

**FAPAC - FACULDADE PRESIDENTE ANTÔNIO CARLOS
INSTITUTO TOCANTINENSE PRESIDENTE ANTÔNIO CARLOS PORTO S/A
CURSO DE ODONTOLOGIA**

**ALÍCIA COSTA SANTOS
ANNA CLARA RODRIGUES BARBOSA
VICTÓRIA ARRUDA GOMES**

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DE DIFERENTES MEDICAÇÕES
INTRACANAIS EM UM BIOFILME DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS*:
UM ESTUDO COMPARATIVO *IN VITRO***

**ALÍCIA COSTA SANTOS
ANNA CLARA RODRIGUES BARBOSA
VICTÓRIA ARRUDA GOMES**

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DE DIFERENTES MEDICAÇÕES
INTRACANAIS EM UM BIOFILME DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS*:
UM ESTUDO COMPARATIVO *IN VITRO***

Artigo científico submetido ao Curso de Odontologia da FAPAC- Faculdade Presidente Antônio Carlos ITPAC Porto Nacional, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Professor Dr.º Eduardo Fernandes Marques

Co-orientadora: Professora Dr.ª Carina Scolari Gosch

**PORTO NACIONAL-TO
2021**

**ALÍCIA COSTA SANTOS
ANNA CLARA RODRIGUES BARBOSA
VICTÓRIA ARRUDA GOMES**

Avaliação da eficácia antimicrobiana de diferentes medicações intracanáis em um biofilme de *Enterococcus faecalis*: Um estudo comparativo *in vitro*

Artigo científico apresentado e defendido em ____/____/____ e aprovado perante a banca examinadora constituída pelos professores:

Professor: (Inserir o nome do orientador)
Instituto Presidente Antônio Carlos

Professor: (Inserir o nome do Examinador 01)
Instituto Presidente Antônio Carlos

Professor: (Inserir o nome do Examinador 02)
Instituto Presidente Antônio Carlos

**PORTO NACIONAL-TO
2021**

Avaliação da eficácia antimicrobiana de diferentes medicações intracanaís em um biofilme de *Enterococcus faecalis*: Um estudo comparativo *in vitro*

Alicia Costa Santos¹
Anna Clara Rodrigues Barbosa¹
Victória Arruda Gomes¹
Carina Scolari Gosch²
Eduardo Fernandes Marques²

¹ Acadêmica do Curso de Odontologia – Instituto Tocantinense Presidente Antônio Carlos

² Informações do (a) orientador (a)–Instituto Tocantinense Presidente Antônio Carlos (Orientador)

RESUMO

Introdução: A eliminação dos microrganismos em sua totalidade, durante a terapia endodôntica, embora desejada, é difícil de ser alcançada. Mesmo após o enchimento do canal, os microrganismos são capazes de estar na massa dentinária e na região periapical. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a eficácia antibacteriana de diferentes medicações intracanaís em um biofilme de *Enterococcus faecalis*. **Metodologia:** Foram utilizados microrganismos de referência, *Enterococcus faecalis* NEWP 0012, onde a suspensão bacteriana foi semeada uniformemente em ágar Mueller Hinton (MH). As placas estiveram incubadas por condições aeróbicas, em uma temperatura constante no faixa de 35° 37°C, por 24 horas. As medicações intracanaís testados foram: G1- Hidróxido de cálcio associado a Clorexidina 2%, G2- Hidróxido de cálcio associado a estrato de ozônio, G3- Hidróxido de cálcio associado a paramonoclorofenol (Calen com Pmcc), G4- Hidróxido de cálcio associado a um corticoide G5- Hidróxido de Cálcio G6- Clorexidina 2% G7- Ozônio G8- paramonoclorofenol G9- Corticoide G10- Salina G11- Hidróxido de Cálcio associado a iodofórmio G12- iodofórmio G13 Hidróxido de Cálcio associado a NDP G14- NDP. Após a manipulação do material, eles foram impregnados em discos de papel absorvente de 5 mm de diâmetro e distribuído equidistantes nas placas semeadas com microrganismo. Os dados experimentais foram obtidos por a medição do halo de inibição no período de 24h, 72h e 7 dias; assim, o microrganismo foi classificado como resistentes ou sensíveis aos diferentes produtos. **Resultados:** Após análise, no primeiro experimento realizado foi revelado que, dentro do tempo de 24, 72 horas e 7 dias apenas os grupos G1 (Hidróxido de cálcio associado a Clorexidina 2%, G5 (Hidróxido de Cálcio), G6 (Clorexidina 2%) e G9 (Otosporin), apresentaram halo de inibição. Os grupos não apresentaram halo de inibição, sendo ineficazes contra o *E. faecalis*. De acordo com os dados obtidos a clorexidina gel 2% apresentou maiores halos de inibição, devendo ser a medicação de primeira escolha. Por tanto deve haver a utilização de novas pesquisas com diferentes métodos para a verificação das medicações utilizadas, já que apresentou divergência frente a outras pesquisas já realizadas, dessa forma pode se comprovar com clareza a eficácia dessas medicações.

Palavras-chave: Antimicrobiano. Endodontia. Hidróxido de cálcio. Microrganismos.

ABSTRACT: Introduction: The elimination of microorganisms in their entirety during endodontic therapy, although desired, is difficult to achieve. Even after filling the canal, microorganisms are able to be in the dentin mass and periapical region. **Objective:** The aim of this study was to evaluate in vitro the antibacterial efficacy of different intrachannel medications in a enterococcus *faecalis* biofilm. **Methodology:** Reference microorganisms, Enterococcus *faecalis* NEWP 0012, were used, where bacterial suspension was sown uniformly in Mueller Hinton (MH) agar. The plates were incubated by aerobic conditions, at a constant temperature in the range of 35° 37°C, for 24 hours. The intrachannel medications tested were: G1- Calcium hydroxide associated with Chlorhexidine 2%, G2- Calcium hydroxide associated with ozone stratum, G3- Calcium hydroxide associated with paramonochlorophenol (Calen with Pmcc), G4- Calcium hydroxide associated with a corticosteroid G5- Hid Calcium Rthoxide G6- Chlorhexidine 2% G7- Ozone G8- Paramonochlorophenol G9- Corticoid G10- Saline G11- Calcium Hydroxide associated with iodoform G12- iodoform G13 Calcium hydroxide associated with NDP G14- NDP. After material manipulation, they were impregnated in absorbent paper discs of 5 mm in diameter and distributed equidistant in plates sanded with microorganism. The experimental data were obtained by measuring the inhibition halo in the period of 24h, 72h and 7 days; thus, the microorganism was classified as resistant or sensitive to the different products. **Results:** After analysis, in the first experiment, it was revealed that, within the time of 24, 72 hours and 7 days only groups G1 (Calciumhydroxide associated with Chlorhexidine 2%, G5 (Calcium Hydroxide), G6(Chlorhexidine 2%) and G9(Otosporin), presented inhibition halo. The groups did not present inhibition halo, being ineffective against *E. faecalis*. According to the data obtained chlorhexidine gel 2% presented higher inhibition halos, and should be the medication of choice. Therefore, there should be the use of new research with different methods for the verification of the medications used, since it presented divergence in the face of other studies already carried out, thus it can be clearly proven the efficacy of these medications.

Keywords: Antimicrobial. Endodontics. Calcium hydroxide. Microorganisms.

INTRODUÇÃO

O tratamento endodôntico tem por objetivo o preparo químico-mecânico do sistema de canais radiculares, dessa forma proporcionando a remoção do tecido pulpar inflamado ou necrosado, eliminação da maior parte dos microrganismos e posteriormente a obturação tridimensional (Raof et al., 2019). No entanto, alguns patógenos são resistentes ao processo de desinfecção como *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus*, *Candida* e *Enterococcus faecalis* (Zancan et al., 2016).

O *Enterococcus faecalis*, é um patógeno gram-positivo anaeróbio facultativo que possui a capacidade de adaptação e tolerância às condições ambientais adversas, resistentes a fagocitose, anticorpos e agentes antimicrobianos desta forma, dificultando a erradicação e relacionando-se à 22-77% dos casos de infecção

persistente (Agrima *et al.*, 2017; Komiyama *et al.*, 2016). Assim, é importante o estudo de substâncias coadjuvantes na terapia endodôntica que auxiliem na erradicação de microrganismos resistentes, como as medicações intracanaís, principalmente, em áreas anatômicas complexas dos sistemas de canais radiculares, como deltas apicais e regiões de istmo (Valverde *et al.*, 2017).

Até o momento, o medicamento intracanal ideal não foi encontrado. Como resultado, muitos tipos diferentes de medicamentos têm sido usados como curativos de canal radicular como hidróxido de cálcio associado a Clorexidina 2%, hidróxido de cálcio associado a extrato de ozônio, hidróxido de Cálcio associado a iodofórmio hidróxido de cálcio associado a paramonoclorofenol, hidróxido de cálcio associado ao otosporin, clorexidina 2% e NDP. No entanto, apesar de estudos conflitantes, nenhum medicamento aparece superior a qualquer outro, e sua utilidade tem sido questionado (Zancan *et al.*, 2018).

Diante disso, esse trabalho teve como objetivo a análise de diferentes medicações intracanaís e associações com hidróxido de cálcio, a fim de potencializá-las contra microrganismos, sendo o *enterococcus faecalis* de maior resistência, contribuindo assim para maiores taxas de sucesso nos tratamentos endodônticos.

METODOLOGIA

Obtenção dos microrganismos

Utilizou-se uma cepa comercial de *Enterococcus faecalis* (NEWProv-0012), revitalizada em caldo BHI, incubado a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ em estufa bacteriológica até turvação visível (18 h). Após inoculou-se os microrganismos em placa de meio nutritivo não seletivo (ágar Nutriente, KASVI) pela técnica de esgotamento e foram novamente incubados à $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Para a realização dos testes, a concentração microbiana foi ajustada para a concentração de 5×10^5 UFC/mL de caldo BHI, controlados por leitura da turbidez em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm e posterior contagem de colônias em placa através da realização de diluições seriadas em solução salina a 0,95%.

Teste de sensibilidade a drogas

Para determinar a ação antibacteriana em placas, preparou-se o ágar Mueller Hinton (MH, KASVI), previamente fundido, esterilizado e resfriado a 45-50 °C, em seguida, distribuído em placas de Petri de 150 mm de diâmetro até atingir uma

espessura de aproximadamente 4 mm. Após obtenção de consistência sólida do ágar MH, utilizou-se swabs estéreis para a coleta de microrganismos na suspensão bacteriana ($\approx 5 \times 10^5$ UFC/mL) e realizou-se a técnica de semeadura de superfície nos três sentidos em cada placa, atentando-se para uma distribuição uniforme, evitando-se o crescimento de colônias isoladas.

Em seguida, foram confeccionados discos de papel absorvente com 6 mm de diâmetro, seguido de esterilização. Estes foram impregnados com as diferentes medicações intracanáis:

- G1- Hidróxido de cálcio associado a Clorexidina 2%;
- G2- Hidróxido de cálcio associado a extrato de ozônio;
- G3- Hidróxido de cálcio associado a paramonoclorofenol (Calen com Pmcc);
- G4- Hidróxido de cálcio associado ao otosporin;
- G5- Hidróxido de Cálcio;
- G6- Clorexidina 2%;
- G7- Ozônio;
- G8- paramonoclorofenol;
- G9- Otosporin;
- G10- Soro fisiológico;
- G11- Hidróxido de Cálcio associado a iodofórmio;
- G12- iodofórmio;
- G13 Hidróxido de Cálcio associado a NDP;
- G14- NDP.

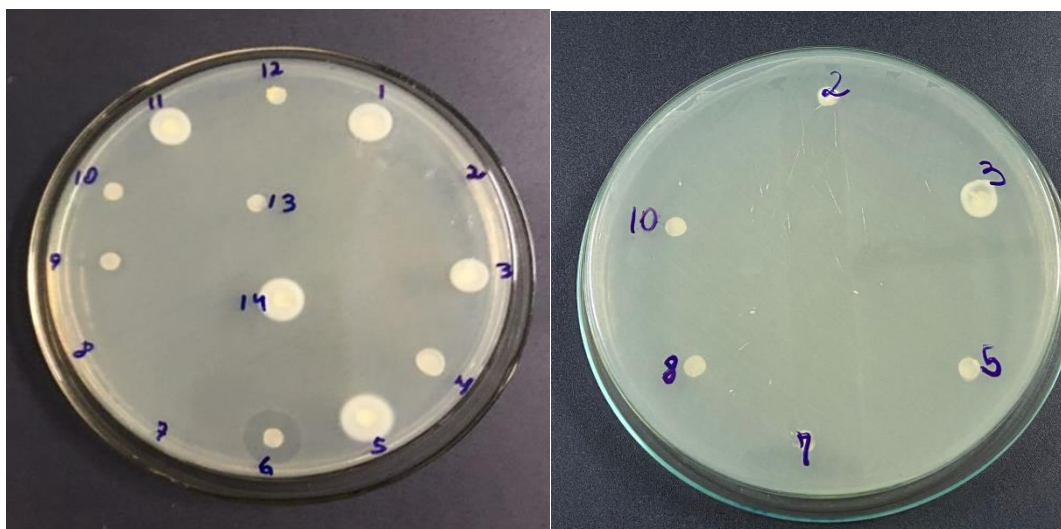
Os discos de papel impregnados com as diferentes medicações foram distribuídos espaçadamente sobre a superfície da placa microbiana e o experimento foi inoculado em estufa bacteriológica a $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Os halos de inibição foram mensurados com auxílio de paquímetro após 24h, 72h e 7 dias de incubação, sendo os resultados expressos em milímetros.

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas. Para determinar a ação antimicrobiana dos medicamentos intracanáis, considerou-se como resultado final a média aritmética dos halos de inibição obtidos de triplicatas de três experimentos realizados de forma consecutiva.

3 RESULTADOS

No presente trabalho foi realizado um estudo *in vitro* para analisar a eficácia de diferentes grupos de medicação intracanal, através de três experimentos observou-se a baixa eficácia de algumas medicações na inibição do crescimento da bactéria *Enterococcus faecalis*. Após análise, no primeiro experimento realizado foi revelado que, dentro do tempo de 24, 72 horas e 7 dias apenas os grupos G1 (Hidróxido de cálcio associado a Clorexidina 2%), G5 (Hidróxido de Cálcio), G6 (Clorexidina 2%) e G9 (Otosporin), apresentaram halo de inibição. Os grupos G2- Hidróxido de cálcio associado a estrato de ozônio, G3- Hidróxido de cálcio associado a paramonoclorofenol (Calen com Pmcc), G4- Hidróxido de cálcio associado a um corticoide, G7- Ozônio, G8- paramonoclorofenol, G11- Hidróxido de Cálcio associado a iodofórmio, G12- iodofórmio, G13 Hidróxido de Cálcio associado a NDP e G14- NDP não apresentaram halo de inibição, sendo ineficazes contra o *E. faecalis*. A figura 1 mostra o meio de cultura e os halos formados.

Figura 1 - Halos de inibição referente as medicações testadas

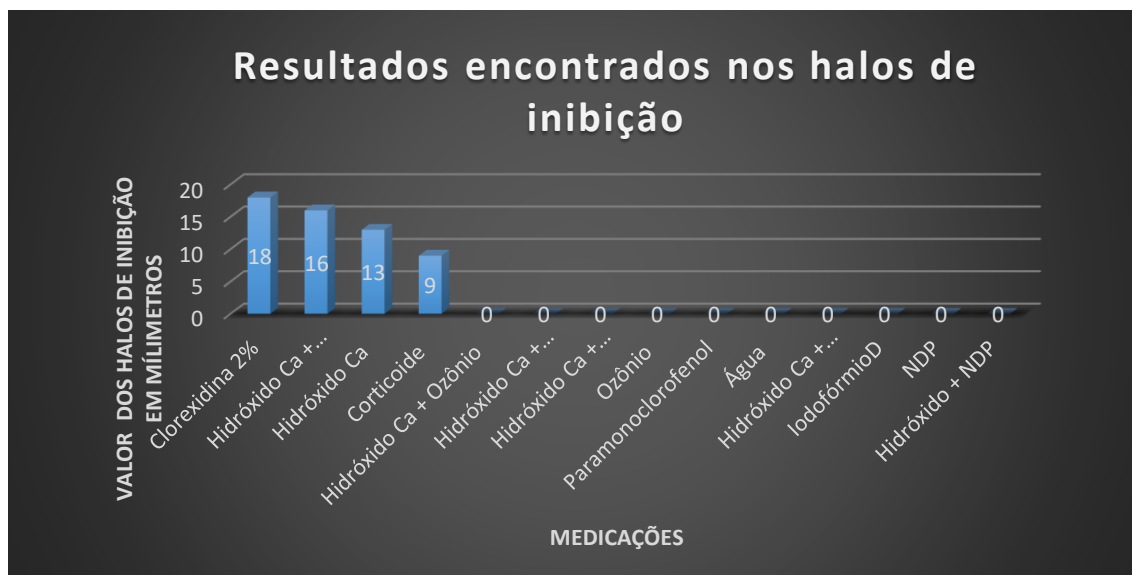


Fonte: Autoria própria

Visto que as demais medicações testadas não tiveram atividade antimicrobiana, foi realizado dois novos testes de difusão em disco. Observou-se então que no experimento 1, 2 e 3 os resultados se repetem, formando halo somente em: clorexidina, hidróxido, clorexidina associado ao hidróxido e corticoide. Dentre os

resultados obtidos a clorexidina sem associação foi a medicação que apresentou maior eficácia contra o *enterococcus faecallis*.

Gráfico 1 -Medidas dos halos de inibição formados (em milímetros) pelas medicações testadas



Fonte: Autoria Própria

Com a análise de um antibiograma de resistência antimicrobiana, foram classificados como resistentes, intermediário e sensível, tendo seus resultados dispostos no quadro.

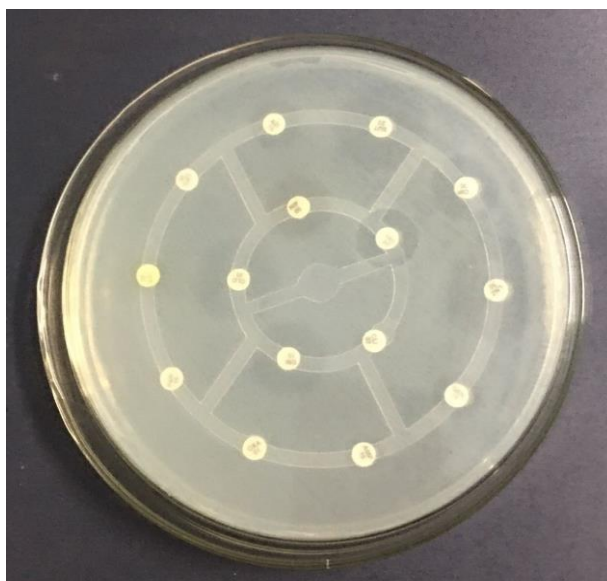
Quadro 1 – Resultados Antibiograma

Antibiograma		
Antibióticos	Resultado	-----
Oxacilina	—	Resistente
Ampicilina	8mm	Resistente
Gentacilina	9mm	Resistente
Linezolida	23mm	Sensível
Ciprofloxacina	17mm	Intermediário
Sufazotrim	21mm	Sensível
Azitromicina	14mm	Intermediário

Cefoxitina	—	Resistente
Tetraciclina	8mm	Resistente
Penicilina	—	Resistente
Eritromicina	19mm	Intermediário
Cloranfenicol	20mm	Sensível
Rifampicina	17mm	Intermediário
Vancomicina	18mm	Sensível
Clidamicina	—	Resistente

Fonte: Aatoria Própria

Figura 2 – Halos de inibição referente ao antibiograma



Fonte: Aatoria Própria

4 DISCUSSÃO

De acordo com Almeida et al. (2015) o insucesso endodôntico pode se dar pela presença de microrganismos resistentes ou provenientes da cavidade oral. Tendo em vista isso, é indispensável o uso de agentes irrigantes e medicações intracanaís para aumentar o sucesso no tratamento.

A escolha da medicação é essencial durante a realização do tratamento, pois a mesma visa impedir a sobrevivência de microrganismos que possam ter ficado mesmo após o preparo químico mecânico, tendo em vista que algumas medicações não são tão eficientes para alguns microrganismos com o *enterococcus faecalis*, a presente pesquisa visa ressaltar quais medicações de melhor escolha.

Os resultados que foram encontrados indicam que algumas medicações que são bastante usuais no ambiente clínico, não são capazes de inibir esse microrganismo, que é uma espécie frequentemente apontada como uma das maiores causadoras de reincidência de retratamento. Dentre as medicações testadas, as que obtiveram um halo de inibição maior contra o *E. faecalis* se destacam, a, Clorexidina, hidróxido de Cálcio, Clorexidina + hidróxido de Cálcio e corticoide, onde a clorexidina é a que possui maior inibição.

Os halos de inibição foram medidos após 24 horas, os quais verificaram que não havia diferença entre os tempos de avaliação de 24, 48 e 72 horas, e não possuíam nenhuma diferença nos três testes realizados.

O hidróxido de cálcio que é frequentemente utilizado como medicação intracanal, mostrou se ineficaz ao *E. faecalis*, tendo em vista que a clorexidina apresentou uma melhor inibição contra o mesmo, tornando se a medicação de melhor escolha para o tratamento endodôntico.

De acordo com Siqueira Jr, *et al.* (2012), estudos clínicos demonstraram que o hidróxido de cálcio não possui eficácia em relação ao *Enterococcus faecalis*, através do presente trabalho comprovou a baixa eficácia do mesmo. Em contrapartida, relatou que o hidróxido de cálcio associado ao PMCC possui boa atividade antibacteriana e antifúngica, não apresentando sua eficácia na atual pesquisa. Outrossim, em ambos a clorexidina, isolada ou associada, apresentou bons resultados, sendo uma boa opção de medicação intracanal.

Segundo Siqueira Jr, *et al.* (2012), estudos clínicos demonstram que, em média, 20 a 30% dos canais ainda apresentam microrganismos viáveis após medicação com hidróxido de cálcio em um veículo inerte. Além dos efeitos da dentina, de matéria orgânica e de fluidos teciduais que podem tamponar o pH do hidróxido de cálcio e assim reduzir sua eficácia, alguns microrganismos, como *Enterococcus*

faecalis, comumente associados ao fracasso endodôntico, são resistentes ao efeito antimicrobiano pH-dependente do hidróxido de cálcio. Para compensar as deficiências do hidróxido de cálcio em veículo inerte, tem sido preconizada a sua associação com outros agentes antimicrobianos.

Os resultados obtidos no antibiograma indicaram que o *enterococcus faecalis* apresentou resistência em grande parte dos antibióticos, como: oxacilina, ampicilina, gentamicina, cefoxitina, tetraciclina, penicilina e clindamicina, sendo sensível apenas a linezolida, sufazotrim, cloranfenicol e vancomicina; E intermediário aos ciprofloxacina, azitromicina, eritromicina e rifampicina. Dessa forma, pode se obter com maior precisão a indicação do uso de medicações contra essa cepa.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os dados obtidos a clorexidina gel 2% apresentou maiores halos de inibição, devendo ser a medicação de primeira escolha. Por tanto deve haver a utilização de novas pesquisas com diferentes métodos para a verificação das medicações utilizadas, já que apresentou divergência frente a outras pesquisas já realizadas, dessa forma pode se comprovar com clareza a eficácia dessas medicações.

REFERÊNCIAS

Agrima Vasudeva, Dakshita Joy Sinha, Shashi Prabha Tyagi, Narendra Nath Singh, Paridhi Garg, Deepti Upadhyay. Disinfection of dentinal tubules with 2% Chlorhexidine gel, Calciumhydroxideandherbal intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*: An in-vitrostudy Singapore Dental Journal Vol. 38 , dez 2017, pag 39-44.

Almeida, Josiane *et al.* *Tratamento do biofilme intracanal de Enterococcus faecalis com suspensões de diferentes nanopartículas e irrigantes convencionais.* Rev. Odonto. vol.51 no.1 Belo Horizonte Jan./Mar. 2015

Komiyama EY, Lepesqueur LS, Yassuda CG, *et al.* Enterococcus species in the oral cavity: prevalence, virulence factors and antimicrobial susceptibility. PLoS One 2016;11:e016300.

Raof M, Khaleghi M, Siasar N, Mohannadalizadeh S, Haghani J, Amanpour S. Antimicrobial activity of methanolic extracts of *Myrtus communis* L. and *Eucalyptus galbie* and their combination with calcium hydroxide powder Against *Enterococcus faecalis*. J Dent (Shiraz) 2019; 20:195-202.

Siqueira Jr, José Freitas *et al.* Princípios biológicos do tratamento endodôntico de dentes com polpa necrosada e lesão perirradicular. *Rev. Bras. Odontol.* vol.69 no.1 Rio de Janeiro Jan./jun. 2012

Valverde ME, Baca P, Ceballos L, Fuentes MV, Ruiz-Linares M, Ferrer-Luque CM. Antibacterial efficacy of several intracanal medicaments for endodontic therapy. *Dent Mater J.* 2017;**36**(3):319–324. doi: 10.4012/dmj.2016-102.

Zancan RF, Vivian RR, Milanda Lopes MR, Weckwerth PH, de Andrade FB, Ponce JB, et al. Antimicrobial activity and physicochemical properties of calcium hydroxide pastes used as intracanal medication. *J Endod.* 2016; 42:1822–8.

Zancan RF, Calefi PHS, Borges MMB, Lopes MRM, Andrade FB, Vivian RR, Duarte MAH Antimicrobial activity of intracanal medications against both *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* biofilm *Microsc Res Tech.* 2018;1–7.