

Efeito antimicrobiano in vitro de diferentes medicações endodônticas e própolis sobre *Enterococcus faecalis*

In vitro antimicrobial effect of different endodontic materials and propolis on Enterococcus faecalis

Etevaldo Matos MAIA FILHO¹

Cláudia de Castro Rizzi MAIA²

Ana Cláudia Sampaio Costa BASTOS²

Tânia Maria Gaspar NOVAIS²

RESUMO

Objetivos: Comparar a eficácia de três irrigantes utilizados no tratamento de canais radiculares e do extrato de própolis frente à *Enterococcus faecalis*.

Métodos: Foram utilizadas em teste de difusão em Agar as seguintes substâncias: extrato de própolis produzido pelas abelhas *Scaptotrigona* sp., hipoclorito de sódio 5%, hidróxido de cálcio e gel de clorexidina 2%. O diâmetro da zona de inibição bacteriana foi medido depois de 24 horas e os dados foram analisados estatisticamente através do teste Kruskal Wallis. A amostra de extrato de própolis também foi submetida ao teste de diluição para determinar a concentração inibitória mínima.

Resultados: Os valores, em milímetros, das médias dos halos de inibição produzidos por difusão das amostras testadas foram: 21,3 (gel de clorexidina); 16,2 (hidróxido de cálcio); 10,9 (extrato de própolis); 7,2 (hipoclorito de sódio). Houve diferença estatística significativa entre todas as substâncias testadas ($p < 0,001$). O extrato de própolis apresentou a concentração inibitória mínima de 1mg/mL.

Conclusão: O extrato de própolis apresentou uma boa atividade antimicrobiana, sendo maior que hipoclorito de sódio a 5%, entretanto, o gel de clorexidina foi o mais efetivo contra *E. faecalis*.

Termos de indexação: própole; *Enterococcus faecalis*; irrigantes do canal radicular; endodontia.

ABSTRACT

Objetivos: To compare the efficacy of three irrigants used in root canal treatment and of propolis extract against *Enterococcus faecalis*.

Methods: The Agar diffusion test was used on the following substances: extract of propolis produced by *Scaptotrigona* sp., bees; 5% sodium hypochlorite, calcium hydroxide and 2% chlorhexidine gel. The diameter of the bacterial zone of inhibition was measured after 24 hours and the data were statistically analyzed by the Kruskal Wallis test. The propolis extract sample was also submitted to the dilution test to determine the minimum inhibitory concentration.

Results: The values, in millimeters, of the inhibition haloes produced by diffusion of the tested samples were as follows: 21.3 (chlorhexidine gel); 16.2 (calcium hydroxide); 10.9 (propolis extract); 7.2 (sodium hypochlorite). There was statistically significant difference among all the substances tested. ($p < 0.001$). Propolis extract presented a minimum inhibitory concentration of 1mg/mL.

Conclusion: Propolis extract presented good antimicrobial activity, being more active than 5% sodium hypochlorite, however, the chlorhexidine was the most effective agent

Indexing terms: propolis; *Enterococcus faecalis*; root canal irrigants; endodontics.

INTRODUÇÃO

Os microrganismos presentes em infecções primárias são geralmente sensíveis ao tratamento endodôntico de rotina e o prognóstico para esse tipo de tratamento é bom. Pelo contrário, os casos de retratamento têm prognóstico

menos favorável, devido à composição da microbiota¹. O *Enterococcus faecalis* raramente é encontrado nos casos de infecções primárias¹ mas em casos de retratamento é a espécie predominante^{2,3}, chegando a representar de 38% a 70% da microbiota nesses casos¹⁻⁵.

As soluções irrigadoras são utilizadas no tratamento endodôntico com a finalidade de eliminar bactérias dos canais

¹ Centro Universitário do Maranhão, Coordenação da Iniciação Científica, Departamento de Endodontia. Rua Josué Montello, 1, Renascença, 67075-120, São Luis, MA, Brasil. Correspondência para / Correspondence to: EM MAIA FILHO (rizzimaia@yahoo.com.br).

² Centro Universitário do Maranhão. São Luis, MA, Brasil.

radiculares. Estas soluções devem apresentar uma potente ação antimicrobiana frente à microbiota predominante nas infecções endodônticas. Entre elas, o hipoclorito de sódio tem seu uso consagrado, pois apresenta boa atividade antimicrobiana quando em concentrações acima de 2,5%, mas essas concentrações são elevadas e incompatíveis com o tecido pulpar e periapical, o que prejudicaria o processo de reparo apical⁶.

Tendo em vista que o preparo biomecânico e as soluções irrigadoras não são suficientes para combater todos os microrganismos presentes no canal radicular infectado, a medicação intracanal tem sido utilizada como um recurso auxiliar no tratamento endodôntico. Entre as substâncias mais utilizadas, o hidróxido de cálcio tem sido a preferência⁶, apesar de alguns pesquisadores questionarem a eficácia dessa medicação na redução do número de alguns tipos de bactérias^{2,7,8}. Como alternativa, a solução de clorexidina também tem sido utilizada no tratamento endodôntico devido à sua capacidade de eliminar microrganismos envolvidos na patogênese pulpar e periapical^{6, 9-13}.

A medicação adequada deve ter excelente propriedade antimicrobiana e também deveria ser atóxica ou apresentar baixa toxicidade sobre as células do ligamento periodontal. Al-Shaher et al.¹⁴ compararam a viabilidade das células do ligamento periodontal e da polpa dental após contato com hidróxido de cálcio e com própolis e observaram uma maior viabilidade celular após tratamento com própolis^{14,15}. Além disso, tem-se sugerido o uso de própolis como meio de transporte para dentes avulsionados devido a sua excelente capacidade de manter a viabilidade de células do ligamento periodontal^{15,16}.

A própolis também tem sido muito estudada por apresentar atividade analgésica, antiinflamatória¹⁶ e antimicrobiana, inclusive sobre alguns periodontopatógenos¹². Por outro lado, existem poucos dados sobre a sensibilidade do *Enterococcus faecalis* frente à própolis. Sendo assim, neste estudo foi avaliado a atividade antimicrobiana da própolis produzido pelas abelhas *Scaptotrigona sp.*, e outras soluções utilizadas no tratamento endodôntico frente a *Enterococcus faecalis*.

MÉTODOS

Foi utilizada uma amostra padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 10541). O microrganismo foi cultivado em caldo BHI (Difco, São Paulo, Brasil) e em Blood Agar Base

(Difco, São Paulo, Brasil) adicionado de 5% de sangue de carneiro. A incubação foi realizada a 37°C por 24 horas.

Foram testadas as seguintes substâncias: I - Hidróxido de Cálcio (Calen[®], Rio de Janeiro, Brasil); II - Gel Clorexidina 2%; III - Hipoclorito de sódio 5%; IV - Extrato de própolis. As amostras de própolis foram coletadas diretamente de colméias de *Scaptotrigona sp.*, no município de Barra do Corda, no Estado do Maranhão. Foram preparados extratos hidroalcoólicos (7:3) das amostras de própolis e acondicionados em frascos da cor âmbar, com a concentração final de 1 grama da própolis diluído em 100mL de álcool 70%. Os extratos foram preparados no Laboratório de Farmacognosia, do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

A sensibilidade do microrganismo foi avaliada qualitativamente através de um teste de difusão em agar e, posteriormente, foi realizado um teste quantitativo de diluição em agar. Para o teste de difusão, foi preparada uma suspensão bacteriana em solução salina fisiológica e a turbidez foi ajustada para o tubo no 0,5 da escala de McFarland. Discos de papel de filtro estéreis (5mm de diâmetro) impregnados com cada solução foram depositados em placas de Agar Mueller-Hinton (Biobrás, Belo Horizonte, Brasil) inoculadas com a suspensão bacteriana padronizada. As substâncias foram avaliadas cinco vezes e a mensuração foi realizada após incubação a 37°C por 24 horas.

Os dados foram tabulados e analisados estatisticamente utilizando-se o programa *SPSS for Windows 10.0* através do teste não paramétrico Kruskal Wallis, com nível de significância de 5%.

Também foi determinada a concentração inibitória mínima da amostra de própolis com atividade antimicrobiana através de diluições do extrato de própolis em Agar Mueller-Hinton. Foram realizadas as seguintes diluições: 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 e 1:160. Como controle positivo foi realizado a diluição do álcool 70% nas mesmas proporções. Após inoculação do meio de cultura, a concentração inibitória mínima foi determinada a partir da menor diluição capaz de inibir o crescimento bacteriano.

RESULTADOS

Resultados obtidos no teste da difusão em agar

Na Tabela 1 estão representadas as médias das medidas dos halos de inibição produzidos pelas amostras testadas.

A Tabela 2 mostra os resultados do teste de Kruskal Wallis. Houve diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos testados ($p < 0,001$).

Tabela 1. Valores, em milímetros, das médias dos halos de inibição produzidos por difusão das amostras testadas.

Grupo	Média
Ca(OH) ₂	16,2
CHX	21,3
NaOCl 5%	7,2
PPL	10,9

Tabela 2. Resultado do teste de Kruskal Wallis para as amostras testadas.

Grupos	Mean Rank
Ca(OH) ₂	13,00
CHX	18,00
NaOCl 5%	3,00
PPL	8,00

*Teste de Kruskal Wallis ($p < 0,001$)

Resultados obtidos no teste da diluição em placas

A amostra de própolis foi submetida ao teste de diluição para verificar a concentração inibitória mínima. Os resultados encontrados estão representados na Tabela 3.

A amostra de própolis da *Scaptotrigona* sp apresentou uma inibição do crescimento bacteriano na diluição 1:10. Sabendo-se que a concentração inicial dessa amostra foi de 1g/100mL, a concentração inibitória mínima foi de 1mg/mL.

Tabela 3. Resultado do teste de diluição para a amostra de própolis. O sinal + representa o crescimento bacteriano, o sinal – representa falta de crescimento.

Grupos	Diluições				
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160
Extrato de própolis	-	+	+	+	+
Álcool	+	+	+	+	+

DISCUSSÃO

A completa limpeza e desinfecção do sistema de canais radiculares são consideradas essenciais para o sucesso do tratamento endodôntico. Restos de tecido pulpar, bactérias e debris de dentina podem persistir nas irregularidades do sistema de canais radiculares, até mesmo depois da utilização de medicação intracanal. A partir disso, várias soluções irrigadoras são indicadas para o preparo biomecânico, porém a eficácia dessas soluções depende da vulnerabilidade das espécies microbianas envolvidas na infecção do canal radicular. Bactérias facultativas, como *Enterococcus faecalis* têm sido isoladas de dentes em que houve fracasso da terapia endodôntica. Além disso, *Enterococcus faecalis* isolados de dentes com infecção endodôntica foram capazes de levar a formação do biofilme *in vitro*, os quais já foram observados em dentes com necrose pulpar e lesão periapical¹⁷ e em dentes com lesão refratária ao tratamento endodôntico¹⁸.

Vários métodos são utilizados para avaliar a atividade antimicrobiana de medicações intracanaís. O método *in vitro* tem a vantagem da facilidade de execução e na rapidez nos resultados e está livre de alguns fatores que influenciam os resultados, inerentes aos estudos *in vivo*. Neste estudo foi utilizado o teste de difusão em ágar, pois é um método comumente utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana de soluções irrigadoras empregadas na Endodontia^{9, 19-22}.

Os halos de inibição foram medidos após 24 horas. Tempo semelhante foi utilizado por Sawaya et al.²³ e Mickel et al.²⁴ os quais verificaram que não havia diferença entre os tempos de avaliação de 24 e 48 horas.

O hidróxido de cálcio é rotineiramente utilizado como medicação intracanal, entretanto, vários trabalhos têm mostrado que a *Enterococcus faecalis* é resistente ao hidróxido de cálcio²⁵⁻²⁷. Diante da controvérsia existente a respeito da eficácia do Ca(OH)₂ contra *Enterococcus faecalis* resolvemos incluí-lo neste estudo.

Foi observado que o Ca(OH)₂ apresentou atividade contra *Enterococcus faecalis* o que nos faz crer que provavelmente a ineficácia dessa medicação frente a esse microrganismo em outros estudos, seja devido às condições locais, como por exemplo, presença de *smear layer* ou outro fator que impeça o contato desta substância com o microrganismo ou mesmo que ele seja inibido por algum outro fator, como proposto por Haapasalo et al.²⁸.

A clorexidina mostrou-se mais efetiva na eliminação de *Enterococcus faecalis* que o hidróxido de cálcio, o que corrobora com outros trabalhos da literatura^{13,29-31}; superior também ao hipoclorito de sódio a 5%, confirmando trabalhos prévios^{6,9,19}.

A própolis apresentou uma boa atividade antimicrobiana, concordando com os estudos Gebara et al.¹² quando avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana da própolis contra bactérias periodontais e comprovaram que a própolis foi capaz de inibir o crescimento bacteriano.

Uma futura utilização da própolis como medicação endodôntica somaria seus conhecidos efeitos analgésico e antiinflamatório¹⁶ baixa citotoxicidade^{14,15} e sua atividade bacteriana, porém, há necessidade de outros estudos para confirmar sua eficácia clínica e um futuro emprego no tratamento de canais radiculares.

REFERÊNCIAS

1. Sjogren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. J Endod. 1990; 16(10): 498-504.
2. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. Int Endod J. 1998; 31(1): 1-7.
3. Peciulienė V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. J Endod. 2000; 26(10): 593-5.
4. Peciulienė V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. Int Endod J. 2001; 34(6): 429-34.
5. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. Oral Microbiol Immunol. 2003; 18(2): 100-3.
6. Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LA, Nelson Filho P, Bonifácio KC, Ito IY. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. J Endod. 1999; 25(3): 167-71.
7. Lana MA, Ribeiro-Sobrinho AP, Stehling R, Garcia GD, Silva BK, Hamdan JS, et al. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. Oral Microbiol Immunol. 2001; 16(2): 100-5.
8. Peters LB, Wesselink PR, van Winkelhoff AJ. Combinations of bacterial species in endodontic infections. Int Endod J. 2002; 35(8): 698-702.
9. Siqueira JF Jr, Uzeda M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. J Endod. 1997; 23(3): 167-9.
10. Kuruvilla JR, Kamath MP. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. J Endod. 1998; 24(7): 472-6.
11. Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. Int Endod J. 2001; 34(6): 424-8.
12. Gebara ECE, Lima LA, Mayer MPA. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. Braz J Microbiol. 2002; 33(4): 365-9.
13. Schafer E, Bossmann K. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and two calcium hydroxide formulations against *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2005; 31(1): 53-6.
14. Al-Shaher A, Wallace J, Agarwal S, Bretz W, Baugh D. Effect of propolis on human fibroblasts from the pulp and periodontal ligament. J Endod. 2004; 30(5): 359-61.
15. Ozan F, Polat ZA, Er K, Ozan U, Deger O. Effect of propolis on survival of periodontal ligament cells: new storage media for avulsed teeth. J Endod. 2007; 33(5): 570-3.
16. Paulino N, Teixeira C, Martins R, Scremin A, Dirsch VM, Vollmar AM, et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of a Brazilian green propolis. Planta Med. 2006; 72(10): 899-906.

CONCLUSÃO

Diante da metodologia empregada pôde-se concluir que a clorexidina foi mais efetiva contra *E. faecalis*. As substâncias apresentaram sua efetividade na seguinte ordem decrescente: Clorexidina > Hidróxido de cálcio > Extrato de própolis > Hipoclorito de sódio 5%. O extrato de própolis da *Scaptotrigona* sp. apresentou uma concentração inibitória mínima de 1mg/mL.

Colaboradores

E.M. MAIA FILHO participou na orientação do trabalho. C.C.R. MAIA participou na execução da pesquisa. A.C.S.C. BASTOS participou na realização dos testes de difusão em agar. T.M.G. NOVAIS participou na realização dos testes de diluição.

17. Molven O, Olsen I, Kerekes K. Scanning electron microscopy of bacteria in the apical part of root canals in permanent teeth with periapical lesions. *Endod Dent Traumatol*. 1991; 7(5): 226-9.
18. Tronstad L, Barnett F, Cervone F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. *Endod Dent Traumatol*. 1990; 6(2): 73-7.
19. Ayhan H, Sultan N, Cirak M, Ruhi MZ, Bodur H. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. *Int Endod J*. 1999; 32(2): 99-102.
20. Lin YH, Mickel AK, Chogle S. Effectiveness of selected materials against *Enterococcus faecalis*: part 3. The antibacterial effect of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2003; 29(9): 565-6.
21. Basrani B, Tjaderhane L, Santos JM, Pascon E, Grad H, Lawrence HP et al. Efficacy of chlorhexidine- and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003; 96(5): 618-24.
22. Davis JM, Maki J, Bahcall JK. An in vitro comparison of the antimicrobial effects of various endodontic medicaments on *enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2007; 33(5): 567-9.
23. Sawaya AC, Palma AM, Caetano FM, Marcucci MC, Cunha IBS, Araujo CE, et al. Comparative study of in vitro methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida*. *Lett Appl Microbiol*. 2002; 35(3): 203-7.
24. Mickel AK, Nguyen TH, Chogle S. Antimicrobial activity of endodontic sealers on *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2003; 29(4): 257-8.
25. Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol*. 1990; 6(4): 142-9.
26. Heling I, Sommer M, Steinberg D, Friedman M, Sela MN. Microbiological evaluation of the efficacy of chlorhexidine in a sustained-release device for dentine sterilization. *Int Endod J*. 1992; 25(1): 15-9.
27. Siqueira JF Jr, Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod*. 1996; 22(12): 674-6.
28. Haapasalo HK, Siren EK, Waltimo TM, Orstavik D, Haapasalo MP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int Endod J*. 2000; 33(2): 126-31.
29. Ercan E, Dalli M, Dulgergil CT. In vitro assessment of the effectiveness of chlorhexidine gel and calcium hydroxide paste with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006; 102(2): 27-31.
30. Ercan E, Ozekinci T, Atakul F, Gul K. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: in vivo study. *J Endod*. 2004; 30(2): 84-7.
31. White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod*. 1997; 23(4): 229-31.

Recebido em: 29/5/2007
Aprovado em: 21/9/2007