

Evaluación de la actividad antimicrobiana del hidróxido de calcio combinado con diferentes concentraciones de omeprazol frente a *enterococcus faecalis*

Evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined omeprazole against *enterococcus faecalis*

Javier Alvear Pérez¹, Pupo Marrugo Stella², Romero Andrés³

Resumen

Objetivos: Evaluar la actividad antimicrobiana del hidróxido de calcio en combinación con omeprazol, a diferentes concentraciones, frente a *E. faecalis*.

Materiales y métodos: Estudio experimental *in vitro* en el que se probó la actividad antimicrobiana del hidróxido de calcio y de hidróxido de calcio más omeprazol en diferentes concentraciones (1, 5, 8 y 10 %) frente a *E. faecalis*, determinando la sensibilidad antimicrobiana en cada uno de los grupos. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la prueba estadística Shapiro Wilk y luego se utilizó la prueba no paramétrica de U Mann-Whitney.

Resultados: se obtuvo una notable sensibilidad de la bacteria al omeprazol, la cual se incrementa a medida que se aumenta la concentración de omeprazol. El grupo de hidróxido de calcio con omeprazol al 10 % tuvo el mayor porcentaje de inhibición (87,7), luego al 8 % con (71,9), al 5 % (67,8) y al 1 % (64,1).

Conclusiones: hay un notable incremento de la actividad antimicrobiana de hidróxido de calcio combinado con omeprazol frente a *Enterococcus faecalis*.

Palabras clave: Hidróxido de calcio, omeprazol, *Enterococcus faecalis*, irrigantes de conductos radiculares, pruebas de sensibilidad microbiana. (Validadas en decs).

Fecha de recepción: 16 de agosto de 2017
Fecha de aceptación: 3 de diciembre de 2017

¹ Odontólogo, Universidad de Cartagena, Especialista en endodoncia Pontificia Universidad Javeriana, Docente Facultad de Odontología, Universidad de Cartagena. Coordinador del Posgrado de Endodoncia Facultad de Odontología, Universidad de Cartagena.

² Odontólogo, Universidad de Cartagena, Especialista en endodoncia Universidad de Cartagena, Docente Facultad de Odontología, Universidad de Cartagena.

³ Estudiante Facultad de Odontología, Universidad de Cartagena.

Correspondencia: Javier Alvear Pérez. Facultad de odontología, Universidad de Cartagena, Barrio Zaragocilla Carrera 50 No. 29 – 11. Correo: jalvearp@unicartagena.edu.co Teléfono: (575) 6698173 Ext. 115

Abstract

Objective: Evaluate the antimicrobial activity of calcium hydroxide in combination with omeprazole at different concentrations, against *Enterococcus faecalis*.

Materials and methods: An *in vitro* experimental study in which the antimicrobial activity of calcium hydroxide and calcium hydroxide plus omeprazole at different concentrations (1 %, 5 %, 8 %, and 10 %) was tested against *E. faecalis*, determining the antimicrobial sensitivity in each of the groups. Statistical analysis of the data was performed using the Shapiro-Wilk statistical test and then the non-parametric Mann-Whitney test was used.

Results: A remarkable sensitivity of the bacteria to omeprazole was observed, which increased as the concentration of omeprazole increases. The calcium hydroxide group plus omeprazole at 10 % had the highest percentage of inhibition (87.7) then 8 % with (71.9), 5 % (67.8) and 1 % (64.1).

Conclusions: There is a significant increase in the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with omeprazole against *Enterococcus faecalis*.

Keywords: Calcium hydroxide, omeprazole, *Enterococcus Faecalis*, irrigants root canal, microbial sensitivity tests. (Mesh).

INTRODUCCIÓN

La terapia endodóntica se basa en la limpieza, conformación y selle hermético del sistema del conducto radicular; sus principales objetivos son la disolución completa del tejido pulpar residual, la eliminación de las bacterias de los canales radiculares y la prevención de la re-contaminación después del tratamiento. La anatomía compleja de los canales radiculares limita la acción mecánica de la instrumentación endodóntica, haciendo que el uso de soluciones químicas con actividad antibacteriana sea recomendable (1).

El hidróxido de calcio como medicamento intraconducto es recomendado para la eliminación de microorganismos en dientes con lesiones apicales por sus propiedades antimicrobianas; utilizado como agente intracanal terapéutico ha demostrado eficacia bactericida y bacteriostática, ya que tiene un efecto destructivo sobre la membrana celular bacteriana y la estructura proteica (2-4). Igualmente se ha demostrado que los restos de tejido necrótico o la presencia de barrillo dentinario sobre las paredes del conducto radicular no permiten que el hidróxido

de calcio como medicación intraconducto penetre en los túbulos dentinarios (5). Para su remoción necesitamos además de sustancias irrigadoras que cumplan con ciertas características y que permitan interacción entre ellas para optimizar el resultado de la desinfección (6).

La flora microbiana de los canales radiculares con fallas endodónticas presenta un predominio de especies Gram positivas, anaerobios facultativos, especialmente el *Enterococcus faecalis*, que posee varios factores de virulencia. Su capacidad para causar enfermedad periradicular luego de una terapia endodóntica debe a su capacidad de sobrevivir en ambientes que pueden ser tóxicos para muchas bacterias y en donde los nutrientes son limitados (7, 8). Actualmente la prevalencia de *Enterococcus faecalis* en conductos radiculares en casos de periodontitis apicales, está asociada a la presencia de estos en saliva (9).

El (*E. faecalis*) tiene la capacidad de persistir en el sistema de conductos radiculares previamente tratados; se ha demostrado que es

resistente al hidróxido de calcio, debido a su bomba de protones que acidifica el citoplasma bacteriano e impide la inhibición enzimática del microorganismo (10); es así como en entornos ácidos o alcalinos las células bacterianas mantienen la homeostasis del pH, donde el pH interno se mantiene dentro de un rango estrecho, de modo que las enzimas y proteínas pueden mantener la función normal. También puede sobrevivir por los polimorfismos genéticos y su capacidad para unirse a la dentina e invadir los túbulos dentinarios (11).

El omeprazol es un fármaco inhibidor de la bomba de protones que actúa a nivel de la célula parietal gástrica, obteniendo con ello una reducción de la secreción ácida. Actualmente se ha demostrado que la asociación de omeprazol (inhibidor de la bomba de protones) con soluciones irrigantes como el hipoclorito de sodio muestran una eficacia antibacteriana superior contra *E. faecalis* en comparación con otras soluciones irrigantes (hipoclorito, clorhexidina y MTAD) (12).

Este trabajo se propone evaluar la actividad antimicrobiana del hidróxido de calcio en combinación con omeprazol frente a *Enterococcus faecalis* y relacionar con datos precisos, si hay una potenciación del efecto antimicrobiano debido a la poca evidencia existente en la actualidad sobre el uso del omeprazol en combinación con materiales de irrigación del sistema de conductos radiculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio analítico observacional en el que se probó la actividad del hidróxido de calcio, del omeprazol y de la solución de hidróxido de calcio combinado con omeprazol en diferentes concentraciones (1, 5, 8, y 10 %). La muestra estuvo constituida por cepa de referencia *E. faecalis* ATCC 29212.

Para la preparación del medio de cultivo se utilizaron 2.8 gramos de agar nutritivo en 100 ml de agua miliQ. Se trasladó a una plancha de calentamiento con agitador magnético hasta ebullición y luego se llevó a una autoclave a 121 °C por 15 minutos, para luego cultivar la bacteria, *E. faecalis*, en cajas de Petri mediante el método de siembra por agotamiento, y se incubó a 37 °C por 24 horas. Luego de eso, para crear el inóculo se tomaron de 5 a 10 colonias aisladas del cultivo bacteriano, y se inocularon en un tubo falcón que contenía 100 µL caldo tripticasa de soya (TSB) para luego vibrarlo en un vórtex, y posteriormente realizar la dilución del inóculo en el medio TSB (en una relación de 1-100).

Consecutivamente, para determinar la curva de crecimiento de la bacteria se tomaron 100 µL del inóculo diluido y con ayuda de una micropipeta se depositó en una microplaca de 96 pozos por triplicado, cada uno en volumen de 100 µL, y se incubó a 37 °C, tomándose lecturas cada hora en un lector MultiScan Ex (Thermo Scientific), a una escala de 0,08 - 0,1 de absorbancia (McFarland 0,5), a una longitud de onda de 620 nanómetros. La primera lectura se llamó hora cero, hasta alcanzar el máximo crecimiento de la bacteria, su posterior estado estacionario y deceso de la bacteria (gráfico 1).

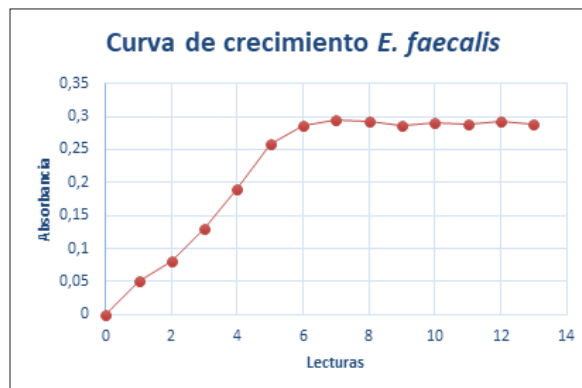


Gráfico 1. Curva de crecimiento bacteriano, *E. faecalis*

Para el desarrollo del ensayo de sensibilidad antimicrobiana por el método de microdilución en placa fue necesaria la preparación de controles de esterilidad, como control de agua, control de medio o caldo, el inóculo bacteriano y control positivo para la inhibición del crecimiento (control de gentamicina); todos estos fueron montados por triplicado a un volumen de 100 µL por pozo, con la excepción del control de gentamicina, el cual estaba conformado por 50 µL del antibiótico y 50 µL del inóculo bacteriano. Para el control positivo de gentamicina se tomaron 2 µL de una solución inyectable de gentamicina de 80 mg/ml (laboratorios Lasanté), y se llevó hasta un volumen de 5 ml en un tubo falcón de 15 ml para obtener una concentración final de 32 µg/ml.

Los compuestos por estudiar fueron sembrados en la microplaca, partiendo de la concentración más alta (10 % de cada compuesto) y finalizando con la solución menos concentrada; al lado de cada compuesto se montó su respectivo blanco, conformado por 50 µL del compuesto en estudio más 50 µL de caldo Mueller Hinton. Una vez sembradas todas las muestras por estudiar se incubó la placa a 37 °C por 24 horas y se realizaron lecturas cada hora por medio de un lector de microplacas Multiscan EX.

Posterior a la recolección de los datos se elaboró tabla matriz en Microsoft Excel versión 2010 para Windows 7. A continuación se aplicó la prueba para el ajuste de los datos a una distribución normal Shapiro Wilk, la cual fue aplicada a cada una de las muestras y se obtuvieron los siguientes resultados: hidróxido de calcio (sig. 0,255); hidróxido de calcio y omeprazol al 1 % (0,378); hidróxido de calcio y omeprazol al 5 % (0,008); hidróxido de calcio y omeprazol al 8 % (0,001); hidróxido

de calcio y omeprazol al 10 % (0,262); estos resultados indican que no cumplieron los supuestos de normalidad e igualdad de varianzas. En consecuencia, se decidió utilizar la prueba no paramétrica U Mann-Whitney para dos muestras independientes por medio del programa estadístico SPSS v. 22.0 IBM y aplicando un nivel de significancia a $p < 0,05$.

RESULTADOS

En el análisis comparativo se aprecian los valores de la inhibición de las diferentes soluciones evaluadas de hidróxido de calcio combinadas con omeprazol en diferentes concentraciones frente a *E. faecalis* (gráfico 2).

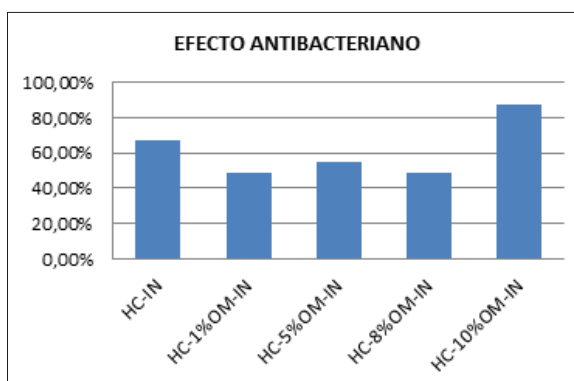


Gráfico 2. Porcentaje de inhibición del hidróxido de calcio más omeprazol en sus diferentes concentraciones

Al realizar el análisis estadístico por medio de la prueba de Mann-Whitney se obtuvieron los siguientes resultados, en se observó que había significancia en cada una de las concentraciones (tabla 1).

Tabla 1. Análisis Descriptivo de hidróxido de calcio más omeprazol a diferentes concentraciones

| Material | Media | Mediana | Desviación Estándar | Varianza | P valor |
|---|--------|---------|---------------------|----------|---------|
| Hidróxido de Calcio con omeprazol (1%) | 0,4897 | 0,4910 | 0,00960 | 0,0 | 0,0 |
| Hidróxido de Calcio con omeprazol (5%) | 0,5479 | 0,5510 | 0,00694 | 0,0 | 0,0 |
| Hidróxido de Calcio con omeprazol (8%) | 0,4897 | 0,4820 | 0,01180 | 0,0 | 0,0 |
| Hidróxido de Calcio con omeprazol (10%) | 0,8703 | 0,8750 | 0,01061 | 0,0 | 0,0 |

Fuente: datos tabulados por el autor.

DISCUSIÓN

En este estudio se comparó la actividad antimicrobiana del hidróxido de calcio más omeprazol en diferentes concentraciones (1, 5, 8 y 10 %) frente a *E. faecalis*, *in vitro*, por medio de la técnica de microdilución en caldo y la espectrofotometría. En el análisis de los resultados se observó que existe significancia estadística en cada una de las concentraciones y que a mayor concentración del omeprazol, se aumenta su potencial antimicrobiano.

Muy pocos autores han estudiado el efecto antimicrobiano de los irrigantes y su comportamiento al combinarlos con diversos materiales. Gandi et al. encontraron que la asociación de omeprazol con hipoclorito de sodio mostró una eficacia antimicrobiana superior contra *E. faecalis* en comparación con la de otros irrigantes (4). Así mismo, Wagner et al. encontraron que la asociación de omeprazol con hidróxido de calcio favoreció una reparación superior de las lesiones periapicales y una actividad selectiva sobre la microbiota endodóntica en comparación con la hidróxido de calcio convencional (13). Dichos autores concuerdan con el resultado de este estudio, en el cual el omeprazol aumenta

su capacidad antimicrobiana a medida que se aumenta la concentración de este, aunque las técnicas utilizadas sean diferentes.

El efecto antimicrobiano del hidróxido de calcio frente a *E. faecalis* en relación con las soluciones irrigantes es muy controversial. Gomes et al., basados en el test de contacto directo y test de difusión en agar, observaron que el hidróxido de calcio más clorhexidina muestra mejor efecto antimicrobiano, a diferencia de Evans et al., quienes concluyen que la clorhexidina no mejora el efecto antimicrobiano del Hidróxido de calcio (14, 15).

El hidróxido de calcio es el medicamento intracanal más común y muestra efectos antimicrobianos bien conocidos; sin embargo, este agente presenta algunas limitaciones. De acuerdo con Tang et al., hay razones principales para la supervivencia y el crecimiento bacteriano a pesar del uso de hidróxido de calcio, como lo son la capacidad de algunas bacterias para sobrevivir en los túbulos dentinarios y ramificaciones de los conductos radiculares, el pH en el conducto, que alcanza niveles neutros después de su uso, y la microfiltración (16).

Actualmente se viene desarrollando la era de la fotoquímica (17, 18) y se hacen esfuerzos por realizar estudios con sustancias naturales que sean realmente efectivas contra *E. faecalis*. En tal sentido, Bormaz en 2017 (19) realizó estudios comparativos del hidróxido de calcio con la caesalpinia espinosa (TARA) al 60 % y sus resultados coinciden con los de Martínez y col., quienes realizaron un ensayo sobre la actividad antibacteriana del hidróxido de calcio solo y con gluconato de clorhexidina, y comprobaron la actividad antimicrobiana de dicha medicación a las 24, 48 y 72 horas. Igualmente, Jahromi, Toubayani y Rezaei (20) encontraron en su estudio que el propóleo, utilizado por sus propiedades antimicrobianas y antiinflamatorias es comparado con el hidróxido de calcio, más efectivo en la reducción de las colonias de *Enterococcus faecalis*, microorganismo presente en la mayoría de los fracasos endodónticos (21).

Los estudios anteriores y otros coinciden con nuestro estudio, en el que también se utilizó una sustancia alternativa, y se comprobó el poder antimicrobiano del omeprazol en todas las concentraciones (22).

Entre las limitaciones de la presente investigación se encuentra el modelo *in vitro* implementado para la determinación de la acción antimicrobiana, lo cual puede impulsar el desarrollo de futuras líneas de investigación en el área de biotecnología, que incluyan no solo este tipo de modelos, sino también la evaluación de la efectividad antimicrobiana en sujetos.

Los resultados de este estudio pueden ser prometedores para el desarrollo de una nueva alternativa en el ámbito clínico de endodoncia. Sin embargo, hay que tener en cuenta que son necesarios más estudios para determinar otras concentraciones de omeprazol y formulaciones alternativas.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El omeprazol potencia significativamente la acción antimicrobiana de hidróxido de calcio frente a *E. faecalis*.

La combinación de hidróxido de calcio con omeprazol podría ser una alternativa de medicación intracanal para mejorar la efectividad de este y así disminuir los fracasos endodónticos.

Conflicto de interés: ninguno

Financiación: Universidad de Cartagena

REFERENCIAS

1. Guerrero-Verdelli D, Zambrano-Matamoras G. Estudio comparativo de dos soluciones irrigadoras activadas y no activadas para la preparación química del conducto radicular visto al MEB. *Dominio de las Ciencias*. 2017;3(2):450-62.
2. Furuya Meguro AT, Arroniz Padilla S, Pacheco SV, Contreras GLP, Péres EM, Gomes LH. Evaluación de la actividad antibacteriana en una mezcla de hidróxido de calcio y clorhexidina al 0.12% como irrigante pulpar. Segunda parte. *Oral*. 2007;8(24):374-9.
3. Giongo M, Santos RAM, Maciel SM, Fracasso MD, Victorino FR. Analysis of pH and release of calcium of association between melaleuca alternifolia oil and calcium hydroxide. *Revista de Odontologia da UNESP*. 2017; 46:0-0 <https://doi.org/10.1590/1807-2577.07816>
4. Gandi P, Vasireddi SR, Gurram SR, Darasani K. Evaluation of the Antibacterial efficacy of Omeprazole with Sodium Hypochlorite as an Endodontic Irrigating Solution-An In-vivo Study. *Journal of international oral health: JIOH*. 2013;5(2):14-20 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3768071/pdf/jioh-05-02-014.pdf>

5. Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spanó JCE, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Brazilian dental journal*. 2002;13(2):113-7.
6. Basrani B. Irrigation in endodontic treatment. *Alpha Omegan*. 2011;104.
7. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root filled teeth with apical periodontitis. *International endodontic journal*. 1998;31(1):1-7.
8. Hancock H, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2001;91(5):579-86.
9. Wang QQ, Zhang C-F, Chu C-H, Zhu X-F. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in saliva and filled root canals of teeth associated with apical periodontitis. *International journal of oral science*. 2012;4(1):19.
10. Evans M, Davies J, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *International Endodontic Journal*. 2002;35(3):221-8.
11. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *Journal of endodontics*. 2006;32(2):93-8.
12. Pupo Marrugo S, Díaz Caballero A, Castellanos Berrio P, Simancas Escorcía V. Eliminación de *Enterococcus faecalis* por medio del uso de hipoclorito de sodio, clorhexidina y MTAD en conductos radiculares. *Avances en Odontostomatología*. 2014;30(5):263-70.
13. Wagner C, Barth VC, de Oliveira SD, Campos MM. Effectiveness of the proton pump inhibitor omeprazole associated with calcium hydroxide as intracanal medication: an in vivo study. *Journal of endodontics*. 2011;37(9):1253-7.
14. Arias MPC, Maliza AGA, Midena RZ, Graeff MSC, Duarte MAH, Andrade FBD. Effect of ultrasonic streaming on intra-dental disinfection and penetration of calcium hydroxide of paste in endodontic treatment. *Journal of Applied Oral Science*. 2016;24(6):575-81.
15. Evans MD, Baumgartner JC, Khemleelakul S-u, Xia T. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. *Journal of endodontics*. 2003;29(5):338-9.
16. Tang G, Samaranayake L, Yip HK. Molecular evaluation of residual endodontic microorganisms after instrumentation, irrigation and medication with either calcium hydroxide or Septomixine. *Oral diseases*. 2004;10(6):389-97.
17. Mashalkar S, Pawar MG, Kolhe S, Jain DT. Comparative evaluation of root canal disinfection by conventional method and laser: An in vivo study. *Nigerian journal of clinical practice*. 2014;17(1):67-74.
18. Tuncay Ö, Dinçer A, Ku tarçı A, Er Ö, Dinç G, Demirbuga S. Effects of ozone and photo-activated disinfection against *Enterococcus faecalis* biofilms in vitro. *Nigerian journal of clinical practice*. 2015;18(6):814-8.
19. Acosta JGB, Arenas VLB, Arenas MCB. Efecto in vitro de la solución Caesalpinia espínosa (Tara) al 60% e hidróxido de calcio y gluconato de clorexhidina al 2% en el halo inhibitorio microbiano de *Enterococcus faecalis*. *Ciencia & Desarrollo*. 2014; 17:13-16. Disponible en: <http://revistas.unjbg.edu.pe/index.php/CYD/article/viewFile/381/332>
20. Dias LG, Pereira AP, Estevinho LM. Comparative study of different Portuguese samples of propolis: pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. *Food and Chemical Toxicology*. 2012;50(12):4246-53.
21. Kayaoglu G, Ömürlü H, Akca G, Gürel M, Gençay Ö, Sorkun K et al. Antibacterial activity of Propolis versus conventional endodontic disinfectants against *Enterococcus faecalis* in infected dental tubules. *Journal of endodontics*. 2011;37(3):376-81.
22. Solak H, Öztan M. The pH changes of four different calcium hydroxide mixtures used for intracanal medication. *Journal of oral rehabilitation*. 2003;30(4):436-9.