químico biológico que se caracteriza por descalcificación progresiva y localizada de los tejidos duros de los dientes. La caries se inicia por la 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>2</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>3</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 polimorfonucleares vivos o muertos y otras células necróticas, además de que se pueden observar áreas de polimorfonucleares rodeadas de pus y microorganismos<sup>4</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>5</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>6</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>7</sup>.

Al hacer una revisión de la literatura sobre la evolución de la microbiología odontológica se encuentra que el primer intento por identificar y controlar a los microorganismos dentro de los conductos radiculares infectados fue efectuado por Onderdonken 1901 (Lasala, 1979)<sup>8</sup>. No es sino hasta 1905 cuando Burkley<sup>9</sup>

comienza a relacionar a los microorganismos y observa la importancia que tienen como el principal factor etiológico de las agudizaciones endodónticas, debido al forzamiento de los restos necróticos y los microorganismos a través del foramen apical, por lo que recomienda la premedicación de la pulpa para su esterilización con el objeto de prevenir las exacerbaciones.

Durante los años 50s, 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>10</sup>; posteriormente, en los años 60s, 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-hemolíticos, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Otras especies aisladas frecuentemente incluyeron *Enterococos*, *Difteroides*, *Micrococos*, *Staphylococcus*, *Lactobacilos* y especies de *Candida*, *Neisseria* y *Veillonella*<sup>11.12</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>13</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>14</sup>

Larz y Spangberg<sup>15</sup>, en su libro *Experimental Endodontics* efectuaron la siguiente clasificación de los gérmenes encontrados en los conductos radiculares:

**Bacterias Gram positivas (+).** Se encontraron cocos aerobios, anaerobios y facultativos, entre éstos destacan los *Streptococcus milleri*, *mitior*, *mutans*, *sanguis* y *faecalis*.

En el grupo de los bacilos *Actinomicetes*: *A. naeslundii* y *A. viscosus*.

### **Bacterias anaerobias Gram. positivas:**

*Streptococcus constellatus, intermedius y morbillorum*

*Peptostreptococcus anaerobius, magnus, micro y prevotii*

Actinomyces : *A. israeli, A. meyeri y A. odontolytus*

*Arachnia propionica*

*Eurobacterium: E. alactolyticum, E. brachy, E. lentum, E. nodatum y E. timidum*

Lactobacillus : *L. cateniforme y L. minutus*

Propionibacterium: *P. acnes*

### **Bacterias Gram negativas (-)**

Bacterias aerobias, anaerobias y facultativas

*Capnocytophaga: ochracea*

*Eikenella: corrodens*

*Campylobacter: sputorum*

### **Bacterias Gram negativas (-) Anaerobias**

*Cocos.*

*Veillonella: perbula*

*Bacilos.*

*Prevotella.*

*Porphyromonas: buccae, dentícola, endotalis, gingivalis, intermedia loeschei. aralis, oris y B. ureoliticus*

*Fusobacterium nucleatum*

*Selenomonas sputigena*

*Wolinella recta y curva*

Los gérmenes que con mayor frecuencia están presentes en los conductos radiculares son: *Streptococcus alfa, beta y gama-hemolíticos y Staphylococcus aureus*<sup>16</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>17</sup>, además de ser productores de enzimas y endotoxinas<sup>18</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 *Enterobacterias*, *Escherichia coli*, *Proteus* y *Klebsiella*. Otro hallazgo de suma importancia es la presencia de *Pseudomonas* y de *Streptococcus faecalis* en las infecciones persistentes<sup>19</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>20</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>21</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.

Las soluciones irrigantes más utilizadas y que han demostrado su efectividad al paso del tiempo son: Hipoclorito de sodio al 5%, hidróxido de calcio, soluciones salinas, anestésicos, combinaciones de hipoclorito de sodio alternadas con solución de agua oxigenada, etc.

La irrigación, además de eliminar a los microorganismos existentes en el conducto radicular, ayuda a la lubricación de los instrumentos, evitando su ruptura, elimina los restos pulpares y la viruta dentinaria desprendida durante la instrumentación. Han sido muchos los intentos por encontrar una solución irrigadora que posea una acción antimicrobiana más efectiva; el hipoclorito de sodio y el hidróxido de calcio son los representantes idóneos que han pasado todas las pruebas no solo experimentales sino también clínicas a través de los

años. El hidróxido de calcio además de poseer un efecto antimicrobiano efectivo posee la propiedad de reparar el tejido periapical dañado. La presente investigación tiene como propósito aumentar la efectividad germicida de este medicamento al combinarlo con clorhexidina, conservando todas las demás propiedades benéficas del hidróxido de calcio.

## HIDRÓXIDO DE CALCIO: $\text{Ca}(\text{OH})_2$

La introducción del hidróxido de calcio representó un gran avance en la desinfección de los conductos ya que la mayor parte de los medicamentos utilizados para este fin eran altamente citotóxicos. El hidróxido de calcio fue utilizado por primera vez en endodoncia como un material de relleno de conductos y como agente antimicrobiano por Hermman en 1920. El producto utilizado fue una mezcla de hidróxido de calcio, cloruro de calcio, cloruro potásico, cloruro sódico, bicarbonato sódico y glicerina (Ilson Soares 2003)<sup>22</sup>.

El hidróxido de calcio se obtiene por la calcinación del carbonato cálcico:



Esto 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>23</sup>.

El hidróxido de calcio posee un potencial antimicrobiano, capacidad dentinogénica y osteogénica<sup>24</sup>.

El pH del hidróxido de calcio (12.4 o mayor) juega un papel muy importante en sus efectos<sup>25</sup>, tanto para eliminar a los microorganismos, como en la reparación del tejido dañado. Los iones  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{OH}^-$  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 periodos de tiempo diferentes. Byström<sup>26</sup> dice que el hidróxido de calcio colocado durante un lapso de cuatro semanas es capaz de eliminar todos los gérmenes existentes en los conductos. Por otro lado Sadafy y col<sup>27</sup>, mencionan que se requiere de un período mínimo de 24 h. para efectuar una desinfección eficaz, en este mismo estudio se demostró que el hidróxido de calcio tiene mayor eficacia que el yoduro de potasio para la desinfección de los conductos radiculares. Como podemos observar existe un amplio margen de tiempo recomendado para la acción del hidróxido de calcio sobre los microorganismos; a este respecto, en el estudio efectuado por Estrela en 1996<sup>28</sup> se concluye que la eficacia del hidróxido de calcio y el tiempo en el cual va a efectuar su acción, se deben en gran parte al tipo de germen, a su susceptibilidad y a la acción del mismo. Estrela<sup>28</sup> observó que el tiempo que tarda el hidróxido de calcio para efectuar su acción bactericida sobre *Micrococcus luteus* fue de 12 horas, 24 h para *Fusobacterium nucleatum* y *Streptococcus*, 48 h para eliminar a la *Escherichia coli* y 72 h 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>29,30</sup> Como se mencionó anteriormente, la actividad antimicrobiana del hidróxido de calcio es debida a su pH, este puede variar de 11.5 a la media hora de haberlo preparado hasta llegar a un pH de 12.47, manteniendo este valor por varios días. En estudios comparativos de las diversas presentaciones y preparados del hidróxido de calcio no se ha encontrado diferencia significativa en lo referente a su pH y su acción antimicrobiana<sup>31</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>32</sup>

Varios estudios han comprobado que el hidróxido de calcio posee un gran poder para formar la dentina terciaria e inducir la formación otros tejidos duros<sup>33</sup>. Esta ventaja permite su uso en el tratamiento de perforaciones iatrogénicas, resorciones externas e internas, fracturas radiculares y se ha empleado con éxito en apexificaciones, apicoformación y en grandes lesiones periapicales.

La utilización del hidróxido de calcio en el tratamiento de ápices inmaduros con necrosis pulpar, colocado como material de relleno dentro de los conductos afectados, ha dado magníficos resultados logrando el cierre y la formación de los ápices<sup>34</sup>.

Se ha observado que la alcalinidad del hidróxido de calcio favorece la acción de la fosfatasa alcalina sobre la formación de la dentina terciaria, el pH ideal para que esto suceda es de 7 a 9<sup>35</sup>.

Otro uso que tiene el hidróxido de calcio es el control de exudados, una alta concentración de iones  $\text{Ca}^{+2}$  disminuye la permeabilidad capilar lo que se traduce en la disminución de la extravasación del plasma<sup>36</sup>.

La acción del hidróxido de calcio como agente antimicrobiano está ampliamente demostrada, actualmente se ha tratado de potencializar su acción cambiando el vehículo de la mezcla; dentro de estos cambios, uno que destaca y que ha demostrado un aumento de la efectividad antimicrobiana es el uso de una mezcla de hidróxido de calcio, paramonoclorofenol alcanforado y furacín<sup>37</sup>.

### **CLORHEXIDINA (CHX):**

La clorhexidina (CHX) se utilizó por primera vez en Inglaterra en 1954, como limpiador de piel y heridas<sup>38</sup>, en Odontología su uso se remonta a más de 40 años, fundamentalmente en Periodoncia como agente antiplaca con magníficos resultados. 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.

La clorhexidina químicamente es una bis guanidina catiónica comercializada como una sal de gluconato. 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>39</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>40</sup>

Se ha comprobado que la clorhexidina es eficaz contra organismos Gram positivos y Gram negativos, anaerobios, anaerobios facultativos y levaduras<sup>41</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*.

Para aumentar la propiedad desinfectante de la clorhexidina a nivel de heridas se recomienda usar concentraciones altas del producto y se ha observado que la dosis óptima es del 4%<sup>42</sup>. También se recomienda el uso de alcohol para potenciar la acción de la misma<sup>43</sup>. Por otro lado se ha demostrado que un preparado de CHX aunado a cetrimide y alcohol fue capaz de erradicar de la piel a la flora bacteriana superficial y profunda, tanto aeróbica como anaerobia<sup>44</sup>.

Actualmente el uso de la clorhexidina en Odontología se ha diversificado, pero su principal uso sigue siendo como agente antiplaca en Periodoncia.

Los enjuagues de clorhexidina para uso periodontal contienen 0.12% de gluconato de clorhexidina con una base que contiene agua, 11.6% de alcohol, glicerina, agentes saborizantes y sacarina.

Las propiedades antiplaca de la clorhexidina han sido ampliamente estudiadas. Se ha observado que después de 9 a 14 horas, en dientes humedecidos en CHX no

se previno la colonización de placa y película adquirida por *S. mutans* por lo que se recomiendan enjuagues con CHX dos veces al día.<sup>45</sup>

La utilización de la clorhexidina al 0.2%, dos veces al día durante dos semanas, en pacientes con gingivitis ulceronecrosante aguda (GUNA) causó una disminución del dolor del margen gingival y papilar, y permitió al paciente realizar su aseo bucal después de una semana, lo que propició una recuperación más rápida<sup>46</sup>.

Los efectos colaterales causados por la utilización de la CHX a nivel bucal son mínimos, y no producen alteraciones permanentes. Entre de 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 manifestaciones indeseables pueden deberse al uso de la CHX por largo tiempo o en dosis inadecuadas<sup>47</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>48</sup>.

La CHX se ha utilizado en diverso estudios para comparar su efectividad como irrigante en endodoncia, y se han encontrado resultados aunque no ha podido superar al hipoclorito de sodio en lo que se refiere a su actividad antibacteriana, además de que no posee la propiedad de disolver a los restos tejidos pulpares remanentes, por lo que se requiere de más estudios obtener una conclusión definitiva.<sup>49,50</sup>

La principal ventaja que posee la clorhexidina es la capacidad de seguir liberándose por un lapso de 48 a 72 hrs, posterior a su aplicación<sup>51</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. La irrigación en tales dientes con hipoclorito de sodio al pasar más allá del ápice puede generar una inflamación periapical excesiva; que en similares condiciones la clorhexidina es inocuo

Se han efectuado varios intentos para mejorar la efectividad de la CHX, en primer lugar, aumentando la concentración de la sustancia activa y también combinándola con hipoclorito de sodio al 2.5% lo que resultó en una mayor efectividad antimicrobiana, dando como resultado cloruro de clorhexidina que aumenta la capacidad ionizante de las moléculas de clorhexidina<sup>52</sup>.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### JUSTIFICACION:

Uno de los principales problemas en endodoncia es el número significativo de fracasos, debido al tratamiento inadecuado de conductos con pulpas necróticas o infectadas.

Estos conductos requieren un control estricto de los gérmenes patógenos, ya que de no ser así, se pueden presentar agudizaciones o fracasos a distancia, teniendo como consecuencia aumento de molestias, citas, tiempo, etc.

El hidróxido de calcio es uno de los compuestos más utilizados para el control bacteriano de los conductos; usado en forma de lechadas o pasta ha dado buenos resultados. Desgraciadamente existen gérmenes como el *Enterococcus faecalis* y las *Pseudomonas aeruginosa*, entre otros, que son resistentes a la acción de este medicamento y que son los responsables de fracasos en muchos tratamientos endodónticos.

Para mejorar el pronóstico de estos tratamientos, se propone la utilización de la mezcla de dos medicamentos: el hidróxido de calcio y la clorhexidina, para ser utilizada como medicamento intra conductos. Pienso que al unir estos dos productos se puede lograr sinergismo, por lo tanto el cuestionamiento es el siguiente:

### PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Existe diferencia significativa en el efecto antimicrobiano de una mezcla de hidróxido de calcio con clorhexidina en comparación con el logrado por una solución de hidróxido de calcio?

## **OBJETIVOS:**

- 1.- Determinar si se logra sinergismo para el efecto bactericida del hidróxido de calcio al mezclarlo con la clorhexidina.
- 2.- Comparar la susceptibilidad de el *Actinomyces israeli*, *Enterococcus faecalis* , *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacilos subtilis*, *Estrptococcus mutans* y una mezcla de estos *microorganismos* a la mezcla de hidróxido de calcio con clorhexidina y a una solución de hidróxido de calcio.
- 3.- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de de las soluciones de hidróxido de calcio y agua bidestilada , y clorhexidina con hidríoxido de calcio para *E. faecalis* y *P. Aeruginosas*.
- 4.- Evaluar la efectividad bactericida de la mezcla de hidróxido de calcio con clorhexidina a concentraciones sobre saturadas y en pasta
- 5.- Identificar los gérmenes que se presentan más comúnmente en los conductos infectados o necróticos.

## **META:**

Incrementar la acción bactericida del hidróxido de calcio por adición de clorhexidina conservando todas sus demás propiedades sobre los tejidos duros y blandos (dentinogénesis, osteogénesis y control de exudado.)

## **HIPOTESIS:**

### **HIPOTESIS (Nula) : Ho**

**No existe diferencia en la acción germicida de una mezcla de hidróxido de calcio con clorhexidina y una solución y pasta de hidróxido de calcio.**

$$\overline{X}_1 = \overline{X}_2$$

### **HIPOTESIS DE TRABAJO**

**La acción de la mezcla de hidróxido de calcio y clorhexidina tiene mejor y mayor efecto germicida que una solución y pasta de hidróxido de calcio.**

$$\overline{X}_1 \neq \overline{X}_2$$

## **DEFINICIÓN DE VARIABLES Y ESCALA DE MEDICIÓN**

1.- Variable dependiente:

Halos de inhibición medidos en mm en la primera y cuarta etapa, y en la segunda y tercera etapa número de colonias.

2.- Variables independientes

Mezcla de hidróxido de calcio con clorhexidina y solución de hidróxido de calcio

3.- Variable de comparación:

Solución de hidróxido de calcio

Siendo la variable dependiente cuantitativa y será medida en escala de razón, la variable independiente cuantitativa nominal, la cual será medida en escala nominal, variable de comparación cuantitativa nominal, la cual será medida en escala nominal.

## **TIPO DE INVESTIGACIÓN:**

Experimental con postpruebas y series cronológicas experimentales y la fase descriptiva consistirá en la identificación de los microorganismos

La fase experimental constó de 4 etapas

Etapa I consistió en determinar si existía diferencia significativa entre la acción germicida de una solución de hidróxido de calcio con agua bidestilada al 5% y

una solución de clorhexidina e hidróxido de calcio al 5%, sobre gérmenes extraídos de conductos necróticos o infectados.

Etapa II consistió en determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y el tiempo en el cual son más efectivas las soluciones antes mencionadas sobre *P. aeruginosas*, *E. feacalis* y *A. Israeli*

Etapa III se comprobó la actividad germicida de las mismas soluciones pero a concentraciones más saturadas y diluyéndolas a 50%, 25%, 12.5 y 6.25 sobre cepas identificadas (*E. feacalis*, *P. aeruginosas*, *B. subtilis*, *E. mutans* u una mezcla de todos estos microorganismos)

Etapa IV se valoró la efectividad de los medicamentos en forma de solución sobre concentradas y de pasta a través de la prueba de difusión en agar sobre los gérmenes antes mencionados.

La fase descriptiva se efectuara a través de la identificación del 30% de los gérmenes obtenidos de los conductos infectados o necróticos de la etapa 1 por medio de los sistemas API 20E NE para no enterobacterias, API- STAPH, para *Staphylococcus* spp. API 20 E para Enterobacterias y API CANDIDA para *Candida* spp.

## **MATERIAL Y MÉTODO**

### **Material:**

#### **Clínico:**

50 Juegos de exploración ( Espejos, excavadores, pinzas de curación)

Pieza de alta velocidad (Concentrix)

Fresas de diversas formas y tamaños ( Kerr)

Porta Grapas ( Ivory)

Pinzas perforadoras ( Ivory)

Grapas de diversos números (Ivory)

10 cajas de dique de hule (Ivory)

Arco de Young

Puntas de papel (Higienic)

Aparato de Rayos X (Corix)

1 caja de radiografías periapicales (Kodak)

Hidróxido de calcio ( Viardent)

Enjuague Gingivitis con clorhexidina al 0.12% (Oral "B", GILLETTE oral care)

#### **Laboratorio:**

Campana de flujo laminar

Mechero de Bunsen

50 cajas de Petri (Pyrex)

50 tubos de ensayo (pyrex)

50 tubos de tapón de rosca (pyrex)

50 tubos de cepario 3 gradillas

Balanza de laboratorio

Sensidiscos

Asas

50 micro asas

20 micropipetas

20 micro azadas

Estufa de cultivo

Jarra de Gas Pack

50 sobres de Gas Pack rojo (Becton Dickinson)

Medio de transporte de Stuart

Agar Sangre

Agar tioglicolato

Agar Sabouraud

Infusión cerebro corazón

Infusión de tioglicolato

Agar Muller Hinton

Agar AOAC

Paquete para la coloración de Gram.

Paquetes API 20E .NE para no enterobacterias, API- STAPH, para Staphylococcus spp. API 20 E para Enterobacterias y API CANDIDA para Candida spp. (BioMerilux)

Hidróxido de calcio 100% puro marca Viardent

Enjuague Gingivitis Oral "B" con clorhexidina (Gluconato de clorhexidina al 0.12%)

GILLETTE Oral Care

Computadora Pentium II con procesador Celerón

Paquetería estadística de Excel

Paquete estadístico Stat Graphics

**INSTALACIONES:** El presente trabajo se efectuó en la clínica de especialización en Endoperiodontología, el laboratorio de Análisis Clínicos de la Clínica Universitaria de Salud Integral (CUSI), el laboratorio de Instrumentación de la carrera de Cirujano Dentista de la F.E.S. IZTACALA y el Cepario de la Facultad de Química del Campus de Ciudad Universitaria.

## **MÉTODO:**

Debido a que la capacidad bactericida del hidróxido de calcio está dada por su pH alcalino (12.4 - 12.8), lo primero que se hizo fue comparar el pH de la mezcla propuesta y el de una solución de hidróxido de calcio.

Se utilizaron dos probetas de 20 mL, en la primera probeta se colocaron 10 mL de agua bidestilada y posteriormente 4g de hidróxido de calcio 100% puro (Viardent), a la segunda probeta se le agregaron 10 mL de enjuague Oral "B" gingivitis con Clorhexidina (Gillette Oral Care.) al cual se le agregaron 4g de hidróxido de calcio (Viardent) 100% puro, mezclándose perfectamente hasta obtener una mezcla homogénea. Posteriormente se utilizó un potenciómetro previamente calibrado y ajustado a la temperatura ambiente y se procedió a medir el pH de la solución de hidróxido de calcio que fue de **12.4**, se lavó y secó el electrodo del potenciómetro y se introdujo en la mezcla de hidróxido de calcio con clorhexidina dando una medición de **12.6** por lo que pudimos deducir que esta mezcla también puede poseer una actividad bactericida igual a la del hidróxido de calcio.

## **ETAPA I**

La primera fase de la investigación consistió en comprobar si existía diferencia significativa entre la acción antimicrobiana de una solución de hidróxido de calcio y una solución de clorhexidina e hidróxido de calcio, sobre 50 conductos necróticos o infectados pacientes que acudieron a tratamiento endodóntico a la clínica de Especialización en Endoperiodontología, siguiendo los protocolos establecidos de la Especialización para efectuar dichos tratamientos.

Para la selección de los pacientes que intervinieron en este estudio se tomó en cuenta los siguientes criterios:

## **CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- Pacientes que presenten dientes con pulpas necróticas o infectados
- Adultos (18 a 48 años).
- Que tengan elaborada historia clínica y serie radiográfica.
- No haber tomado antibiótico una semana antes del tratamiento.
- No haber padecido enfermedades respiratorias o debilitantes cuando menos una semana antes del tratamiento.

## **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- Pacientes que hayan padecido enfermedades debilitantes o hayan ingerido antibiótico una semana anterior.
- Que se encuentren bajo tratamiento periodontal con administración de clorhexidina.
- Pacientes tratados de emergencia y que carezcan de historia clínica completa.
- Dentición temporal.
- Pacientes que se nieguen a participar en la investigación

## **CRITERIOS DE ELIMINACIÓN**

- Conductos irrigados previos a la toma de la muestra.
- Conductos muy estrechos que impidan la toma de la muestra.
- Contaminación de muestras o medios de cultivo.
- Escurrimiento de soluciones durante el proceso.

## **CONSIDERACIONES ÉTICO LEGALES:**

Debido al tipo de estudio, se le explicó al paciente en que consistía su participación, aclarándole que no tenía efectos sobre su salud o el tratamiento y que exclusivamente se tomaría una muestra microbiológica de su diente por lo cual se pedía su permiso para efectuarla.

Una vez obtenidos los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión se seleccionaron 50 piezas dentales al azar, con pulpas necróticas o infectadas, y previa anestesia y aislamiento de las mismas se procedió a efectuar la asepsia de la zona con una solución de clorhexidina al 0.12% (Gillette Oral Care). Efectuado este procedimiento, se realizó el acceso a la cámara pulpar, se tomaron muestras bacteriológicas de los conductos con puntas de papel estériles (Higienic), tratando de que las puntas de papel quedaran holgadas y lo más apical posible; se utilizaron dos puntas por cada diente seleccionado, y en los casos en los cuales existía la presencia de fístulas se obtuvo una muestra a través de la misma, las muestras obtenidas fueron colocadas en los medios de transporte, Infusión cerebro corazón (BHI) y Tioglicolato los cuales fueron introducidos en una estufa de cultivo a 35°C por 24 horas. Al cabo de éste tiempo se observó la presencia o no de crecimiento bacteriano (por enturbiamiento del

medio de cultivo); las muestras positivas se cultivaron de la siguiente manera: Se efectuaron cuatro siembras por muestra, colocando 2 en agar sangre y dos en Sabouraud (para observar la presencia de hongos).

La siembra se realizó de la siguiente manera: en una campana de flujo laminar se tomó una porción del inóculo (muestra bacteriológica) con un hisopo estéril, se procedió a efectuar una siembra masiva en las cajas de Petri que contenían agar sangre o sabouraud. En cada caja de Petri se colocaron dos sensidiscos impregnados de los medicamentos, el primer sensidisco fue impregnado en una solución de hidróxido de calcio al 5% en agua bidestilada, el segundo sensidisco se impregnó con una mezcla de enjuague Oral B con clorhexidina e hidróxido de calcio al 5%, (se eligió esta concentración para efectuar un estudio comparativo con el estudio de Ferreira<sup>53</sup>, en el cual se menciona que el hidróxido de calcio no tiene gran efectividad antibacteriana a esta concentración, y así poder observar si la mezcla propuesta lo posee), efectuado este procedimiento se incubaron las cajas de Petri 37°C por 48 h.

Para los gérmenes anaerobios se procedió a efectuar el mismo procedimiento, pero antes de la incubación se llevaron las cajas de agar sangre y sabouraud a una jarra de anaerobiosis, a la cual se le colocó un sobre de Gas Pack (Becton Dickinson), al cual se le vertieron 35 mL de agua, antes de cerrar la jarra de anaerobiosis e incubarla a la misma temperatura y tiempo que los cultivos anteriores.

A las 48 hrs. de incubación se sacaron las cajas de Petri para observar si existieron o no halos de inhibición. El diámetro de los halos se midió con un vernier y los datos se anotaron por grupos para analizarlos por una T de Student. Además de lo anterior, se efectuó la identificación de los gérmenes microscópicamente, utilizando la tinción de Gram. (ver anexo 1 ) y observación microscópica y un 30% de las muestras fueron identificadas por el sistema sistemas API- STHA. y API-20E., API 20NE y API Candida ( Laboratorios BioMerilux) la fase de identificación bacteriana fue efectuada en el laboratorio de Análisis Clínicos de la Clínica Universitaria de Salud Integral (CUSI)

Las baterías de pruebas API son un sistema de identificación rápida para bacterias. Este sistema presenta las ventajas de ser rápido, eficaz y de permitir

realizar numerosas pruebas a la vez, debido a la semejanza en la utilización de los diferentes tipos de identificación bacteriana se describe únicamente el sistema Api -20E:

La batería de pruebas API - 20E es un sistema de identificación rápida para bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y otras bacterias Gram (-). Básicamente consta de 21 tests bioquímicos estandarizados y miniaturizados y una base de datos. Este sistema presenta las ventajas de ser rápido, eficaz y de permitir realizar numerosas pruebas a la vez. Cada tira de API 20E contiene 20 microtubos o pocillos con distintos sustratos deshidratados. Cada tubo es una prueba bioquímicas distintas.

Los microtubos se inoculan con una suspensión de microorganismos, en agua o agua bidestilada, que rehidrata los medios. Las tiras o galerías se incuban a 37°C y por efecto del metabolismo bacteriano se producen cambios de color espontáneos o bien por la adicción de reactivos.

La lectura de las reacciones se hace mediante comparación con una tabla de lectura donde se indica si los microorganismos deben considerarse positivos o negativos para cada reacción según el color aparecido.

### **Batería de pruebas incluidas y tablas de lectura con coloraciones positivas y negativas**

<b>Pueba</b>	<b>Reacción / Enzimas</b>	<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>
ONPG	beta-galactosidasa	sin color	amarillo
ADH	arginina deshidrolasa	amarillo	rojo o naranja
LDC	lisina descarboxilasa	amarillo	rojo o naranja
ODC	ornitina descarboxilasa	amarillo	rojo o naranja
CIT	utilización del citrato	verde	azul oscuro o turquesa
H2S	producción de H <sub>2</sub> S	sin precipitado negro	precipitado negro
URE	ureasa	amarillo	rojo o naranja
TDA	triptófano desaminasa	amarillo	marrón-rojo
IND	producción de indol	amarillo	color rosa o anillo rosa-rojo

VP	producción de acetoina (Voges-Proskauer)	sin color	rosa-rojo
GEL	gelatinasa	sin difusión	difusión de pigmento
GLU	fermentación/oxidación de glucosa	azul o verde	amarillo
MAN	fermentación/oxidación de manitol	azul o verde	amarillo
INO	fermentación/oxidación de inositol	azul o verde	amarillo
SOR	fermentación/oxidación de sorbitol	azul o verde	amarillo
RHA	fermentación/oxidación de ramnosa	azul o verde	amarillo
SAC	fermentación/oxidación de sacarosa	azul o verde	amarillo
MEL	fermentación/oxidación de melobiosa	azul o verde	amarillo
AMY	fermentación/oxidación de amígdalina	azul o verde	amarillo
ARA	fermentación/oxidación de arabinosa	azul o verde	amarillo
OX	citocromo oxidasa		

Para la preparación de la galería se preparó una cámara de incubación con su tapa correspondiente y se repartieron 5 mL de agua destilada o desmineralizada en los alvéolos para proporcionar una atmósfera húmeda. Posteriormente se anotó la fecha de la referencia en la lengüeta lateral y se colocó la galería en la cámara de incubación.

Al mismo tiempo se realizó la prueba de la oxidasa para lo cual se tomó una colonia de la cepa a identificar y se colocó sobre un trozo de papel filtro sobre un portaobjetos. Se humedeció el papel con una gota de agua estéril y se añadió una gota de reactivo OX. Si la reacción es positiva apareció en uno o dos minutos una coloración púrpura. El resultado de esta reacción debió ser anotado ya que constituye el test #21 de la identificación.

El siguiente paso en el desarrollo de esta técnica fue la preparación de inóculo, la cual consistió en lo siguiente:

Se abrió de una ampolleta de NaCl 0.85% (Medium 5mL) con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril se recogió una colonia de la placa de agar y se realizó una suspensión bacteriana homogeneizando cuidadosamente la ampolleta. Posteriormente se llenaron los tubos y las cúpulas de los test con la suspensión bacteriana y se incubaron de 18-24 horas a temperatura ambiente (20-25°C).

Terminado el tiempo de incubación se procedió a realizar la lectura de la Galería con la ayuda de la Tabla de Lectura. Se anotaron en la hoja de resultados las raciones espontáneas y si la glucosa es positiva y/o 3 o más test son positivos se efectuó el revelado de los test que requieran reactivos.

Por último viene la Identificación las cuales se realizó mediante el sistema computarizado API-20E para lo cual en la hoja de resultados los test estuvieron agrupados de 3 y cada uno tuvo asignado un valor 1,2 ó 4. La galería API-20E consta de 20 tests. Los números en el interior de cada grupo corresponden a reacciones positivas.

El test de la oxidasa es el número 21. Sumando los valores de los test positivos para cada grupo se obtuvo un código de 7 cifras. El programa informático para identificación se utilizó introduciendo manualmente en el teclado el perfil numérico de las 7 cifras, dando así el resultado correcto.

## ETAPA II 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>54,55</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

Esta fase se efectuó dentro de una campana de flujo laminar, 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 hrs.

#### 2. Comprobación de la pureza y viabilidad de las cepas bacterianas

Una vez incubadas las cepas se observa su viabilidad por el enturbamiento de los medios de cultivo en los tubos de ensayo.

Obtenido el crecimiento de *P. aeruginosa* y *E. faecalis* en los medios de cultivo líquidos, obtuvieron colonias aisladas por estría en agar AOAC e incubación a 37°C durante 24 h.. Las células de las colonias aisladas se tiñeron con Gram y se observaron al microscopio óptico; posteriormente se verificaron mediante pruebas bioquímicas.

Cuadro 1. Pruebas bioquímicas para verificar la identificación bacteriana

Cepa bacteriana	Morfología	Tinción de Gram	Citocromo oxidasa	Catalasa	Crecimiento en BHI + NaCl 5,5	O/F de glucosa
<i>P. aeruginosa</i>	Bacilo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	+/-
<i>S. faecalis</i>	Coco	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	NR

O – Oxidación

F – Fermentación

NR – No realizado

Cuadro 2. Pruebas bioquímicas para verificar *A. israeli*

Características de las colonias	Hidrólisis del almidón	Fermentación de la arabinosa	Ribosa	Xilosa	Almidón diluido	Rafinosa	Sensibilidad a la estreptomina	sensibilidad a cloranfenicol
rugosa	+/-	+	+	+	+/-	+	-	+

Obtenida las cepas bacterianas puras, se procedió a preparar suspensiones en solución salina isotónica con la estandarización de McFarland al 0.5 ( $1.5 \times 10^8$  bacterias /mL). (Anexo 2)

Para lograr estas suspensiones se transfiere una asada de bacterias a un tubo de ensayo con 10 mL de solución salina isotónica estéril, la cual es agitada hasta obtener una turbidez homogénea igual a la del tubo 0.5 de la escala de McFarland. (Apéndice 1). 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:

Hidróxido de calcio:

Tabla 1

1er. tubo	9.2 mL de agua bidestilada	0.8 g. de hidróxido de calcio
2do. tubo	9.4 mL de agua bidestilada	0.6 g. de hidróxido de calcio
3er. tubo	9.6 mL de agua bidestilada	0.4 g. de hidróxido de calcio
4to. tubo	9.8 mL de agua bidestilada	0.2 g. de hidróxido de calcio

### Mezcla ( tabla 2)

1er. tubo	9.2 mL enjuague oral B con clorhexidina	0.8 g. de hidróxido de calcio
2do. tubo	9.4 mL enjuague oral B con clorhexidina	0.6 g. de hidróxido de calcio
3er. tubo	9.6 mL de enjuague oral B con clorhexidina	0.4 g. de hidróxido de calcio
4to. tubo	9.8 mL de enjuague oral b con clorhexidina	0.2 g. de hidróxido de calcio

### 3.- Sembrado y preparación de las colonias

A cada tubo de solución se le agregaron 2 mL de la suspensión de *E. faecalis* o *P. aeruginosa* ajustadas a  $1.5 \times 10^8$  bacterias/mL. (ver anexo 2) Los tubos se incubaron a 37°C durante 24, 48 y 72 h y posteriormente se tomó una microasada que se estrió en agar tioglicolato (Difco, Mich); se efectuó una siembra control (bacterias que fueron incubadas sin medicamento), las cajas se incubaron a 35°C por 24 h. 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. Si se intenta realizar la determinación del efecto bactericida del  $\text{Ca(OH)}_2$  en medios de cultivo solidificados con agar, éstos se deshidratan por efecto del calor producido por la incubación prolongada, lo que impedirá el desarrollo de *A. israeli*.

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 5 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 7 días. Al cabo de este tiempo se observaron y anotaron los resultados.

### **ETAPA III (CONCENTRACIONES MAS SATURADAS)**

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  $\text{Ca(OH)}_2$

25% 8 mL de BHI y 2 g de  $\text{Ca(OH)}_2$

12.5% 8 mL de BHI y 1 g de

6.25% 8 mL de BHI y 0.5g de  $\text{Ca(OH)}_2$

#### **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 4mL de la solución de  $\text{Ca(OH)}_2$  y clorhexidina (50%)

25% 6 mL de BHI y 2mL de la solución de  $\text{Ca(OH)}_2$  y clorhexidina (50%)

12.5% 7 mL de BHI y 1mL de la solución de  $\text{Ca(OH)}_2$  y clorhexidina (50%)

6.25% 7.5 mL de BHI y 0.5mL de la solución de  $\text{Ca(OH)}_2$  y clorhexidina (50%)

#### **Solución de hidróxido de calcio**

50% 4 mL de BHI y 4mL de la solución de  $\text{Ca(OH)}_2$  y solución salina (50%)

25% 6 mL de BHI y 2mL de la solución de  $\text{Ca(OH)}_2$  y solución salina (50%)

12.5% 7 mL de BHI y 1mL de la solución de  $\text{Ca(OH)}_2$  y solución salina (50%)

6.25% 7.5 mL de BHI y 0.5mL de la solución de  $\text{Ca(OH)}_2$  y solución salina (50%)

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

A continuación se hicieron 4 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:

(Serie1) *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 h, las cuales fueron sembradas por estría en medio de agar BHI incubadas a 35 °C por 24 h.

## ETAPA IV

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  $3 \times 10^8$  células/mL (ver anexo 3 )

Procedimiento:

En una campana de flujo laminar, se procedió a colocar en la tapa de una caja de Petri 5 tubos de vidrio de un diámetro de 5mm, teniendo cuidado de dejarlo 3mm por arriba de la contratapa, posteriormente se procedió a verter en la contratapa 20 mL de agar Muller Hinton y se cerró la caja, hasta que el agar gelificó, se observó que los pozos realizados no perforaran el agar, y estuvieran bien definidos, de cumplir con estos principios, se procedió cambiar la tapa con los tubos por una tapa de normal y se llevó a control de esterilización, por 24 h este procedimiento se efectuó por quintuplicado.

Posteriormente se procedió a efectuar un sembrado masivo utilizando un isopo estéril:

La caja 1 se inoculó 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 ( Agua bidestilada)

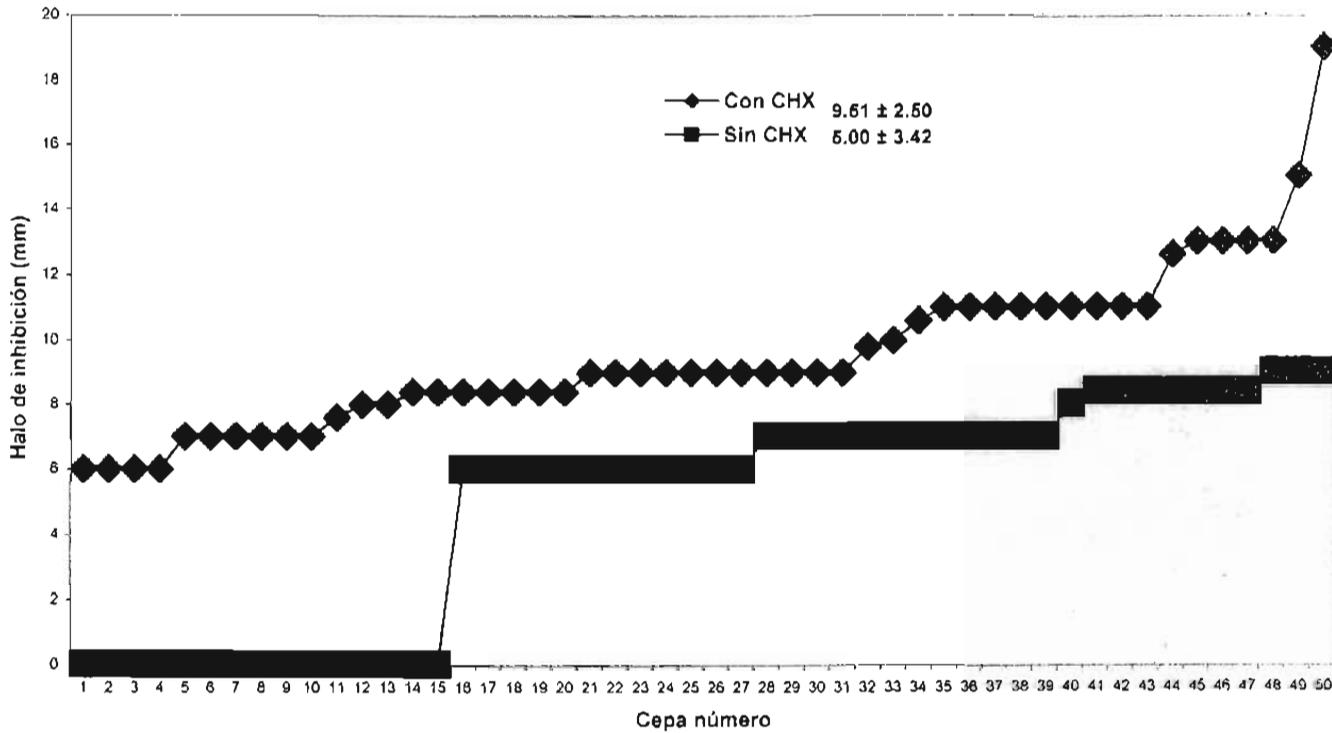
Las cajas se incubaron a  $35^{\circ}\text{C}$  por 24 h para posteriormente medir los halos de inhibición y efectuar un análisis de varianzas con 0.5 grados de libertad.

**RESULTADOS:**

**ETAPA 1**

Grafica 1

**Efecto bactericida del Ca(OH)<sub>2</sub> al 5% con y sin CHX**



Ver anexo 3

Con estos datos se efectuó una Prueba estadística t de Student con un alfa de 0.01

	<i>Sol. de Ca(OH)<sub>2</sub> y Clor al 5%</i>	<i>Sol. hidróxido de calcio al 5%</i>
Media	9.508	4.996
Varianza	6.259934694	11.69222857
Observaciones	50	50
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	90	
Estadístico t	7.530012524	
P(T<=t) una cola	1.87592E-11	
Valor crítico de t (una cola)	2.368497007	
P(T<=t) dos colas	3.75185E-11	
Valor crítico de t (dos colas)	2.63156835	

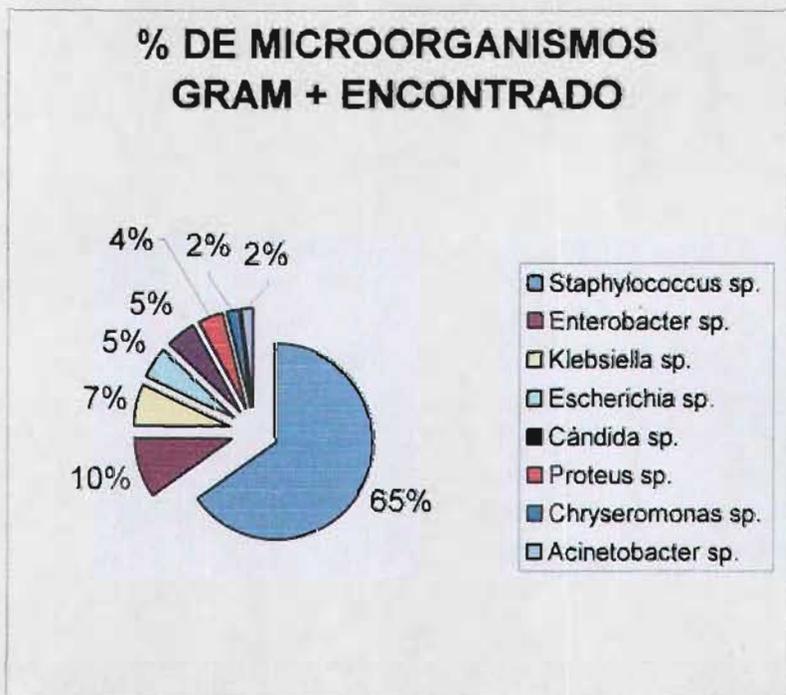
## FASE II (IDENTIFICACION BACTERIANA)

Los microorganismos encontrados e identificados con tinción de Gram y Zhiel morfológicamente fueron cocos, casi todos facultativos, la mayoría correspondían al grupo *Staphylococcus*, *diplococos* y unas cuantas *Enterobacterias*.

El 30% de las colonias identificadas con el sistema sistemas API 20E NE para no *Enterobacterias*, API- STAPH, PARA *Staphylococcus* ssp. API 20E para *Enterobacterias* y API CANDIDA para *Candida* spp.

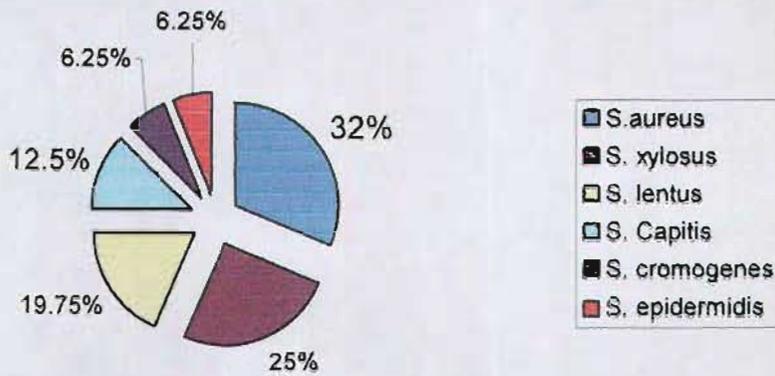
se identificaron un total de 42 microorganismos pertenecientes a 9 géneros; *Staphylococcus* sp. (65%), *Enterobacter* sp. (10%), *Klebsiella* sp. (7%), *Escherichia* sp. (5%), *Candida* sp. (5%), *Proteus* sp. (4%), *Chryseomonas* sp.(2%) y *Acinetobacter* sp. (2%)

Dentro del Género *Staphylococcus* sp. se identificaron 7 especies . El *Staphylococcus aureus* fue la especie que se aisló con mayor frecuencia con un 31.29%, seguida de *Staphylococcus xylosus* (25%), *Staphylococcus lentus* (18.75%) *Staphylococcus capitis* (12.5%), y por último *Staphylococcus chromogenes* y *Staphylococcus epidermidis* con un 6.25% para cada especie.



Grafica 2

### Porcentaje de distribución del Sthapylococcus

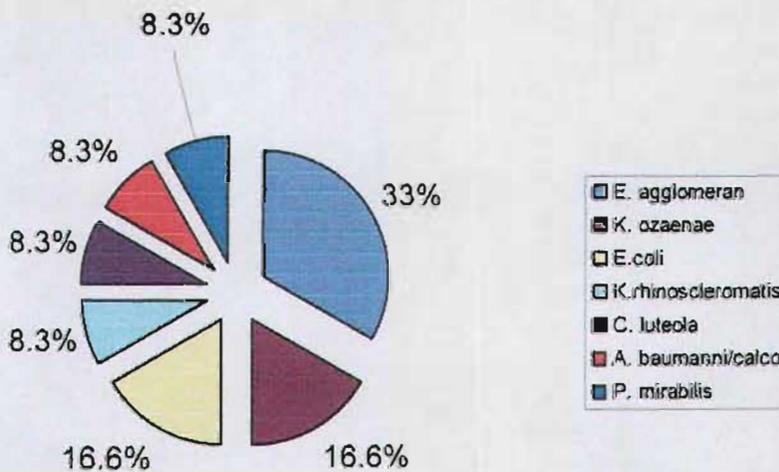


Grafica 3

#### Microorganismos Gram negativos:

Se identificó en un 33.3% a *Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella ozaenae* y *Escherichia coli* con 16.6% para cada una. Teniendo a *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Chryseromonas luteola*, *Acinetobacter baumannii/calco* y *Proteus mirabilis* con un 8.33% para cada caso.

### % de microorganismos Gram -



grafica 4

**RESULTADOS DE LA ETAPA II MIC (concentración mínima inhibitoria)**

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

Tabla 3

**NUMERO DE COLONIAS**

solución	8%	6%	4%	2%
24 hrs.	33	117	500	505
48 hrs.	10	75	98	115
72 hrs.	0	0	0	0

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

**NUMERO DE COLONIAS**

solución	8%	6%	4%	2%
24 hrs.	15	4	0	0
48 hrs.,	0	0	0	0
72 hrs.	0	0	0	0

Tabla4

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

**NUMERO DE COLONIAS**

solución	8%	6%	4%	2%
24 hrs.	100	125	133	150
48 hrs.,	55	75	80	97
72 hrs.	0	0	0	0

Tabla 5

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

**NUMERO DE COLONIAS**

solución	8%	6%	4%	2%
24 hrs	0	75	80	68
48 hrs,	0	0	0	0
72 hrs	0	0	0	0

Tabla6

*Actinomyces israeli*

La actividad antimicrobiana del hidróxido de calcio y de la muestra propuesta se observó con un espectrofotómetro tanto al 2% como al 8%, y se observó que no existió efectividad ante el A. Israelí, cosa que si sucedió con la clorhexidina al 0.12

**ETAPA III EFECTOS DE LOS MEDICAMENTOS A CONCENTRACIONES DE 50%, 25%, 12.5 Y 6.25% SOBRE *E. faecalis*, *P. aeruginosas*, *S. mutans* Y *B. subtilis*.**

HIDRÓXIDO DE CALCIO PURO + BHI

6 hrs

Tabla 7

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

---- = 0 colonias

++++ = Colonias incontables

tabla 5

Enjuague Oral "B" con clorhexidina al 0.12% + BHI

6 horas tabla 8

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

---- = 0 colonias

++++ = Colonias incontables

tabla 6

SOLUCIÓN DE HIDRÓXIDO DE CALCIO Y CLORHEXIDINA

6 horas tabla 9

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

---- = 0 colonias

++++ = Colonias incontables

tabla 7

SOLUCIÓN DE HIDRÓXIDO DE CALCIO

6 horas tabla 10

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

---- = 0 colonias

++++ = Colonias incontables

A las 24 horas

HIDRÓXIDO DE CALCIO PURO + BHI

tabla 11

	6.25%	12.5%	25%	50%	control
<i>P. aeruginosas</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

24 horas (tabla 15)

tabla 12

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

---- = 0 colonias

++++ = Colonias incontables

SOLUCIÓN DE HIDRÓXIDO DE CALCIO Y CLORHEXIDINA

24 horas (tabla 16)

tabla 13

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

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

### SOLUCIÓN DE HIDRÓXIDO DE CALCIO

A las 24 hrs

tabla 14

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

Tabla 12

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

A las 48 hrs todos los cultivos fueron negativos, sólo el de *P. aeruginosa* con clorhexidina al 6.25% mostró 630 colonias.

A las 72 hrs. también todos los cultivos fueron negativos, y sólo en el de *P. aeruginosa* con clorhexidina se observó un número de colonias incontable.

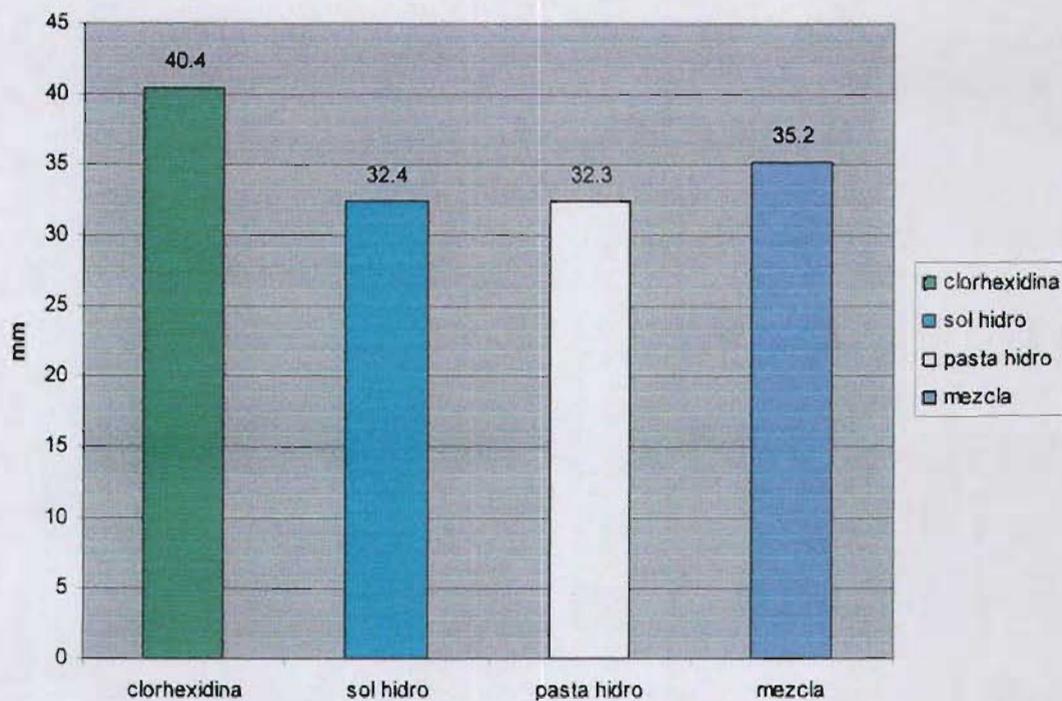
### RESULTADOS DE LA ETAPA IV PRUEBA DE DIFUSIÓN

	<i>E. aureus</i>	<i>P. Pseudomonas</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. feacalis</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	7.4mm
control	XXXX*	XXXX*	XXXX*	XXXX*	XXXX*

Tabla 13

Todos los controles resultaron positivos con un número incontable de bacterias

mm de inhibición por la prueba de difusión en agar



gráfica 5

## ANÁLISIS DE RESULTADOS: ETAPA I (tabla 20)

### Ver Anexos 4

Análisis por rangos: (tabla 20)

Rango en mm. De inhibición	Solución de hidróxido de calcio con clorhexidina al 5%	Solución de hidróxido de calcio y agua bidestilada al 5%
0-5 mm	0	15
6-10 mm	34	35
11- 15 mm	15	0
16-20 mm	1	0

Tabla 14

Al efectuar el análisis por rangos observamos que la solución de hidróxido de calcio con clorhexidina fue efectiva en contra de todas las muestras, mientras que la solución de hidróxido de calcio con agua bidestilada no fue efectiva contra 15 muestras, y su máxima inhibición fue de un rango de entre 6 y 10 mm, mientras que la solución de hidróxido de calcio con clorhexidina tuvo 15 con rango de 11 a 15 mm y una con un rango de 19 mm.

Al análisis estadístico T de Student :

Se encontró la t calculada (7.5300) es mayor la a t de tablas (2.3684) por lo tanto se tomo la regla de decisión que dice: si t calculada es mayor o igual que t de tablas se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna. La acción de la mezcla de hidróxido de calcio y clorhexidina tiene mejor y mayor efecto germicida que una solución de hidróxido de calcio.

Con este análisis estadístico se observa que sí existe diferencia significativa de la eficacia de la acción de la solución del hidróxido de calcio con clorhexidina con un alfa de 0.01

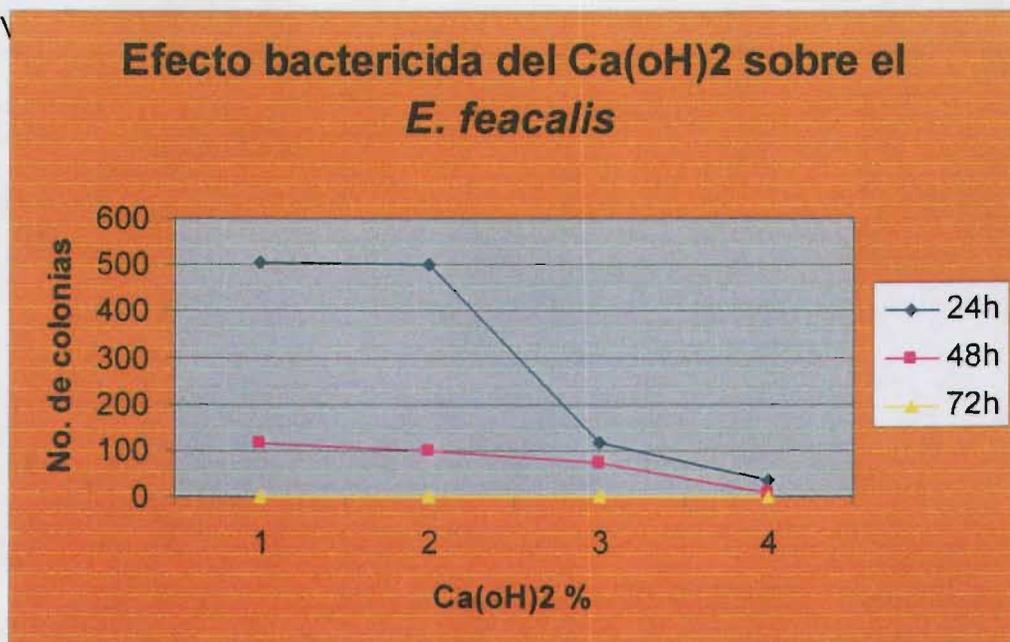
## ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA ETAPA II A CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS MIC

La acción del hidróxido de calcio sobre el *E. feacalis* 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 hrs, lo que nos da el indicio de que el *E. feacalis* es más susceptible a la clorhexidina. Mientras que las concentraciones de 6 y 8% tardaron 48 hrs para lograr el mismo efecto.

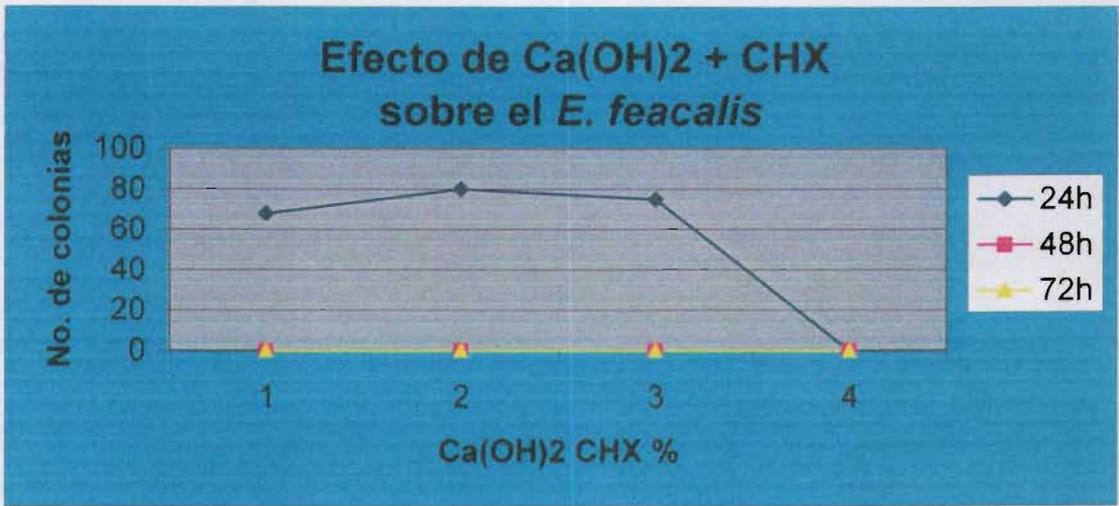
Con la *P. aeruginosas* la acción del hidróxido de calcio requirió de 72 hrs. para ser efectivo a todas las concentraciones, mientras con la solución de hidróxido de calcio con clorhexidina a la concentración de 8%, se vio efectividad desde las 24 hrs y las demás concentraciones fueron efectivas a las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

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 sí lo es la clorhexidina al 0.12%

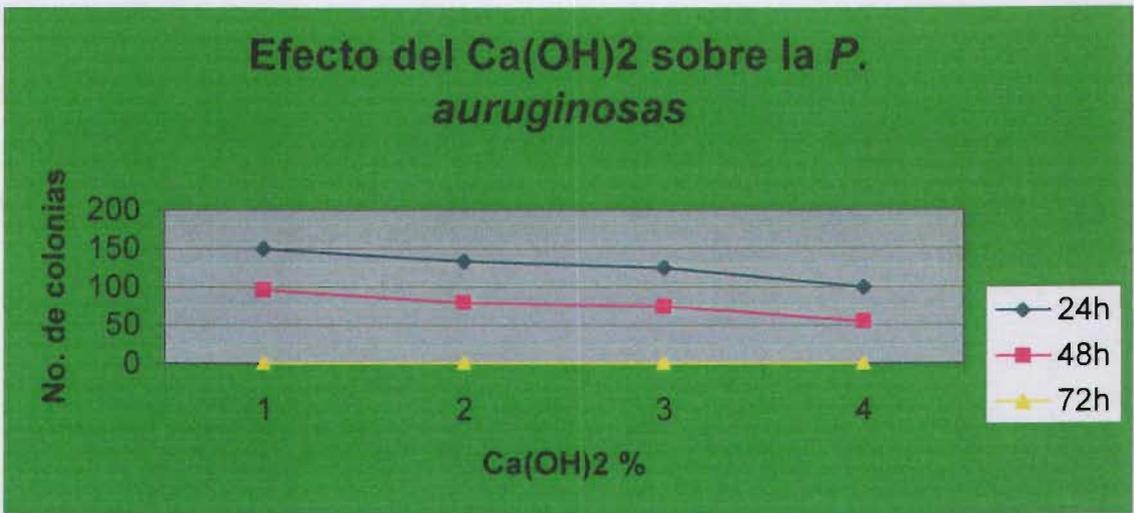
Si existió sinergismo en el efecto anti microbiano al unir hidróxido de calcio con clorhexidina



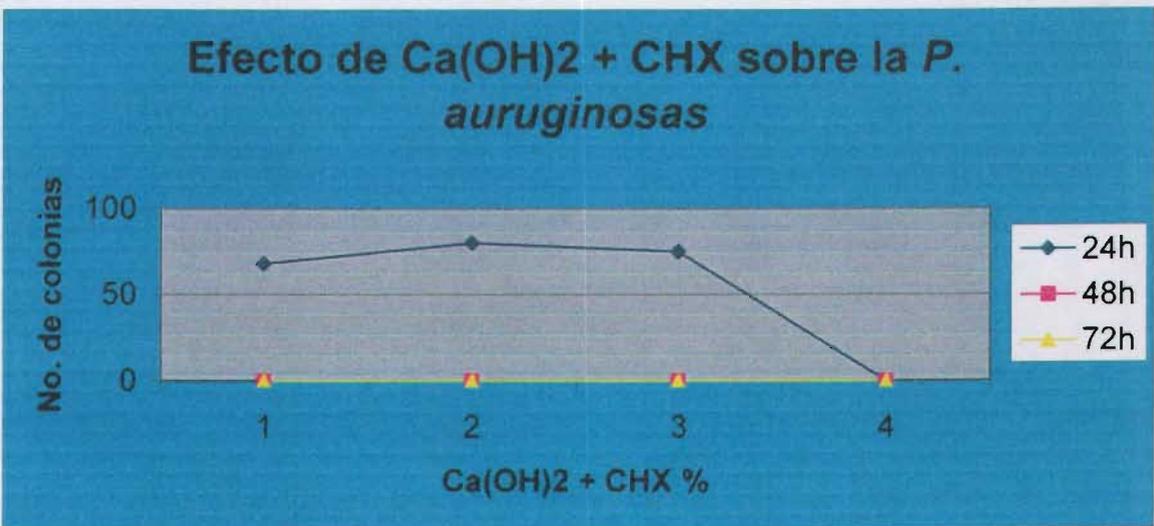
Grafica 6



grafica 7

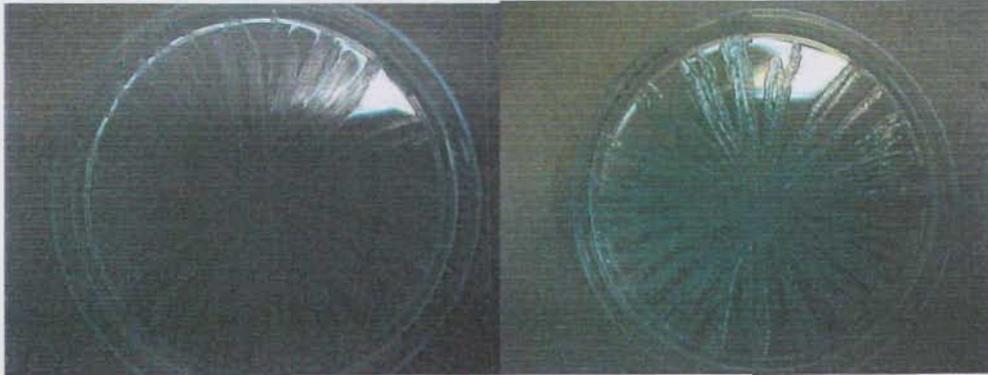


grafica 8



grafica 9

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



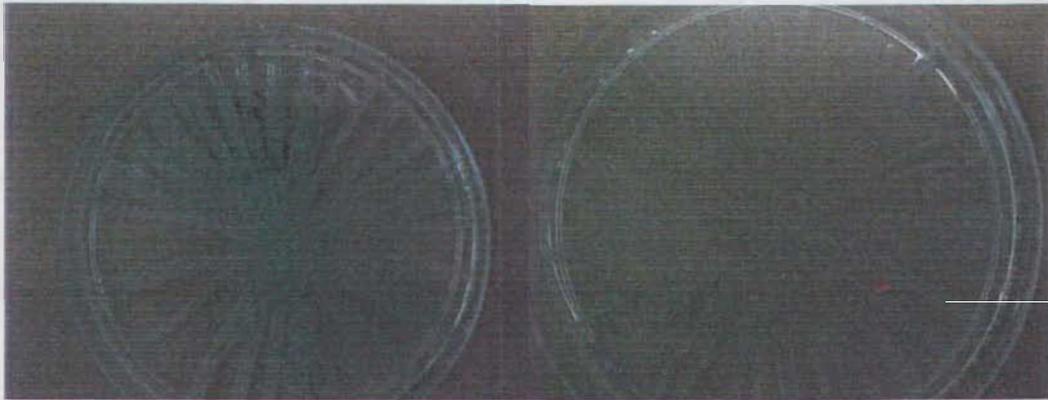
controles de *E. feacalis* y *P. aeruginosas*



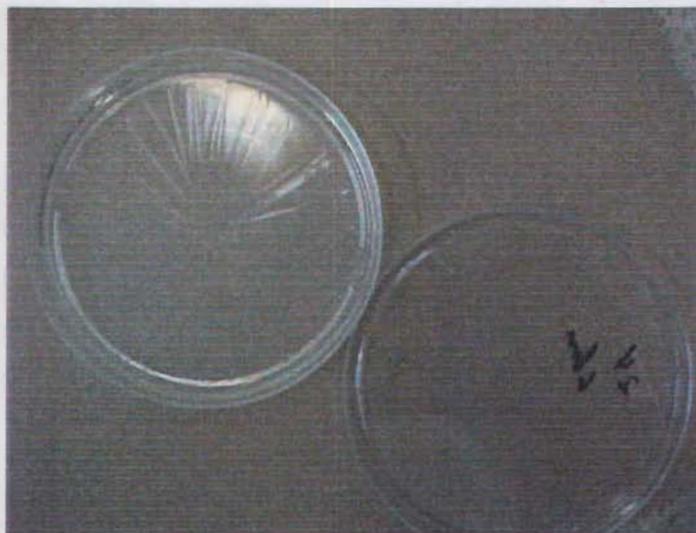
*E. feacalis*

**ANALISIS DE RESULTADOS ETAPA III SOLUCIONES MÁS CONCENTRADAS**  
(tablas 10 -19)

Todos los medicamentos probados fueron efectivos contra *E. feacalis*, *P. aeruginosas*, *B. subtilis* y *E. mutans*, fueron efectivos desde las 6 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 hrs y a las 72 hrs. incontables, lo cual nos indica que clorhexidina a concentraciones por debajo de 0.12% no es efectiva contra la *P. aeruginosas*.



controles



sin crecimiento después 6 horas

## ANALISIS DE RESULTADOS DE LA ETAPA IV

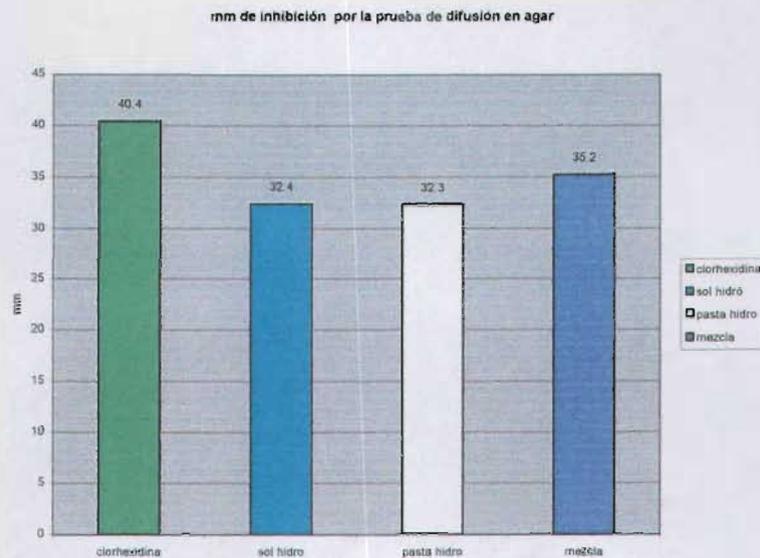
Al análisis estadístico ANOVA:

Si 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).

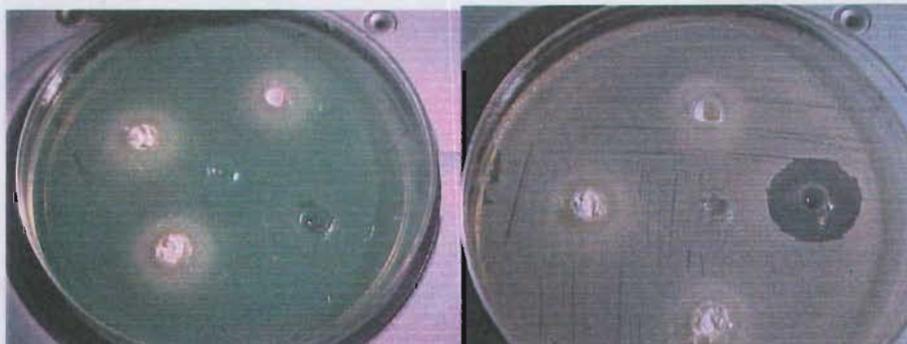
A la prueba LSD el medicamento que tiene mejor antimicrobiano es la clorhexidina, seguido de la pasta de hidróxido de calcio con clorhexidina, después la pasta de hidróxido de calcio y por último la solución de hidróxido de calcio

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

Mientras que la pasta de hidróxido de calcio con clorhexidina tiene mejor efecto sobre la *P. aeruginosas* y la mezcla de todos los microorganismos.



grafica 10



pruebas de difusión

## ANALISIS DE RESULTADOS DE LA FASE II (IDENTIFICACION BACTERIANA)

*Staphylococcus sp.* (65%), *Enterobacter sp.* (10%), *Klebsiella sp.* (7%), *Escherichia sp.* (5%), *Candida sp.* (5%), *Proteus sp.* (4%), *Chryseomonas sp.* (2%) y *Acinetobacter sp.* (2%)

Dentro del Género *Staphylococcus sp.* se identificaron 7 especies . El *Staphylococcus aureus* fue la especie que se aisló con mayor frecuencia con un 31.29%, seguida de *Staphylococcus xylosum* (25%), *Staphylococcus lentus* (18.75%) *Staphylococcus capitis* (12.5%), y por último *Staphylococcus chromogenes* y *Staphylococcus epidermidis* con un 6.25% para cada especie.

Microorganismos Gram negativos:

Se identificó en un 33.3% a *Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella ozaenae* y *Escherichia coli* con 16.6% para cada una. Teniendo a *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Chryseomonas luteola*, *Acinetobacter baumannii/calco* y *Proteus mirabilis* con un 8.33% para cada caso.

## DISCUSION:

La efectividad del hidróxido de calcio a sido demostrada a través de los años y en diferentes investigaciones, actualmente sabemos que el pH (12.2 a 12.8) de este medicamento juega un papel muy importante en sus acciones bactericidas, y mineralizadora sobre los tejidos afectados<sup>25</sup>, si se tiene en cuenta que la mezcla de hidróxido de calcio y clorhexidina conserva el mismo ph (12.6) podemos deducir que por lo tanto se van a conservar las mismas propiedades benéficas.

Una de las grandes polémicas que presenta el hidróxido de calcio respecto a su tempo de acción bactericida sobre el *E. faecalis* y la *P aeruginosas*, que va a varia dependiendo del autor consultado, además la concentración juega también juegan un papel importante, Ferreira<sup>46</sup> dice que concentraciones bajas de hidróxido de calcio tienen poca o nula acción sobre estos gérmenes cosa que fue demostrada en este experimento en la fase 1 ya que concentraciones de .5 % de hidróxido de calcio, presentaron poca inhibición bacteriana, en comparación de la mezcla propuesta de hidróxido de calcio y clorhexidina al .5% y en el estadístico que se realizó con una prueba t de Student se encontró una diferencia significativa de .001 Existen otros estudios como el de Sadafy<sup>27</sup> En el cual menciona que para que la solución de hidróxido de calcio sea efectiva sobre el *E. faecalis* y la *P aeruginosas* se requiere de 48hrs. Se obtuvieron mismos resultados llegamos al utilizar soluciones a una concentración mínima inhibitoria (CMI), pero en concentraciones mayores se observó que el tiempo de acción fue igual al de la clorhexidina, y la mezcla propuesta desde las 6 hrs. mismos resultados obtenidos por Estrela<sup>46</sup> La poca efectividad del hidróxido de calcio señalada por Sundqvist<sup>29</sup> y Siquiera<sup>30</sup> sobre la *P. Aeruginosas* y el *E. Faecalis* no se presentaron en el presente estudio a concentraciones altas y esto puede deberse a los métodos utilizados para evaluar su acción (difusión en agar). Además en las pruebas de difusión en agar las soluciones de hidróxido de calcio, solución de hidróxido de calcio con clorhexidina tienen mejor difusión que la presentación en pastas, en el caso de la mezcla de hidróxido de calcio con clorhexidina, se observó mejor difusión que la de hidróxido de calcio, y demostró mayor difusión la clorhexidina al 0.12

Los estudios que demuestran ineffectividad de la acción del hidróxido de calcio en contra del *Actinomyces israeli*<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 mezcla propuesta aunque tuvo una disminución en la turbidez no fue efectiva, y si se observó efectividad con la clorhexidina al 0.12

En lo que respecta a los efectos secundarios reportados por . Ellingsen<sup>47</sup> sobre el uso de la clorhexidina ( coloración pardo amarillento, descamación de mucosas, etc) esto no se presentarían el caso de la utilización de la mezcla de hidróxido de calcio con clorhexidina, ya que su uso estaría limitado a cavidades cerradas, por lo que no tendrían contacto con los taninos o las mucosas además de que su uso sería por lapsos de tiempo cortos.

## CONCLUSIONES:

- 1) Los resultados obtenidos en esta investigación son muy alentadores, las pruebas microbiológicas efectuadas, demostraron que si se logró sinergismo 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 este 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. Feacalis* y *P. aeruginosas*.
- 5) Tanto el hidróxido de calcio con clorhexidina y la solución de hidróxido de calcio, no son efectivos contra el *Actinomices israeli*.
- 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 6 hrs.
- 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 aeruginosas* y la mezcla del *E. feacalis*, *P. aeruginosas*, *B. Subtilis*, y *E. mutans*.



## BIBLIOGRAFÍA:

- 1.- Kakehashi, S.; Stanley, H.R.; Fitzgerald, R.J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v. 20, p. 340-349, 1965.
- 2.- Wicox. MDP, Drucker.D.B.: In vitro adherence of oral Streptococci in the presence of sucrosa and its relationship to cariogenicity. in the rat *Arch. Of Oral Biol.* 1988, Vol 33: No. 2: 135 – 141
- 3.-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
- 4.- Torneck. C.: A report of studies into changes in the fine structure of dental pulp in human caries pulpitis *JOE*,7:8 1981
- 5.- Seltzer,S., Bender,IB., and Zionts, M.: The dinamics of pulp inflamation: correlations between diagnostic data and actual histologic findings in the pulp . *Oral Surg.*, 16:846, July, 1963
- 6.- Bder,l:B, and Seltzer,S.: The effect of periodontal disease on the pulp.*Oral Sur.*, 33:458, 1972.
- 7.- Sundqvist, G.: Ecology of the root canal flora. *JOE*,18:427, Sept. 1992
- 8.- Lasala A. 1979. *Endodoncia*. 3era ed. Ed Salvat. Barcelona. pp 103-107
- 9.-Buckley JP. 1905. The chemistry of pulp decomposition, with a rational treatment for this condition, and this sequelae. *Dent Cosmos.* 47:223.
- 10.- MacDonald JB, Hare GC, Wood AWS. 1957. The bacteriological status of the pulp chambers in intact teeth found to be nonvital following trauma. *Oral Surg* . 10:318.
- 11.- Sulitzeanu A, Beutner EH, Epstin LI. 1964. Bacteriologic studies of pulp-involved teeth by cultural and microscopic methods *J Am Dent Assoc.* 69:300.
- 12.- Morse DR. 1981. Endodontic microbiology in the 1970s *Int Endod J.* 14:69
- 13.- Naidorf, IJ. 1972. Inflammation and infection of pulp and periapical tissues *Oral Surg.* 34:486.

- 14.- Sunqvist GK, Eckerbom, Sjongren Ut, Capacity of anaerobic bacteria from necrotic pulps to induce purulent infections. *Infect Immun.* 1979,; 25: 685-93
- 15.- Larz . S.W. Spangberg. D:D:S.:Ph. D: Experimental Endodontics 1990 Charper 6: 139
- 16.- CamLing and Kohler P.: Infection with the bacterium *Streptococcus*. *Arch of Oral Biol.* 1987. Vol 32.No. 11: 817 -823
- 17.- 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.
- 18.-Dahlén G, Bergenholtz G. Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps. *J Dent Res* 1980, 59: 1033 -40
- 19.-Paul A. Farber,DDS, Phd. And Samuel Seltzer,DDS, Endodontic Microbiology.I. Etiology *Journal of Endodontics* 1988 p: 363 – 371
- 20.-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.
- 21.-Ingle Ide J, Barkland K Leif: *Endodoncia* Ed. Mc Graw - Hill Interamericana 4 ed: P 668.
- 22.- Ilson J. Soares y Fernando Golber: *Endodoncia técnicas y fundamentos.* Ed. Médica Panamericana Argentina p: 203,216
- 23.- Fava L. Calcium Hydroxide pastes: classifications and clinical indications. *J-Int-Endod-J.* 1999; 32:257-282.
- 24.- 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*
25. Estrela C, Pesce HF (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.
26. Byström A., Claesson, R, and Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endodont. Dent. Traumatol.* 1 :170, 1985.

27. Safavi, K.E., Dowden, W.E., Introcaso, J: H and Langeland, K. : A comparison of antimicrobial effects of calcium hydroxide and iodine potassium iodide. JOE 11 :454, 1985.
28. Estrela C: Pimenta Fc. Ito IY, Bamman LL: In vitro determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide J. Endo, 1996 Sep.. 29 :5. 320 - 6
29. 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, 85(1):86-93 1998 Jan
30. José F. Siqueira ,Jr., DDS, MSC, and 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
31. Panagiotis G. Beltes DDs.Ekefheria Pissiotis, Elizabeth Koulaouzidou and Alexander H. Kortsaris. In vitro release of hydroxyl ions from six types of calcium hydroxide nonsetting paste J Endodontics vol 23: No 7. 1997 : 413 - 415
- 32.- Tronstad L, Andrease JO, 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
- 33.- Caliskan, M.K. Clinical reliability of the dentin bridge formed after pulpotomy : a case report. Int. End. J. 27, 1994.
- 34.- Frank AL . Therapy for the divergent pulpless tooth by continued apical formation. J AM Dent Assoc 1966 ; 72 :87-93.
- 35.- Ekkehort f. Hols. J. Baume L.J. Microradiographic Assesment of Neodentinal bridging following direct pulp capping in human. Journal of Endodontics, 11, 1985.
- 36.- Geoffrey, S. Heithersay. Calcium hidroxide in the treatment of pulpless teeth with associated pathology : Journal of the British Endodontic Society, 2, 1974.

- 37.- José F. Siqueira ,Jr., DDS, MSC, and 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
38. Darkin, H.D. An the use of certain antiseptic substance en the treatment of infected wounds, *Br. Med.J.2*: 318. 1915
- 39, Davies A. : The mode of action of chlorhexidine. *Journal of Periodontal research* 88 :12 :68-73. 1973.
40. Korman K.S. Antimicrobial agents state of the science review. In Løe H. and Kleinman. D. editors : *Dental plaque control measure on oral hygiene practices* Oxford 1986. IRL Press.
41. Emilson, GC, Krasse B. and Westergreen G. effect of a fluoride-containing chlorhexidine gel on bacteria in human plaque. *J. Dent. Res* 84(6) 377-380. 1976.
42. Gelinas, P. and Goulet J. : Neutralization of the activity of eight disinfectants by organic matter. *J. Dent. Res.* 54(2) : 243-247, 1983.
43. Antimicrobial skin cleanser. *Physicians Desk Reference de 37*, p 1977. Oradell NJ. Medical Economics Company. 1983
44. Nielsen, ML. : Anaerobic and aerobic skin bacteria before and after skin disinfections with chlorhexidine, an experimental study in volunteers. *J. Clin. Pathol* 28(10) :793-797, 1975.
45. Loel H. and Schiott. CR. The effect to suppression of the oral microflora upon the development of dental plaque and gingivitis, In : *dental plaque*, de Mc Hugh, WE pp. 247-255. Edimburgh E &S Livingstone 1970.
- 46.-Gjermeo P. Chlorhexidine in dental practice. *J. Clin Periodontol* 1974: 1:143-152
47. Ellingsen, J. Rolla And Erihsenti. : Extrinsic dental stain cause by chlorexidine and other denaturing agents, *J. Clin. Periodontol* : 317, 1982.
- 48.- Wennbery A. Biological evaluation of root canal antiseptic using in vitro and in vivo methods. *J. Dent. Res* 88(1) 46-52. 1982.

- 49.-Vahdty A ; Ford.T.R ; Wilson R.F. Endod. Dent Traumatol Ddenmark Dec 1993 9(6) p 243-248.
- 50.-Jeansonne Michael J. A comparison of 2% Chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hipochlorite as antimicrobial endodontic irrigants J. Of Endod. Vol.20 No. 6 June 1994. 276-278.
- 51.-Medina A. La clorhexidina como solución irrigadora en la terapia 2.5% sodium hipoclorite and 0.2 chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. J. Endod, 1998 Jul, 24:7, 472 -6
- 53.- Ferreira, A.C.S.; Almeida, D.; Fonseca, G. Avaliação do poder bacteriostático e bactericida do hidróxido de cálcio utilizado como curativo de demora nos canais radiculares. Rev. Bras. Odontol., v.35, n.2, p.15-21, mar./abr. 1978.
54. 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, 85(1):86-93 1998 Jan
55. José F. Siqueira ,Jr., DDS, MSC, and 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
56. Carlos Estrela, L.L. Barmmann. F.C. Pimenta, J.D. PECORA Control of microorganisms in vitro by calcium hydroxide paste International Endodontic Journal 32 1 2001: 341 -345

## ANEXO 1

Tinción de Gram se efectuó de la siguiente manera:

En un porta objetos se colocó una gota de agua bidestilada, con una aza previamente esterilizada a calor, se procede a tomar una colonia de la caja de Petri, la cual es colocada sobre el agua bidestilada, se extendió la azada hasta dejar una capa delgada de los microorganismos, se deja a que se evapore el agua y se procede a fijar la preparación a través de calor, para proceder a efectuar la tinción de Gram que consiste en:

Poner colorante a base de cristal violeta por un minuto, decantar con agua corriente, para posteriormente añadir lugol por otro minuto y lavar con alcohol acetona y después con agua corriente y por último se le agrega zaframina, dejándola por un minuto, lavar con agua, esperar a que seque para posteriormente observar al microscopio.

La coloración azul nos indica que los gérmenes a observar son Gram positivos y la coloración rojiza que son Gram negativos.

## ANEXO 2

### ESCALA DE MC. FARLAND

Clave de tubo	Cloruro de Bario (1%)	Acido Sulfúrico (1%)	Suspensión bacteriana correspondiente por mL ( $\times 10^8$ )
1	0.1	9.9	3
2	0.2	9.8	6
3	0.3	9.7	9
4	0.4	9.6	12
5	0.5	9.5	15
6	0.6	9.4	18
7	0.7	9.3	21
8	0.8	9.3	24
9	0.9	9.1	27
10	10	9.0	30

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

### ANEXO 3

#### ETAPA 1

#### MEDICIÓN DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN en mm.

Sol. de Ca(OH) <sub>2</sub> y Clor al 5%	Sol. hidróxido de calcio al 5%
6	0
6	0
6	0
6	0
7	0
7	0
7	0
7	0
7	0
7	0
7	0
7.6	0
8	0
8	0
8.4	0
8.4	0
8.4	6
8.4	6
8.4	6
8.4	6
8.4	6
8.4	6
9	6
9	6
9	6
9	6
9	6
9	6
9	6
9	6
9	7
9	7
9	7
9	7
9.8	7
10	7
10.6	7

11	7
11	7
11	7
11	7
11	7
11	8
11	8.4
11	8.4
11	8.4
12.6	8.4
13	8.4
13	8.4
13	8.4
13	9
15	9
19	9
total	
475mm	249.8mm