

Evaluación *in vitro* de la eficacia antimicrobiana de tres materiales de obturación de conductos en dientes temporales

LAURA CARRILLO DATO¹, SONIA GUZMÁN PINA², OLGA CORTÉS LILLO³

¹Odontóloga. ²Profesora Asociada Odontopediatría. ³Profesora Contratada Doctor. Universidad de Murcia. Murcia

RESUMEN

Objetivo: evaluar la eficacia antimicrobiana de tres materiales de obturación radicular en odontopediatría.

Materiales y método: hidróxido de calcio, Vitapex® y Endoflas® se evaluaron y compararon entre sí. La actividad antimicrobiana fue evaluada contra *Escherichia coli*, bacteria aislada comúnmente en los canales radiculares de dientes primarios. La estadística descriptiva y la estadística analítica (prueba U de Mann-Whitney) se realizaron para valorar los resultados.

Resultados: todos los materiales mostraron actividad antimicrobiana pasadas 24 horas. La comparación intergrupar reveló diferencias significativas. Endoflas® mostró zonas de inhibición significativamente más altas.

Conclusiones: Endoflas® tiene actividad antimicrobiana superior, seguido de hidróxido de calcio y Vitapex®.

PALABRAS CLAVE: Materiales de obturación radicular. Actividad antimicrobiana. Hidróxido de calcio. Vitapex®. Endoflas FS®.

INTRODUCCIÓN

La conservación del diente primario continúa siendo un desafío importante en odontopediatría (1). La importancia del mantenimiento de los dientes temporales hasta el momento de su exfoliación de forma natural se debe a que estos preservan el espacio en la arcada, salvaguardan la estética y la masticación, guían la erupción de la dentición permanente y evitan hábitos anormales de deglución y fonación, entre otros (2).

Un correcto diagnóstico ha de ser siempre el paso previo que nos guíe hacia el tratamiento adecuado, sobre todo en lo referente a las patologías que comprenden el complejo

ABSTRACT

Objective: to evaluate the antimicrobial efficacy of three root canal obturation materials in pediatric dentistry.

Materials and method: calcium hydroxide, Vitapex® and Endoflas® were evaluated and compared with each other. Antimicrobial activity was evaluated against *Escherichia coli*, bacteria commonly isolated from the root canals of primary teeth. A descriptive statistics and analytical statistics (Mann-Whitney's U-test) were performed to evaluate the results.

Results: all materials showed antimicrobial activity after 24 hours. The intergroup comparison revealed significant differences. Endoflas® showed significantly higher inhibition zones.

Conclusion: Endoflas® has superior antimicrobial activity, followed by calcium hydroxide and Vitapex®.

KEYWORDS: Root filling materials. Antimicrobial activity. Calcium hydroxide. Vitapex®. Endoflas FS®.

dentino-pulpar. La pulpa puede variar de un estado reversible a irreversible. Si se encuentra todavía dentro de los márgenes fisiológicos, la capacidad de reparación del órgano dentino-

Recibido: 22/11/2019 • Aceptado: 17/01/2020

Carrillo Dato L, Guzmán Pina S, Cortés Lillo O. Evaluación *in vitro* de la eficacia antimicrobiana de tres materiales de obturación de conductos en dientes temporales. *Odontol Pediatr* 2020;28(1):3-13

pulpar junto con los tratamientos adecuados permitirá solventar la agresión y permitir la conservación del diente en boca (2).

Sin embargo, esta capacidad de reparación pulpar es limitada en aquellos casos en los que la patología se instala de forma irreversible, momento en el que serán necesarios tratamientos más complejos en la dentición temporal, como la pulpectomía (2).

La mayoría de las patologías de pulpaes son causadas por infecciones microbianas, siendo la caries el medio más frecuente por el cual las bacterias se aproximan a la pulpa, existiendo también otros por los cuales se produce infiltración bacteriana, como los túbulos dentinarios, defectos en el sellado marginal de las restauraciones o los traumatismos, de gran incidencia en la población infantil (3).

Actualmente los estudios coinciden en la naturaleza polimicrobiana de estas infecciones endodónticas, siendo además prevalentes las especies anaerobias, obligadas y facultativas (4,5).

La pulpectomía estaría indicada como tratamiento en aquellos casos de afectación pulpar irreversible o necrosis, con el objetivo de conservar el diente en boca. Está contraindicada en aquellos casos en los que el diente, aun presentando síntomas, no sea susceptible de restauración, presente reabsorción interna de sus raíces, insuficiente soporte óseo y radicular o presencia de quiste radicular. Así mismo, la raíz deberá presentar al menos dos tercios de su longitud normal (6,7).

Este se lleva a cabo a través de la eliminación del tejido pulpar radicular, la instrumentación de los conductos radiculares bien sea con instrumentos manuales o rotatorios, la obturación de los canales radiculares con un material reabsorbible y finalmente la restauración del diente.

A pesar de ser un tratamiento que se lleva a cabo de forma habitual en dientes temporales, se ha de tener en cuenta que la dentición temporal presenta unas características anatómicas que pueden ser más complejas, con canales radiculares más estrechos y curvos, cámaras pulpares más grandes o cuernos pulpares más altos.

Todo ello, sumado al cambio que las raíces sufren durante su proceso fisiológico de reabsorción, hace que conseguir canales totalmente limpios y desinfectados sea difícil de lograr únicamente con la instrumentación e irrigación.

Es por ello que, para asegurar una desinfección eficaz de los conductos, hay que seleccionar bien el material que empleamos, pues nos ayudara a asegurar el éxito del tratamiento (1).

Los requisitos que debe cumplir un buen material de obturación son:

- Ser antiséptico.
- Fácil obturación radicular.
- Se debe reabsorber a velocidad similar a la raíz del diente primario.
- Ser inocuo para los tejidos periapicales y el germen del sucesor permanente.
- Se debe reabsorber fácilmente si se comprime más allá del ápice.
- Adherirse adecuadamente a las paredes radiculares y no contraer.

- Ser de fácil eliminación en caso de ser necesario.
- Ser radiopaco.
- No decolorar el diente.

Se han propuesto a lo largo de los años numerosos materiales para el relleno del conducto radicular en dientes primarios tras el tratamiento de pulpectomía. Entre ellos encontramos habitualmente algunos como el óxido de zinc-eugenol, el hidróxido de calcio o los materiales a base de yodoformo. A pesar de sus propiedades beneficiosas, presentan varios inconvenientes como la acción tóxica del eugenol, en el caso del óxido de zinc-eugenol, una reabsorción más rápida en relación con las raíces en los casos de hidróxido de calcio y yodoformo o cierta irritación de los tejidos periapicales al sobrepasar el ápice también en el caso de este último (8).

Con el objetivo de compensar las desventajas del uso de un material individual y el empeño de encontrar materiales nuevos con menos inconvenientes, aparecen materiales a partir de la combinación de los anteriores. Entre ellos podemos encontrar algunos como:

- *Vitapex*[®]: material de obturación de conductos radiculares en dentición temporal que se compone de hidróxido de calcio (30,3 %), yodoformo (40,4 %) y aceite de silicona (22,4 %) y que, junto con otros materiales de composición similar, como *Metapex*[®], ha obtenido a lo largo del tiempo en algunos estudios altas tasas de éxito clínico (9,10).

Entre sus características destacan el ser de fácil aplicación, radiopaco, ser antibacteriano y bacteriostático, no presenta efectos nocivos para los gérmenes de los dientes permanentes y se puede retirar con facilidad en caso de ser necesario. Como inconveniente, es un material que se reabsorbe con algo más de rapidez que las raíces de los dientes deciduos (11).

- *Endoflas*[®]: material que surge a partir de la combinación tres materiales individuales, óxido de zinc-eugenol, hidróxido de calcio y yodoformo. Este se compone de una mezcla de polvo que contiene tri-iodometano y yodo dibutilorthocresol (40,6 %), óxido de zinc (56,5 %), hidróxido de calcio (1,07 %) y sulfato de bario (1,63 %), con un líquido consistente en eugenol y paramonoclorofenol (8). Entre sus características, es un material hidrófilo que presenta un amplio espectro antimicrobiano, lo que facilitaría la desinfección de los canales accesorios, poco accesibles, y en aquellos casos en los que la instrumentación mecánica no sea posible por su anatomía. Sus componentes son biocompatibles y reabsorbibles coincidiendo generalmente con la raíz del diente temporal (8).

Finalmente, a pesar de todos los avances en cuanto a este tipo de materiales de obturación radicular, hoy en día ninguno de ellos cumple todavía con todos los criterios necesarios para lograr ser el material de obturación ideal. De ahí que las propiedades mecánicas, funcionales o antibacterianas, siguen siendo objeto de investigación, con el propósito de aumentar el conocimiento acerca de estos materiales y, por consiguiente, el éxito de las pulpectomías en dentición temporal.

OBJETIVOS

El objetivo principal consiste en estudiar la eficacia antimicrobiana de tres materiales de obturación radicular (Ca(OH)₂, Vitapex® y Endoflas®) utilizados en dentición temporal.

MATERIAL Y MÉTODO

Como se ha mencionado anteriormente y considerando que una necrosis pulpar es producto de una infección polimicrobiana, se seleccionó la cepa *Escherichia coli* (CECT 101), de referencia para el control de antimicrobianos, teniendo en cuenta que la literatura refiere también una mayor prevalencia de microorganismos anaerobios, tanto estrictos como facultativos (4).

Como material necesario se empleó también:

- Cabina de flujo vertical.
- Placas de Petri con medio sólido (9 cm).
- Asas de siembra Digransky.
- Micropipeta 100 uL.
- Puntas de pipeta desechables.
- Pinzas metálicas porta discos.
- Esterilizador de bolas de vidrio.
- Papel de parafina.
- Regla.
- Discos de papel de filtro estériles para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.
- Estufa de incubación (37 °C).

El procedimiento se llevó a cabo en la Sección de Experimentación Agroforestal del centro de apoyo a la investigación de la Universidad de Murcia.

Previamente a la realización del estudio experimental se seleccionaron y dividieron los materiales en grupos (Tabla I).

De esta forma, los materiales se obtuvieron ya de forma premezclada, como en el caso de Vitapex®, el cual encontramos comercialmente en jeringa de 2 g, o se mezclaron empleando reacciones de polvo líquido estándar en los casos de Ca(OH)₂ empleando como vehículo agua destilada y en el caso de Endoflas®, el cual encontramos también comercialmente disponible en forma de polvo y líquido.

Además, en el caso de Endoflas®, al ser un material en el que se produce una reacción de quelación al mezclar en polvo con el líquido eugenol, formándose eugenolato de zinc, se decidió medir su acción antimicrobiana tanto en consistencia densa como fluida, para comprobar cómo se sigue comportando este material cuando pasa el tiempo al producirse esta reacción.

El procedimiento *in vitro* se realizó mediante el método de difusión en Agar, trabajando en el interior de la cámara de bioseguridad para evitar la posible contaminación de las muestras con el medio ambiente.

Para ello, en primero lugar se llevó a cabo la siembra bacteriana en las placas de Petri utilizando como medio de cultivo Agar nutritivo, un medio sólido, no selectivo y no diferencial empleado generalmente para el aislamiento de microorganismos poco exigente en lo que se refiere a requerimientos nutritivos.

Para cada uno de los tres materiales a evaluar se inocularon cuatro placas con la ayuda de las micropipetas, con 100 microlitros de la suspensión del microorganismo, extendiendo esta por toda la placa mediante las asas de siembra. Además, se inocularon dos placas más que nos servirían para establecer el grupo control.

Sobre esta superficie de Agar previamente inoculada con la suspensión del microorganismo, se colocaron los discos de papel impregnados con los diferentes materiales, con la ayuda de una pinza estéril, poniendo tres discos en cada placa, a una distancia no menos de 15 mm entre ellos y a 1,5 cm del borde de la placa.

TABLA I.
MATERIALES DE OBTURACIÓN UTILIZADOS EN EL ESTUDIO

Grupo 1	Hidróxido de calcio (Ca(OH) ₂) + Agua destilada	Hidróxido de calcio	Proporción polvo-líquido 1:1
Grupo 2	Vitapex®	Hidróxido de calcio, yodoformo, aceite de silicona	Disponible comercialmente en forma de pasta
Grupo 3	Endoflas FS® consistencia densa	Polvo: hidróxido de calcio, yodoformo, sulfato de bario, óxido de zinc. Líquido: eugenol	El polvo y el eugenol se mezclaron en una consistencia homogénea de pasta, dejando fraguar 10 minutos antes de su colocación
Grupo 4	Endoflas FS® consistencia fluida	Polvo: hidróxido de calcio, yodoformo, sulfato de bario, óxido de zinc. Líquido: eugenol	El polvo y el eugenol se mezclaron en una consistencia homogénea de pasta
Grupo 5	Grupo control	-	-

Tan pronto como el disco impregnado con el material entra en contacto con la superficie húmeda del Agar, el filtro absorbe el agua y permite que el material difunda al medio. Una vez finalizada la colocación de los discos en las placas, estas fueron selladas con papel de parafina y transportadas a una estufa de incubación durante 24 horas a 37 °C, condiciones necesarias para que se produzca el crecimiento bacteriano.

Pasadas las 24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición (halo de inhibición) en el que no existe crecimiento bacteriano debido a la acción del material. Se mide posteriormente el diámetro de cada uno de esos halos de inhibición con una regla correctamente calibrada, obteniendo cuatro valores expresados en milímetros para cada uno de los discos en cada placa, de los cuales se obtendrá posteriormente un valor medio.

Se realizó un análisis estadístico descriptivo de las variables incluidas en el estudio. El estudio analítico se llevó a cabo mediante tablas de contingencia para ver la relación entre las variables. La asociación de variables cualitativas entre sí se estimó por medio de la prueba para variables cuantitativas Mann Whitney, para poder facilitar la posterior diferencia significativa. Se tomó como valor de significación $p < 0,05$. El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico SPSS 19.0.

RESULTADOS

Los casos control no revelaron inhibición del crecimiento bacteriano mientras que en todos los casos con materiales dieron lugar a zonas de inhibición alrededor de los discos de las placas de cultivo. Según la prueba de Mann Whitney los materiales de obturación utilizados en este estudio no son iguales respecto a su capacidad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* (Fig. 1).

No existen diferencias significativas entre los materiales hidróxido de calcio y el sellado Vitapex®, mostrando el sellador de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ con agua destilada una media de 7,93 mm y Vitapex® de 7,73 mm, con una significancia de 0,525.

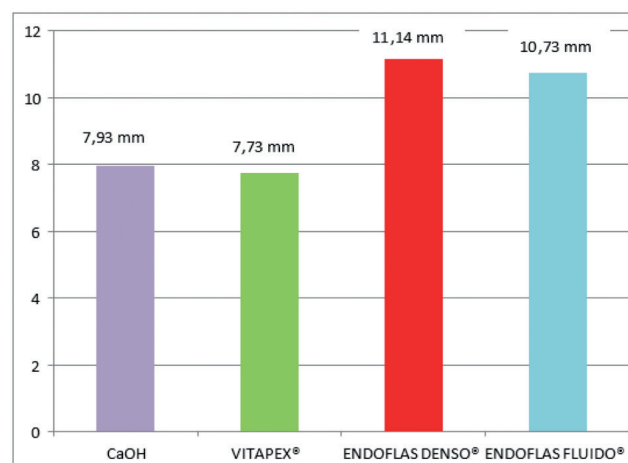


Fig. 1. Media de inhibición (mm) de los materiales empleados en este estudio contra *E. coli*.

Por otro lado, existen diferencias significativas entre los grupos Endoflas® y $\text{Ca}(\text{OH})_2$ respecto a su actividad antimicrobiana contra *E. coli*, ya que tanto en su forma densa como fluida, con medias de 11,14 y 10,73 mm respectivamente, Endoflas® presenta valores más altos que los observados para $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 7,93 mm de media, con una significancia de $p < 0,05$.

De igual modo, existen también diferencias significativas entre los grupos Endoflas® y Vitapex®, siendo las medias obtenidas para Endoflas® de 11,14 y 10,73 mm en su consistencia densa y fluida, respectivamente, y de 7,73 mm para Vitapex®, con una significancia de 0,002 al comparar este último con la consistencia densa de Endoflas® y de 0,001 al compararlo con su consistencia fluida.

Con respecto al material Endoflas®, el análisis de los resultados demuestra que tampoco existen diferencias significativas respecto a su eficacia antimicrobiana al emplearlo en consistencia densa o fluida, con una significancia de 0,058 (Tabla II).

TABLA II.
ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DEL TAMAÑO DEL HALO INHIBITORIO (mm)
DE LOS MATERIALES EMPLEADOS EN EL ESTUDIO

Material	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	Vitapex®	Endoflas® denso	Endoflas® fluido
Media	7,93	7,73	11,14	10,73
Mediana	7,5	7,75	11	10,5
Moda	8,75	8	11	10,5
Desviación estándar	1,09	0,65	0,44	0,74
Mínimo	6,25	6,25	10,5	10
Máximo	10	8,5	12	13

DISCUSIÓN

La pulpectomía tiene como objetivo primordial en odontopediatría el mantenimiento de los dientes primarios hasta la erupción, en condiciones normales, de sus sucesores permanentes. Es por ello que, centrándonos en la particularidad de los dientes primarios, la naturaleza compleja y curva de estos canales, sumado a los cambios que sufren en su proceso fisiológico de reabsorción, requieren que los materiales empleados para completar el proceso de desinfección posean propiedades como la biocompatibilidad o el potencial antimicrobiano.

El hidróxido de calcio Ca(OH)_2 como material de obturación endodóntico frente a *Escherichia coli* demostró ser eficaz. Ramar y Mungara (9) observan que el principal efecto biológico de este material provendría de la disociación de iones de calcio e hidróxilo, cuya acción en tejidos y bacterias explicaría su acción biológica y antibacteriana. Además, posee otros efectos beneficiosos como la formación de puentes dentinarios.

El tamaño de halo inhibitorio para hidróxido de calcio en este estudio fue de 7,93 mm de media, que es un valor pequeño si lo comparamos con los resultados de otros estudios realizados anteriormente como el de Kriplani y cols. (12) en el que se encuentran valores de inhibición medios de 10 mm. En el estudio de Amorim y cols. (13) se encuentra un valor medio de inhibición de 11 mm al evaluar la eficacia antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis*, que es una bacteria que comparte las características de ser anaerobia facultativa, al igual que *Escherichia coli*, y que junto con esta son dos de las cepas que sirven como referencia en estas pruebas de sensibilidad antimicrobiana.

Por otro lado, en estudios como el de Reddy y Ramakrishna (14) se demuestra la capacidad antimicrobiana de hidróxido de calcio frente a 23 especies bacterianas aisladas en los conductos radiculares de dientes primarios, siendo el resultado de inhibición de 7 mm de media, valor que guarda similitud con el obtenido en este estudio.

Además, otros autores como Blanscet y cols. (15) quisieron comprobar si variando el porcentaje de hidróxido de calcio existía diferente efecto antimicrobiano, concluyendo que, a mayores concentraciones se mostraban mayores zonas de inhibición que al emplear concentraciones más pequeñas, aspecto que puede tener importancia en el caso de estos materiales que podemos mezclar con diferentes vehículos, como el agua destilada en este caso.

Las propiedades antibacterianas de los selladores a base de hidróxido de calcio y yodoformo, Vitapex[®], también han sido evaluadas a través de varios estudios. Haryny Priya y cols. (16), encontraron en su estudio valores de inhibición para Vitapex[®] de 14,75 mm a través de la elaboración de pocillos sobre la superficie del Agar en el que se colocaron directamente los materiales, un valor mucho más alto que el encontrado en este estudio, de 7,73 mm.

Son diversos los trabajos que avalan el éxito clínico de Vitapex[®] o materiales de composición similar a este, como Metapex[®], llegándose a encontrar tasas de éxito entre el

90 y el 100 % en algunos estudios (8,11). También son varios los estudios en los que estos materiales no muestran buenos resultados en las pruebas de difusión en Agar, como los trabajos de Navit y cols. (17) o el de Kriplani y cols. (12), en los que se encuentran cifras de inhibición de 1,8 y 3,3 mm de media, valores mucho más pequeños que los encontrados en este estudio. Incluso existen estudios en los que llegan a no encontrarse halos de inhibición para este material, como los trabajos de Amorim y cols. en 2006 (13) o el de Hegde y cols. en 2012 (18).

Esta actividad deficiente en algunas de estas pruebas podría deberse, según autores como Blanscet y cols. (15), a que sus iones de calcio están recubiertos de aceite de silicona, que se encuentra entre los componentes de su fórmula, y que disminuye la disociación iónica de los iones de calcio. Por tanto, en estas formulaciones no acuosas, la conductividad del material sería menor, puesto que esta es proporcional a la disociación iónica.

La literatura cuenta con múltiples estudios que afirman que el sellador Endoflas[®] posee un adecuado efecto antimicrobiano. Hegde y cols. (18) o Arora y cols. (19), encuentran en sus estudios valores de inhibición de 12,5 e incluso 23,2 mm, cifras mucho más altas en comparación con el resto de los materiales.

Si bien, en la mayoría de los estudios en los que Endoflas[®] está presente, este suele obtener siempre los mejores resultados en cuanto a eficacia antimicrobiana que el resto de los materiales (18-20). Nuestro estudio también demuestra que Endoflas[®] posee la mayor eficacia antimicrobiana, tanto al emplearlo en su forma densa como fluida, con valores de inhibición media de 11,14 y 10,73 mm, respectivamente.

Esta alta actividad antimicrobiana se debe probablemente a la combinación de sus materiales como el yodoformo y el eugenol, ambos de los cuales tienen acción antibacteriana. El eugenol actúa por degeneración de las proteínas, mientras el yodoformo es un agente oxidante (20).

Por otro lado, y como se ha podido comprobar también en este estudio, incluso después de que el material endurezca al dejarlo fraguar por un tiempo antes de su colocación, tras producirse la reacción de quelación que tiene lugar al mezclar el polvo con el líquido eugenol, la hidrólisis de la superficie del quelato sigue resultando en la liberación de eugenol, lo que explicaría la actividad antimicrobiana de este material después de pasado el tiempo y dejarlo fraguar.

No obstante, este alto poder antimicrobiano de Endoflas[®] también nos hace pensar en que, tras ello, puede existir una reacción tóxica no solo para las bacterias, sino que también puede repercutir en el resto de los tejidos biológicos del diente, lo que a la larga no resultaría beneficioso en la dentición temporal.

Se deben llevar a cabo todos los procedimientos adecuados para reducir al máximo las bacterias presentes en los conductos radiculares de los dientes temporales, utilizando soluciones irrigadoras, instrumentos adecuados, así como materiales de obturación adecuados que posean actividad antimicrobiana contra los patógenos que frecuentemente afectan a esta dentición.

CORRESPONDENCIA:

Olga Cortés
 Unidad Docente de Odontopediatría
 Universidad de Murcia
 Hospital General Universitario Morales Meseguer
 Avda. Marqués de los Velez, s/n. 2.ª planta
 30008 Murcia
 e-mail: ocortes@um.es

CONCLUSIONES

- Todos los materiales de obturación radicular utilizados en este estudio mostraron actividad antimicrobiana contra el microorganismo probado (*Escherichia coli*).
- Encontramos que Endoflas® presenta la mayor actividad antimicrobiana frente al resto de los materiales ($p < 0,05$), al emplearlo tanto en forma densa como fluida, seguido por el hidróxido de calcio Ca(OH)_2 y Vitapex®.
- Se precisan más estudios con mayor número de cepas y en condiciones de trabajo lo más parecidas posibles a las habituales, además de valorar, no sólo el efecto antimicrobiano, sino también la potencial toxicidad de estos materiales sobre los tejidos periapicales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Waterhouse PJ, Whitworth JM. Tratamiento endodóntico para la dentición primaria y permanente joven. En: Rotstein I, editor. Cohen. Vías de la pulpa. 11ª ed. Barcelona: Elsevier; 2016. pp.850-65.
2. Mc Donald R, Avery D, Dean J. Treatment of deep caries, vital pulp exposure and pulpless teeth. En: Dentistry for the child and adolescent. 8th ed. Mosby; 2004. pp.388-412.
3. Ribeiro Sobrinho AP, Massara MLA, Tavares WLF, Neves de Brito LC, Teles RP, Teles FR, et al. Microbiota of deciduous endodontic infections analysed by MDA and Checkerboard DNA-DNA hybridization. Int Endod J 2011;44(3):225-35.
4. Da Silva LA, Nelson-Filho P, Faria G, De Souza-Gugelmin MC, Ito IY. Bacterial profile in primary teeth with necrotic pulp and periapical lesions. Braz Dent J 2006;17(2):144-8.
5. Praetzel JR, Ferreira FV, Weiss RN, Friedrich RS, Guedes-Pinto AC. Antimicrobial action of a filling paste used in pulp therapy in primary teeth under different storage conditions. J Clin Pediatr Dent 2008;33(2):113-6.
6. Cortés O, Boj JR. Tratamientos pulpareos en la dentición temporal. En: Boj JR, Catalá M, García-Ballesta C, Mendoza A, Planells P, editores. Odontopediatría. La evolución del niño al adulto joven. Madrid: Ed. Ripano; 2011. pp.334-50.
7. American Academy of Pediatric Dentistry. Reference Manual. Guideline Pulp Therapy for Primary and Immature Permanent Teeth. Pediatr Dent 2018;40:343-51.
8. Pinto DN, de Sousa DL, Araújo RB, Moreira-Neto JJ. Eighteen-month clinical and radiographic evaluation of two root canal-filling materials in primary teeth with pulp necrosis secondary to trauma. Dent Traumatol 2011;27(3):221-4.
9. Ramar K, Mungara J. Clinical and radiographic evaluation of pulpectomies using three root canal filling materials: An in-vivo study. J Indian Soc Pedod Prev Dent 2010;28(1):25-9.
10. Barcelos R, Maia L, Santos M, Luiz R, Primo L. ZOE paste pulpectomies outcome in primary teeth: A systematic review. J Clin Pediatr Dent 2015;35(3):241-8.
11. Mortazavi M, Mesbahi M. Comparison of zinc oxide and eugenol, and Vitapex for root canal treatment of necrotic primary teeth. Int J Paediatr Dent 2004;14(6):417-24.
12. Kriplani R, Thosar N, Baliga MS, Kulkarni P, Shah N, Yeluri R. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of various root canal filling materials along with Aloe vera used in primary teeth: A microbiological study. J Clin Pediatr Dent 2015;37(3):257-62.
13. Amorim LF, Toledo OA, Estrela CR, Decurcio DA, Estrela C. Antimicrobial analysis of different root canal filling pastes used in pediatric dentistry by two experimental methods. Braz Dent J 2006;17(4):317-22.
14. Reddy S, Ramakrishna Y. Evaluation of antimicrobial efficacy of various root canal filling materials used in primary teeth: A microbiological study. J Clin Pediatr Dent 2007;31(3):193-8.
15. Blanscet ML, Tordik PA, Goodell GG. An Agar diffusion comparison of the antimicrobial effect of Calcium Hydroxide at five different concentrations with three different vehicles. J Endod 2008;34(10):1246-8.
16. Harini Priya M, Bhat SS, Sundeep Hegde K. Comparative evaluation of bactericidal potential of four root canal filling materials against microflora of infected non-vital primary teeth. J Clin Pediatr Dent 2010;35(1):23-30.
17. Navit S, Jaiswal N, Khan SA, Malhotra S, Sharma A, Mukesh, et al. Antimicrobial efficacy of contemporary obturating materials used in primary teeth- an in-vitro study. J Clin Diagnostic Res 2016;10(9):9-12.
18. Hegde S, Lala PK, Dinesh RB, Shubha A. An in vitro evaluation of antimicrobial efficacy of primary root canal filling materials. J Clin Pediatr Dent 2012;37(1):59-64.
19. Arora S, Mir S, Gautam A, Batra R, Soni S, Lata K. Evaluation of antimicrobial efficacy of root canal sealers against Enterococcus faecalis: A comparative study. J Contemp Dent Pract 2018;19(6):680-3.
20. Neelakantan P, Subbarao CV. An Analysis of the Antimicrobial activity of ten root canal sealers - A duration based in vitro evaluation. J Clin Pediatr Dent 2008;33(2):31-6.

In vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of three obturation materials on the root canals of primary teeth

LAURA CARRILLO DATO¹, SONIA GUZMÁN PINA², OLGA CORTÉS LILLO³

¹Dentist. ²Associate Professor of Pediatric Dentistry. ³Associate Professor. University of Murcia. Murcia, Spain

ABSTRACT

Objective: to evaluate the antimicrobial efficacy of three root canal obturation materials in pediatric dentistry.

Materials and method: calcium hydroxide, Vitapex® and Endoflas® were evaluated and compared with each other. Antimicrobial activity was evaluated against *Escherichia coli*, bacteria commonly isolated from the root canals of primary teeth. A descriptive statistics and analytical statistics (Mann-Whitney's U-test) were performed to evaluate the results.

Results: all materials showed antimicrobial activity after 24 hours. The intergroup comparison revealed significant differences. Endoflas® showed significantly higher inhibition zones.

Conclusion: Endoflas® has superior antimicrobial activity, followed by calcium hydroxide and Vitapex®.

KEYWORDS: Root filling materials. Antimicrobial activity. Calcium hydroxide. Vitapex®. Endoflas FS®.

RESUMEN

Objetivo: evaluar la eficacia antimicrobiana de tres materiales de obturación radicular en odontopediatría.

Materiales y método: hidróxido de calcio, Vitapex® y Endoflas® se evaluaron y compararon entre sí. La actividad antimicrobiana fue evaluada contra *Escherichia coli*, bacteria aislada comúnmente en los canales radiculares de dientes primarios. La estadística descriptiva y la estadística analítica (prueba U de Mann-Whitney) se realizaron para valorar los resultados.

Resultados: todos los materiales mostraron actividad antimicrobiana pasadas 24 horas. La comparación intergrupar reveló diferencias significativas. Endoflas® mostró zonas de inhibición significativamente más altas.

Conclusiones: Endoflas® tiene actividad antimicrobiana superior, seguido de hidróxido de calcio y Vitapex®.

PALABRAS CLAVE: Materiales de obturación radicular. Actividad antimicrobiana. Hidróxido de calcio. Vitapex®. Endoflas FS®.

INTRODUCTION

The conservation of primary teeth continues to be an important challenge in pediatric dentistry (1). The importance of maintaining primary teeth until the time they are naturally shed is because they preserve the space in the arch, esthetics and mastication. They also guide the eruption of the permanent teeth, and abnormal swallowing and phonation habits are avoided, among others (2).

A correct diagnosis should always be the first step and it should guide us towards the right treatment, especially with regard to the

diseases that involve the dentin-pulp complex as pulp can shift from a reversible to an irreversible state. If still within the physiological margins, the repair capacity of the dentin-pulp complex together with the correct treatment will permit solving the attack and the tooth will be preserved in the mouth (2).

However, this ability to repair the pulp is limited and in those cases in which the disease becomes irreversible, more complex treatment of a primary tooth will be necessary such as pulpectomy (2).

Most pulp disease is caused by microbial infection, and caries is the most common medium through which bacteria

will reach the pulp. There are others through which bacterial infiltration will arise, such as through the dentinal tubules, and through marginal seal defects of restorations or through trauma, which has a high incidence among the child population (3).

The studies concur with regard to the polymicrobial nature of these endodontic infections, and the anaerobic, obligate and facultative species are the most prevalent (4,5).

Pulpectomies are indicated for treating cases in which there is an irreversible pulp condition or necrosis in order to maintain the tooth in the mouth. They are contraindicated in cases in which a tooth, even with symptoms, cannot be restored, because it has internal root resorption, insufficient bone and root support, or if there is a radicular cyst. Moreover, the root should have two thirds of its normal length (6,7).

This is carried out by eliminating radicular pulp tissue, the instrumentation of the root canals either with manual or rotary instruments, the obturation of the root canals with a resorbable material, and finally the restoration of the tooth.

Despite this being a treatment that is regularly performed in primary teeth, it has to be taken into account that primary teeth have anatomic characteristics that can be more complex, as the root canals are narrower and more tortuous, the pulp chambers are bigger and the pulp horns higher.

All this, together with the change that the roots undergo during the physiological root resorption process, means that totally clean and disinfected canals are difficult to achieve with instrumentation and irrigation alone.

It is for this reason that in order to ensure an efficient disinfection of the root canals, the material that we use should be chosen correctly, as this will help to ensure the success of the treatment (1).

The requirements that good obturation material should meet are:

- It should be antiseptic.
- Easy root obturation.
- It should be resorbed at a speed similar to that of the primary tooth root.
- It should be innocuous for the periapical tissues and the tooth germ of the permanent successor.
- It should be resorbed easily if compressed beyond the apex.
- It should adhere to the root walls adequately and not contract.
- It should be easily eliminated if necessary.
- It should be radiopaque.
- It should not discolor the tooth.

Numerous materials have been proposed over the years for filling the root canals of primary teeth after pulpectomies. Among these we will regularly find zinc-eugenol oxide and calcium hydroxide, or materials based on iodoform. Despite the beneficial properties there are various disadvantages such as the toxic effects of eugenol in the case of zinc oxide-eugenol, faster resorption in relation to the roots in the case of calcium hydroxide and iodoform and, in the case of the latter, a degree of irritation of periapical tissues if extended beyond the apex (8).

With the aim of compensating the disadvantages of using a single material, and in an effort to find new materials with fewer inconveniences, new materials appeared based on a combination of the latter. Among these we will find:

- *Vitapex*[®]: obturation material for root canals of the primary dentition that is made up of calcium hydroxide (30.3 %), iodoform (40.4 %) and silicone oil (22.4 %) and that, together with other materials of a similar composition such as *Metapex*[®], has in some studies obtained over time high clinical success rates (9,10). Among its characteristics are an easy delivery system, radiopacity, antibacterial and bacteriostatic properties, and that it has no harmful effects on the permanent tooth germs. It can be removed easily if necessary. The disadvantage is that it is a material that can be resorbed somewhat faster than the roots of deciduous teeth (11).
- *Endoflas*[®]: this is a material that has arisen from the combination of three individual materials, zinc oxide-eugenol, calcium hydroxide and iodoform. It is composed of a mixture of powder that contains triiodomethane and iodine dibutylorthocresol (40.6 %), zinc oxide (56.5 %), calcium hydroxide (1.07 %) and barium sulfate (1.63 %), with a liquid consisting of eugenol and paramonochlorophenol (8). It has hydrophilic characteristics and a broad spectrum of antimicrobial efficacy, which facilitates the disinfection of hard-to-reach accessory canals that are not very accessible, and it is used in those cases in which mechanical cleansing cannot be performed due to anatomical limitations. The components are biocompatible and resorbable, and generally similar to the root of the primary tooth (8).

Despite all the advances with regard to this type of root canal obturation material, there is currently no material that meets all the criteria necessary for being the ideal obturation material. The mechanical, functional and antibacterial properties continue to be the object of investigation in order to increase knowledge on these materials, and therefore, the success of pulpectomies in the primary dentition.

OBJECTIVES

The main objective was to study the antimicrobial efficiency of the three root canal obturation materials ($\text{Ca}(\text{OH})_2$, *Vitapex*[®] and *Endoflas*[®]) used in the primary dentition.

MATERIAL AND METHODS

As has been previously mentioned, and considering that pulp necrosis is a product of polymicrobial infection, the *Escherichia coli* (CECT 101) strain was chosen as a reference for antimicrobial control, taking into account that the literature also refers to a greater prevalence of anaerobic microorganisms, both strictly and facultative bacteria (4).

Other materials that were necessary were:

- Vertical air flow cabinet.
- Petri dishes with a solid medium (9 cm).
- Digiralsky sowing spatula.
- Micropipette 100 uL.
- Disposable pipette tips.
- Metal forceps to transport dishes.
- Glass bead sterilizer.
- Paraffin paper.
- Ruler.
- Sterile filter paper discs for antimicrobial susceptibility tests.
- Incubation chamber (37°) centigrade.

The procedure was carried out in the experimental section of Agroforestal at the research support center of the University of Murcia.

Before the experimental study the material was chosen and divided into groups (Table I).

Therefore, the premixed materials were obtained either in the form of a commercial syringe of 2 g as in the case of Vitapex®, or they were mixed by the standard liquid powder reaction in the case of Ca(OH)₂ using distilled water as a vehicle in the case of Endoflas®, which we found commercially available in the form of both powder and liquid.

In addition, with regard to Endoflas®, as this is a material that produces cheletation on mixing the powder with eugenol liquid to form zinc eugenolate, we decided to measure the antimicrobial action in both dense as well as fluid consistencies, in order to ascertain how this material continues to behave when time passes after the reaction.

The *in vitro* procedure was carried out by means of Agar diffusion, working inside the Biosecurity cabinet in order to avoid the contamination of the samples by the environment.

For this, first the bacteria seeding was done with the Petri dishes and using nutrient Agar as a culture medium. This is a solid, non-selective and non-differential medium used generally for isolating microorganisms that are undemanding with regard to nutritional requirements.

For each of the three materials to be evaluated, four dishes were inoculated with the help of micropipettes, with 100 microliters of the microorganism suspension. This was extended all over the dish using the sowing spatula. In addition, two more dishes were inoculated in order to have a control group.

Paper discs impregnated with the different materials were placed on the Agar surface that had previously been inoculated with the suspension of microorganisms. This was performed using sterile forceps, and putting three discs in every dish with a distance of no less than 15 mm between them, and 1.5 cm from the border of the dish.

As soon as the dish impregnated with the material comes into contact with the humid surface of the Agar, the filter absorbs the water and allows the material to spread to the medium. Once the discs had been placed into the dishes, these were sealed with paraffin paper and transported to an incubation chamber for 24 hours at 37 °C, under the necessary conditions for bacterial growth.

After 24 hours of incubation the discs could be seen to be surrounded by an area of inhibition (inhibition zone) in which there was no bacterial growth due to the action of the material. After this the diameter of each of the zones was measured with a correctly calibrated ruler, and four values expressed in mm were obtained for each of the discs in each dish, from which a mean value was then obtained.

A descriptive statistical analysis of the variables included in the study was performed. The analytical study was carried out using contingency tables in order to see the relationship

TABLE I.
OBTURATION MATERIALS USED FOR THE STUDY

Group 1	Calcium hydroxide (Ca(OH) ₂ + Distilled water	Calcium hydroxide	Proportion of powder-liquid 1:1
Group 2	Vitapex®	Calcium hydroxide, iodoform, silicone oil	Commercially available in the form of a paste
Group 3	Endoflas FS® dense consistency	Powder: calcium hydroxide, iodoform, barium sulphate, zinc oxide. Liquid: eugenol	The powder and the eugenol are mixed to obtain the consistency of a homogenous paste, and hardened for 10 minutes before placed
Group 4	Endoflas FS® fluid consistency	Powder: calcium hydroxide, iodoform, barium sulphate, zinc oxide. Liquid: eugenol	The powder and the eugenol were mixed into a homogenous paste
Group 5	Control group	-	-

between the variables. The association between the qualitative variables was assessed using the Mann Whitney quantitative variables test in order to then determine the significant difference. A significance value of $p < 0.05$ was found. The statistical analysis was performed using the SPSS statistical 19.0 program.

RESULTS

The case controls did not show an inhibition of bacterial growth while all the cases with materials led to areas of inhibition around the discs of the culture dishes. According to the Mann Whitney test, the obturation materials used in this study were not the same with regard to antimicrobial capacity against *Escherichia coli* (Fig. 1).

There were no significant differences between the calcium hydroxide materials and the Vitapex® seal. The $\text{Ca}(\text{OH})_2$ sealer with distilled water showed a mean of 7.93 mm and Vitapex® 7.73 mm, with a significance of 0.525.

Moreover, there were significant differences between the Endoflas® and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ groups with regard to their antimicrobial activity against *E. coli*, as in both the dense and fluid form, with measurements of 11.14 and 10.73 mm respectively, Endoflas® had higher values than those observed for $\text{Ca}(\text{OH})_2$, with a mean of 7.93 mm and a significance of $p < 0.05$.

Similarly, there were also significant differences between the Endoflas® and Vitapex® groups. The measurements obtained for Endoflas® were 11.14 and 10.73 mm for both the dense and fluid consistency respectively and 7.73 for Vitapex®, with a significance of 0.002 when the latter was compared with the dense consistency of Endoflas® and of 0.001 when compared to the fluid consistency.

With regard to the Endoflas® material, the analysis of the results also shows that there were no significant differences with regard to antimicrobial efficiency when using either the dense or fluid consistencies, as the level of significance was 0.058 (Table II).

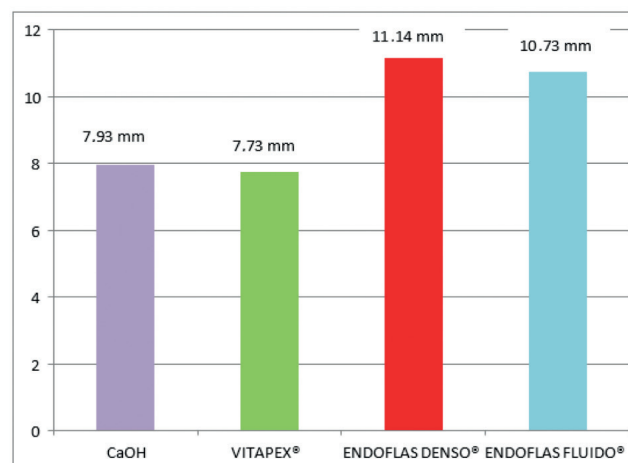


Fig. 1. Mean of inhibition (mm) of the materials used in the *E. coli* study.

DISCUSSION

The main objective of pulpectomies in pediatric dentistry is to maintain the primary teeth in the mouth until the eruption, under normal conditions, of the permanent successors. It is because of this and in view of the peculiarities of primary teeth, the complex nature of root canals and their curvatures, together with the changes that they undergo during the physiological resorption process, that the materials used for completing the disinfection process have properties such as biocompatibility and antimicrobial activity.

Calcium hydroxide $\text{Ca}(\text{OH})_2$ as an endodontic obturation material against *Escherichia coli* appeared to very efficient. Ramar and Mungara (9) observed that the main biological effect of this material comes from dissociating the calcium hydroxide ions, that have an action on tissues and bacteria that would explain the biological and antibacterial action. In addition, there are other beneficial effects such as the formation of dentin bridges.

TABLE II.
DESCRIPTIVE STATISTICS OF THE SIZE OF THE INHIBITION ZONE (mm)
OF THE MATERIALS USED IN THIS STUDY

Mean	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	Vitapex®	Dense Endoflas®	Fluid Endoflas®
Media	7.93	7.73.	11.14	10.73
Mode	7.5	7.75	11	10.5
Standard deviation	8.75	8	11	10.5
Minimum	1.09	0.65	0.44	0.74
Maximum	6.25	6.25	10.5	10
Máximo	10	8.5	12	13

The mean size of the zone of inhibition for calcium hydroxide in this study was 7.93 mm which is a small value if compared with the results of other studies carried out previously by Kriplani et al. (12) in which there were mean inhibition values of 10 mm. In the study by Amorim et al. (13) the mean inhibition value was 11 mm on evaluating antimicrobial efficiency against *Enterococcus faecalis*, which is a bacteria that shares the characteristics of being a facultative anaerobe, as is *Escherichia coli*, and that together with the former are two of the strains that serve as a reference in this type of antimicrobial sensitivity testing.

Moreover, in studies such as the one by Reddy and Ramakrishna (14), the antimicrobial capacity of calcium hydroxide is demonstrated against 23 isolated bacterial species in the root canals of primary teeth. The result was a mean zone of inhibition of 7mm, a value that is very similar to the one in the present study.

In addition, other authors such as Blanscet et al. (15) wanted to ascertain if by varying the percentage of calcium hydroxide there would be a different antimicrobial effect, concluding that with greater concentration there were greater zones of inhibition than when using smaller concentrations, an aspect that may be of importance in the case of these materials that we can mix with different vehicles, such as distilled water in this case.

The antibacterial properties of Vitapex[®], a sealer with a calcium hydroxide and iodoform base, have also been evaluated in various studies. Haryny Priya et al. (16), found in their study inhibition values for Vitapex[®] of 14.75 mm through the elaboration of wells on the Agar surface into which the materials were directly placed. This was a much higher value than that found in the present study which was 7.73 mm.

Various studies support the clinical success of Vitapex[®] and materials with a similar composition such as Metapex[®]. Success rates of between 90 and 100 % were found in some studies (8,11). There are also various studies in which these materials do not show good results in the Agar diffusion test, such as in the work by Navit et al. (17) and Kriplani et al. (12), in which the mean inhibition figures were of 1.8 and 3.3 mm, much smaller values than those found in this study. There are even studies in which no zones of inhibition are found for this material at all, as in the studies by Amorim et al. in 2006 (13) and Hegde et al. in 2012 (18).

This lack of activity in some of the tests could be due, according to authors such as Blanscet et al. (15), to the calcium ions being covered with silicone oil. This is in the formulation composition, and it reduces the ionic dissociation of the calcium ions. Therefore, in these non-aqueous formulations, the conductivity of the material is lower, as this is proportional to the ionic dissociation.

There are multiple studies in the literature confirming the adequate antimicrobial effect of the sealer Endoflas[®]. Hegde et al. (18) and Arora et al. (19), found in their studies inhibition values of 12.5 and even 23.2 mm, figures that were much higher in comparison with the other materials.

In most of the studies in which Endoflas[®] was used, the material tends to always obtain better results with regard to antimicrobial efficiency than the rest of the materials (18-20). However, our study also shows that Endoflas[®] has greater antimicrobial efficiency when used in the dense rather than the fluid form, as the mean inhibition values were 11.14 and 10.73 mm respectively.

This antimicrobial activity is probably due to the combination of materials such as iodoform and eugenol, both with antibacterial activity. Eugenol acts by protein degeneration, while iodoform is an oxidizing agent (20).

Moreover, and as was ascertained in this study, even after the material hardens on leaving it to set for some time before placement, and after the chelation reaction that takes place on mixing the powder with liquid eugenol, the hydrolysis on the surface of the chelate continues to lead to the release of eugenol. This would explain the antimicrobial activity of this material after some time and after leaving it to set.

Nevertheless, the high antimicrobial activity of Endoflas[®] also suggests that following this there may not only be a toxic reaction against the bacteria, but there may also be repercussions on the rest of the biological tissues of the tooth, which in the long run would not be beneficial for the primary teeth.

All the proper procedures should be followed in order to reduce to the maximum the bacteria present in the root canals of primary teeth. This involves using irrigating solutions and proper instruments, as well as obturation materials that have antimicrobial activity against the pathogens that frequently affect this dentition.

CONCLUSIONS

- All the root canal obturation materials used in this study showed antimicrobial activity against the microorganism tested (*Escherichia coli*).
- We found that Endoflas[®] had the greatest antimicrobial activity compared with the other materials ($p < 0.05$), on using it in both a dense and fluid form, followed by calcium hydroxide $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and Vitapex[®].
- More studies are need with a greater number of strains and in study conditions that are as close as possible to the habitual ones. In addition, not only should antimicrobial effects be assessed, but also the toxicity potential of these materials on periapical tissues.