

Comparación de la Efectividad Antimicrobiana entre Hipoclorito de Sodio 2.5% y Ácido Hipocloroso 5% frente a *Enterococcus Faecalis*. Prueba In Vitro

Comparison of Antimicrobial Effectiveness between Sodium Hypochlorite 2.5% and Hypochlorous Acid 5% against *Enterococcus Faecalis*. In Vitro Test

Recibido 01/02/2021

Aceptado 05/07/2021

Loiacono R¹, Pérez S², Anaise C¹,
Pinasco L¹, Tejerina D², Gliosca L²,
Molgatini S², Rodríguez PA¹

¹ **Universidad de Buenos Aires**
Facultad de Odontología
Cátedra de Endodoncia
Buenos Aires, Argentina

² **Universidad de Buenos Aires**
Facultad de Odontología
Cátedra de Microbiología y Parasitología
Buenos Aires, Argentina

RESUMEN

La terapia endodóntica tiene como uno de sus objetivos lograr la completa desinfección del sistema de conductos radiculares. Por esto, se deben seleccionar sustancias irrigantes que tengan la capacidad de eliminar todo el contenido de dicho sistema. La acción antimicrobiana es una de las características más importantes a tener en cuenta en la elección. El hipoclorito de sodio (NaOCl) tiene capacidad bactericida sobre muchos de los microorganismos de la flora endodóntica. El *Enterococcus faecalis* es una bacteria altamente resistente a antibacterianos, que sobrevive en condiciones extremas. El ácido hipocloroso (HOCl) es una molécula derivada del NaOCl, que ha demostrado tener alto poder bactericida sobre cepas patógenicas orales. El objetivo de este trabajo fue evaluar y comparar la efectividad antimicrobiana in vitro del NaOCl 2.5% y del HOCl al 5% frente a *Enterococcus faecalis*. Una suspensión de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), de turbidez 0.5 en escala de Mc Farland, fue inoculada en varios tubos de ensayo, los cuales contenían cada antimicrobiano. Se dejaron actuar durante 1, 5 y 10 minutos para luego neutralizarlos e incubarlos a 37°C en condiciones de capnofilia durante 48 horas. Todo el procedimiento se realizó por quintuplicado. Los resultados se midieron mediante recuento de UFC/ml. No se evidenció presencia de *Enterococcus faecalis* en las placas que contenían la solución de NaOCl al 2.5%, como tampoco en aquellas que contenían HOCl al 5%. In vitro, el HOCl y el NaOCl en las concentraciones probadas, eliminaron completamente la cepa de *Enterococcus faecalis*.

Palabras Clave: *Enterococcus faecalis*, ácido hipocloroso, hipoclorito de sodio, irrigantes, conducto radicular

ABSTRACT

The goal of the cleaning of endodontic therapy is to reduce most of the canal contents in the main root canal area. Therefore, the selection of effective microbial control of infected root canals requires detailed knowledge of the microorganisms and the mechanism of action of the antimicrobial solution. The sodium hypochlorite is currently the most effective methods to combat microorganism within the root canal systems of teeth. *Enterococcus faecalis* is a bacterium commonly persistent in endodontic infections and resists nutritional deprivation. The hypochlorous acid is an agent produced via electrolysis of sodium chloride (NaCl) in water and it is highly microbicidal.

The purpose of this study was evaluate and compare the antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 5% HOCl as irrigating substances against *Enterococcus faecalis*. Bacterial test suspensions were adjusted to 0.5 McFarland standard, were inoculated to test tubes, and were added to NaClO/HClO solutions. After 1, 5 and 10 min of exposure the mixture was transferred into neutralizing solution to stop antimicrobial activity and incubated overnight at 37°C under aerobic conditions for 48 hours. The entire procedure was performed in five times. The results were measured by counting CFU/ml. These results indicated that was not bacterial growth for *Enterococcus faecalis* for 2.5% NaClO and 5% HOCl. Based on these in vitro evaluations, *Enterococcus faecalis* were eliminated by 2.5% sodium hypochlorite and 5% HOCl antimicrobial agents.

Key words: *Enterococcus faecalis*, hypochlorous acid, sodium hypochlorite, irrigants, root canal.

INTRODUCCIÓN

La complejidad anatómica del sistema de conductos endodónticos frecuentemente dificulta el acceso del instrumental a áreas tales como conductos laterales, delta apical, istmos, entre otros.

La irrigación durante el tratamiento endodóntico representa entonces, una etapa de gran importancia (Di Spagna Souza et al., 2009; Gavini, 2009; Zmener, 2010). Para ello se emplean diferentes soluciones que eliminan el barro dentinario; unas trabajan sobre los restos pulpares, vitales o necróticos y otras descontaminan, blanquean y aumentan la permeabilidad dentinaria. Actualmente, no existe un irrigante ideal que cumpla con todas estas características.

El hipoclorito de sodio es la solución irrigante de primera elección para el tratamiento endodóntico. Se utiliza desde hace casi 80 años en distintas concentraciones y su principal característica es la capacidad de disolver el tejido necrótico. Además, por su nivel microbiológico, tiene efecto sobre bacterias y hongos. A su vez, posee acción blanqueadora, desodorizante y

es de fácil adquisición con la contrariedad de ser un toxico celular (Loiacono et al., 2016; Gernhardt et al., 2004).

El hipoclorito de sodio actúa sobre los microorganismos como un solvente de materia orgánica, específicamente de ácidos grasos, a los que transforma en sales de ácidos grasos (jabones) y glicerol (C₃H₈O₃), reduciendo la tensión superficial de la solución remanente. Además, neutraliza los aminoácidos, formando agua y sales. Con la disminución de iones Hidroxilo (OH⁻) mediante la formación de agua, se reduce el pH, estimulando la presencia de ácido hipocloroso que, en contacto con componentes orgánicos, actúa como solvente, libera cloro que se combina con el grupo amino de las proteínas, formando cloroaminas. El ácido hipocloroso y los iones hipoclorito (OCl⁻) llevan a la degradación e hidrólisis de aminoácidos (Estrela et al., 2002; Guida, 2006).

En condiciones planctónicas, *Enterococcus faecalis* es capaz de resistir a agentes antibacterianos, puede adaptarse y tolerar tanto ambientes ácidos como alcalinos, puede proliferar bajo amplias variaciones de temperatura y sobrevivir en presencia de soluciones hipertónicas o, incluso, durante períodos prolongados de privación nutricional (Appelbe et al., 2007; Nakajo et al., 2006; Kayaoglu y Ørstavik, 2004). Pero su virulencia se ve exacerbada cuando se encuentra como parte del biofilm endodóntico. La capacidad de formación de biopelícula es otro factor de patogenicidad y la instalación de estas comunidades microbianas organizadas adicionan mayor resistencia a los cambios externos, como la resistencia a antimicrobianos y componentes de la respuesta inmune del hospedero.

En el interior del conducto radicular, *Enterococcus faecalis* es capaz de adherirse mediante adhesinas específicas al colágeno de la dentina y esto le facilita su invasión en los túbulos dentinarios. En la estructura de la biopelícula experimenta cambios fenotípicos bajo la influencia de los factores ambientales intraconducto, los cuales favorecen la proliferación de las comunidades persistentes que quedan remanentes postratamiento endodóntico (Narayanan et al. 2010; Siqueira, 2001; Prada et al. 2019; Stuart et al. 2006; Tennert et al., 2014; Gomes et al., 2006). Esta característica ha motivado a numerosas investigaciones a estudiar diversos protocolos de tratamiento físico y químico del sistema de conductos radiculares que dificulten o impidan la sobrevivencia de *Enterococcus faecalis*, entre otros microorganismos resistentes.

La solución de ácido hipocloroso es utilizada en distintas ramas médicas (oftalmología, ginecología, obstetricia principalmente) en distintas concentraciones (Calderón, 2010; Lafaurie et al., 2015); Henao Riveros y col. (2003), evaluaron la actividad bactericida del ácido hipocloroso sobre numerosas cepas a distintos intervalos de tiempo (1, 2, 10 minutos). En la mayoría

de los casos se evidenció efectividad antibacteriana del 99.9% en bajas concentraciones (0.0225%). En odontología, apenas ha sido estudiada para su uso en el tratamiento de bolsas periodontales (Gualtero Escobar et al. 2015). En endodoncia, existen algunos estudios in vitro, que demuestran que el ácido hipocloroso es un buen agente antimicrobiano y que no afectaría el material orgánico (Loiacono et al., 2016). El propósito de este estudio fue evaluar y comparar la efectividad antimicrobiana in vitro de hipoclorito de sodio 2.5% y de ácido hipocloroso al 5% frente a *Enterococcus faecalis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se preparó una suspensión de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) en caldo BHI y se homologó su turbidez con 0.5 de la escala turbidimétrica de Mc Farland. Se realizó la determinación de la viabilidad de la cepa por diluciones seriadas al décimo y recuento de UFC/ml inicial.

Se dispuso cada solución desinfectante - NaClO 2.5% (Tedequim, Córdoba, Argentina) y HClO 5% (Amuchina, Acraf, SpA, Ancona, Italia) - en un tubo de ensayo estéril y se midió el pH inicial. De igual forma se procedió con la solución neutralizante de Tiosulfato de sodio 0.6% 0.1N.

La exposición de *Enterococcus faecalis* a los distintos antimicrobianos se realizó mediante la inoculación de una alícuota de la suspensión bacteriana en cada tubo conteniendo el antimicrobiano. Se dejó actuar durante 1, 5 y 10 minutos. Inmediatamente, se neutralizó cada antimicrobiano durante 5 minutos y se sembró una alícuota de cada tubo por duplicado en placas de agar BHI y BEA.

El control de inocuidad se cumplió exponiendo la cepa al neutralizante en los tiempos de contacto establecidos para los antimicrobianos y se sembró siguiendo el mismo protocolo. Se incubó el conjunto a 37°C en condiciones de capnofilia durante 48hs. Todo el procedimiento se realizó por quintuplicado para cada tiempo de estudio, tanto para los antimicrobianos como para su neutralizante. La lectura de los resultados se realizó mediante recuento de UFC/ml y en las placas de agar que presentaron crecimiento, se

constató la pureza de los cultivos mediante tinción de Gram y observación microscópica.

RESULTADOS

Los resultados del cultivo de *Enterococcus faecalis* con los dos agentes estudiados evidenciaron un 100% de efectividad antimicrobiana tanto para NaOCl 2.5% (grupo control) como para HOCl 5% (grupo experimental) en todos los tiempos evaluados. Se arriba a esta conclusión debido a la ausencia absoluta de UFC/ml en las placas de agar pasados 1, 5 y 10 min de cada tratamiento. Los datos se muestran en la Tabla 1.

DISCUSIÓN

Uno de los objetivos de la terapia endodóntica es mantener la pieza dentaria en la cavidad bucal y funcionalmente activa, en equilibrio con los microorganismos colonizantes y controlar el estado de procesos infecciosos crónicos y agudos activos (periodontitis apical), eliminando los microorganismos que pudieron ingresar y colonizar en el interior de los canales radiculares, y que ponen en riesgo la estabilidad biológica del sistema de conductos. Para ello se pueden utilizar distintas sustancias químicas que complementan la remoción del barro dentinario durante la instrumentación mecánica (Zmener, 2010; Pérez-Heredia et al., 2006; Espinel Pinzón et al., 2009; Siqueira et al., 2000). En este trabajo se evaluó la acción del ácido hipocloroso sobre *Enterococcus faecalis*, uno de los microorganismos patognomónicos del biofilm endodóntico residual (Gaspar-Zeballos et al., 2013; Gomes et al., 2001).

Distintos autores han evaluado la efectividad de soluciones irrigantes sobre este patógeno, modificando concentraciones y tiempos de acción para evaluar sus efectos (Arias-Moliz et al., 2014; Kishen et al., 2008; Stuart et al., 2006; Lafaurie et al., 2009). Tal es el caso de Lafaurie y col. (2009), quienes observaron que el ácido hipocloroso tiene capacidad desinfectante sobre *Enterococcus faecalis*, entre otros microorganismos, en una concentración de 0.15% (1500 ppm), durante 1, 5, 10 y 15 minutos. Sus resultados demostraron una mortalidad de 99.02% al minuto de exposición y del 100% a los 5 minutos.

Grupo	Tiempo			Efectividad
	1'	5'	10'	
Control NaOCl 2,5%	0 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml	100%
Experimental HOCl 5%	0 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml	100%

TABLA 1. Efectividad de los irrigantes estudiados en diferentes intervalos de tiempo

En el presente trabajo se utilizó una concentración probada de 5% P/V HOCl y los cambios fueron registrados al minuto, 5 y 10 minutos. Los resultados mostraron una efectividad antimicrobiana del 100% en todos los períodos de tiempo evaluados.

Algunos trabajos publicados (García et al., 2010) evalúan la efectividad antimicrobiana del ácido hipocloroso en forma conjunta con la remoción del barro dentinario, observando los resultados al microscopio electrónico de barrido. Es decir, interpretan y correlacionan la eliminación de los microorganismos con la eliminación del barro dentinario, metodología que consideramos poco precisa.

Todos los resultados demostraron el poder bactericida del HOCl sobre *Enterococcus faecalis*. Esta acción podría deberse a su mecanismo de acción sobre los grupos amino presentes en el peptidoglicano de las bacterias Gram +. Es por eso que su acción es más evidente en este tipo de microorganismos que en los Gram -. Además, el ácido hipocloroso interviene en la cascada del complemento C5, estimulando la formación de C5b que también tiene actividad lítica en la membrana celular (Lafaurie et al., 2015).

CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo in vitro podemos concluir que tanto el ácido hipocloroso como el hipoclorito de sodio en las concentraciones estudiadas tienen acción antimicrobiana sobre la cepa de *Enterococcus faecalis*. Esta información, y la disponible en la comunidad científica, deberán ser corroboradas con trabajos in vivo para evaluar acciones y contraindicaciones para su potencial implementación en la rutina de la labor endodóntica.

REFERENCIAS

- Appelbe, O. K., y Sedgley, C. M. (2007). Effects of prolonged exposure to alkaline pH on *Enterococcus faecalis* survival and specific gene transcripts. *Oral Microbiology and Immunology*, 22(3), 169–174. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00340.x>
- Arias-Moliz, M. T., Ordinola-Zapata, R., Baca, P., Ruiz-Linares, M., García García, E., Hungaro Duarte, M. A., Monteiro Bramante, C., y Ferrer-Luque, C. M. (2015). Antimicrobial activity of Chlorhexidine, Peracetic acid and Sodium hypochlorite/etidronate irrigant solutions against *Enterococcus faecalis* biofilms. *International Endodontic Journal*, 48(12), 1188–1193. <https://doi.org/10.1111/iej.12424>
- Calderón, J. L. (2010). Ácido Hipocloroso (HOCl). Una nueva alternativa en antisepsia y desinfección desarrollada en Colombia. *Laboratorio Actual*, 26(42), 27–31.
- Di Spagna Souza, A., Lima Machado, M. E., y Massaro, H. (2009). Sustancias químicas auxiliares utilizadas en endodoncia. Irrigación y aspiración. En: Lima Machado y col. (eds). *Endodoncia: de la biología a la técnica* (pp. 253–267). Amolca.
- Espinel Pinzón, M., García Romero, D., Olarte Collazos, A., Barajas Villamizar, I. y Barrientos Sánchez, S. (2009). Remoción del *Enterococcus faecalis* después de preparación rotatoria e irrigación con hipoclorito de sodio al 5% y gluconato de clorhexidina al 2% con/ sin EDTA al 1.7%. *Universitas Odontologica*, 28(60), 39–43. <http://hdl.handle.net/10554/30671>
- Estrela, C., Estrela, C. R., Barbin, E. L., Spanó, J. C., Marchesan, M. A., y Pécora, J. D. (2002). Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Brazilian Dental Journal*, 13(2), 113–117. <https://doi.org/10.1590/s0103-64402002000200007>
- Garcia, F., Murray, P. E., Garcia-Godoy, F., y Namerow, K. N. (2010). Effect of Aquatane Endodontic Cleanser on smear layer removal in the root canals of ex vivo human teeth. *Journal of Applied Oral Science*, 18(4), 403–408. <https://doi.org/10.1590/s1678-77572010000400014>
- Gaspar-Zevallos, E., Velásquez-Huamán, Z., y Evangelista-Alva A. (2013). Evaluación de tres técnicas de irrigación de conducto radicular frente a la actividad del *enterococcus faecalis*. *Revista Estomatológica Herediana*, 23(2), 68–75. <https://doi.org/10.20453/reh.v23i2.32>
- Gavini, G., Amaral, K. F., y Mello Lemos, E. (2009). Soluciones irrigantes – Agentes desmineralizantes. En: Lima Machado y col. (eds). *Endodoncia: de la biología a la técnica* (pp. 279–298). Amolca.
- Gernhardt, C. R., Eppendorf, K., Kozlowski, A., y Brandt, M. (2004). Toxicity of concentrated sodium hypochlorite used as an endodontic irrigant. *International Endodontic Journal*, 37(4), 272–280. <https://doi.org/10.1111/j.0143-2885.2004.00804.x>
- Gomes, B. P., Ferraz, C. C., Vianna, M. E., Berber, V. B., Teixeira, F. B., y Souza-Filho, F. J. (2001). In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal*, 34(6), 424–428. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2001.00410.x>

- Gomes, B. P., Pinheiro, E. T., Sousa, E. L., Jacinto, R. C., Zaia, A. A., Ferraz, C. C., y de Souza-Filho, F. J. (2006). *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 102(2), 247–253. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.11.031>
- Gualtero Escobar, D. F., Buitrago Ramírez, D. M., Trujillo Pérez, D. A., Calderón Robles, J., y Lafaurie Villamil, G. I. (2015). Efecto de enjuagues de ácido hipocloroso sobre el pH de la saliva: estudio in vitro. *Universitas Odontologica*, 34(72), 83–90. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.uo34-72.efea>
- Guida A. (2006). Mechanism of action of sodium hypochlorite and its effects on dentin. *Minerva Stomatologica*, 55(9), 471–482.
- Henao Riveros, S. C., Sierra Parada, C. R., y Gaitán Alvarez, J. A. (2003). Actividad bactericida del ácido hipocloroso. *Revista de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia*. 51(3), 136–142.
- Kayaoglu, G., y Ørstavik, D. (2004). Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 15(5), 308–320. <https://doi.org/10.1177/154411130401500506>
- Kishen, A., Sum, C. P., Mathew, S., y Lim, C. T. (2008). Influence of irrigation regimens on the adherence of *Enterococcus faecalis* to root canal dentin. *Journal of Endodontics*, 34(7), 850–854. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.04.006>
- Lafaurie, G. I., Aya, M., Arboleda, S., Castillo, D. M., Millán, L. V., Calderón, J., y Ruiz B. N. (2009). Eficacia desinfectante del ácido hipocloroso sobre cepas con poder patogénico de cavidad bucal. *Revista Colombiana de Investigación en Odontología*, 1(1), 3–11.
- Lafaurie, G. I., Calderón, J. L., Zaror, C., Millán, L. V., y Castillo, D. (2015). Ácido hipocloroso: una nueva alternativa como agente antimicrobiano y para la proliferación celular para uso en odontología. *International Journal of Odontostomatology*, 9(3), 475–481. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-381X2015000300019>
- Loiacono, R., Rodríguez, P., Sierra, L., Pinasco, L., Gualtieri, A., y Casadoumecu, A. C. (2016). Hipoclorito de sodio y ácido hipocloroso: capacidad de disolución de tejido orgánico (estudio in-vitro). *Odontología Activa UC-Cuenca*, 1(2), 15–22. <https://doi.org/10.31984/oactiva.v1i2.128>
- Nakajo, K., Komori, R., Ishikawa, S., Ueno, T., Suzuki, Y., Iwami, Y., y Takahashi, N. (2006). Resistance to acidic and alkaline environments in the endodontic pathogen *Enterococcus faecalis*. *Oral Microbiology and Immunology*, 21(5), 283–288. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2006.00289.x>
- Narayanan, L. L., Vaishnavi, C. (2010). Endodontic microbiology. *Journal of Conservative Dentistry*, 13(4), 233–239. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.73386>
- Pérez-Heredia, M., Ferrer-Luque, C. M., y González-Rodríguez, M. P. (2006). The effectiveness of different acid irrigating solutions in root canal cleaning after hand and rotary instrumentation. *Journal of Endodontics*, 32(10), 993–997. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2006.05.016>
- Prada, I., Micó-Muñoz, P., Giner-Lluesma, T., Micó-Martínez, P., Collado-Castellano, N., y Manzano-Saiz, A. (2019). Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 24(3), e364–e372. <https://doi.org/10.4317/medoral.22907>
- Siqueira J. F., Jr (2001). Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *International Endodontic Journal*, 34(1), 1–10. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2001.00396.x>
- Siqueira, J. F., Jr, Rôças, I. N., Favieri, A., y Lima, K. C. (2000). Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *Journal of Endodontics*, 26(6), 331–334. <https://doi.org/10.1097/00004770-200006000-00006>
- Stuart, C. H., Schwartz, S. A., Beeson, T. J., y Owatz, C. B. (2006). *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *Journal of Endodontics*, 32(2), 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.10.049>
- Tennert, C., Fuhrmann, M., Wittmer, A., Karygianni, L., Altenburger, M. J., Pelz, K., Hellwig, E., y Al-Ahmad, A. (2014). New bacterial composition in primary and persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings. *Journal of Endodontics*, 40(5), 670–677. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.10.005>
- Zmener, O. (2010). Estado actual del hipoclorito de sodio en endodoncia. 1: propiedades biológicas. *Revista de la Asociación Odontológica Argentina*, 98(3), 247–255.

CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Dirección para correspondencia

Cátedra Endodoncia
Facultad de Odontología
Universidad de Buenos Aires
Marcelo T de Alvear 2142, Piso 4A
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, C1122AAH
romina.loiacono@odontologia.uba.ar