

# AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DO *ENTEROCOCCUS FAECALIS* A SUBSTÂNCIAS AUXILIARES NA TERAPIA DO SISTEMA DE CANAIS

## ESTUDO *IN VITRO*

In vitro evaluation of susceptibility of the *Enterococcus faecalis* to endodontic irrigants

Laudimar A. Oliveira\*  
Nilce Santos de Melo\*\*  
Orlando Ayrton de Toledo\*\*\*

### RESUMO

A capacidade antimicrobiana representa uma propriedade essencial das substâncias auxiliares na limpeza do sistema de canais radiculares. O presente trabalho avaliou as propriedades antimicrobianas do hipoclorito de sódio, 1% e 5%, da clorexidina 2%, aquosa e gel, e da solução aquosa de hidróxido de cálcio e lauril sulfato de sódio 20% - HCT<sub>20</sub>. Adotou-se como metodologia a suscetibilidade do *E. faecalis* em ágar BHI por meio de halo de inibição nos períodos de 24 e 48h; e meio de *thioglicolato*. A clorexidina 2% apresentou superioridade, estatisticamente significativa, às demais substâncias, quanto à inibição do *E. faecalis*. Considerando a importância desse grupo microbiano nas patologias periapicais, esses resultados sugerem a clorexidina 2% como substância mais efetiva na ação antimicrobiana no tratamento do sistema de canais.

### UNITERMOS

Hipoclorito de sódio; Clorexidina; HCT<sub>20</sub>; Irrigantes endodônticos; *E. faecalis*

### INTRODUÇÃO

A presença de microrganismos no sistema de canais representa um fator determinante em insucessos na terapia endodôntica.

Embora diversas propriedades sejam consideradas essenciais à efetividade desses agentes, a ação anti-séptica adicionada à dissolução de substâncias figura como mais relevante.

Com isso, torna-se imperativo o uso de fármacos que atinjam a intimidade dos canalículos dentinários promovendo a morte e/ou inativação de microrganismos e suas toxinas.

A ação desejável - bactericida e/ou bacteriostática - não deve ocorrer somente durante o tratamento; deve persistir por um período que impeça a re-contaminação dos canais até o momento da obturação.

Outra característica igualmente relevante consiste na eficiência estar presente nos tecidos periapicais permitindo uma neutralização microbiana também nessa região.

É, portanto, objetivo deste trabalho avaliar "*in vitro*" a sensibilidade do *Enterococcus faecalis* a substâncias irrigadoras por meio de halos de inibição em ágar nos períodos de 24 e 48h e pelo contato direto em meio líquido em vários períodos.

### REVISÃO DE LITERATURA

A inibição microbiana representa um dos principais objetivos na terapia do sistema de canais. A limpeza dos canais radiculares requer a remoção mecânica, restos teciduais e microrganismos, acompanhada da ação físico-química de substâncias auxiliares FERRAZ et al<sup>4</sup> (2001).

O gênero *Enterococcus* freqüente nas re-infecções endodônticas apresenta-se como importante indicador biológico no controle químico de microrganismos. Essa propriedade atribui-se a sua grande resistência aos agentes químicos, utilizados na terapia endodôntica; bem como à facilidade desse grupo em alojar-se na intimidade da malha dentinária LOVE<sup>6</sup> (2001).

A disseminação desse gênero pode promover sérios riscos a seus pacientes, tendo sua presença reconhecida em diversos casos de endocardites, hepatites, gastroenterites e encefalites MAKI & AGGER<sup>7</sup> (1988).

Considerada mais relevante no tratamento endodôntico, a ação anti-séptica vem sendo testada, com destaque para o grupo dos halogênios. O hipoclorito de sódio nas concentrações entre 0,5 e 5% apresenta-se quimicamente como sal instável cuja ação antimicrobiana reside na

\*Mestre e Doutor em Ciências da saúde, Prof. Adjunto Microbiologia - FOA

\*\*Mestre e Doutora em Patologia, Prof. Adjunta Patologia - UnB

\*\*\*Doutor em Odontopediatria, Prof. Titular Odontopediatria - UnB

liberação de altas concentrações de Cl<sup>-</sup> livre ESTRELA et al<sup>2</sup> (2002).

O hidróxido de cálcio, usado nas formas pura ou associada, no contato com microrganismos é bactericida, pois em meio aquoso libera altas concentrações de OH<sup>-</sup> e Ca<sup>++</sup> livres, tornando o pH extremamente alcalino, ao redor de 12 SIQUEIRA JÚNIOR & LOPES<sup>10</sup> (2000).

A associação de solução aquosa saturada de Ca(OH)<sub>2</sub> com detergente aniônico - lauril-éter-dietileno sulfato de sódio 0,125 na concentração de 20%, para limpeza do sistema de canais foi proposta por BARBOSA et al<sup>1</sup> (1994) com objetivo de otimizar seus efeitos antimicrobianos.

Outra substância em evidência é a clorexidina, considerada potente bactericida em altas concentrações. A clorexidina age por meio de ação eletrostática entre seus cátions e a carga negativa das células bacterianas. Em altas concentrações, promove coagulação e precipitação protéicas, atuando como bacteriostático em concentrações menores SOUZA FILHO<sup>11</sup> (2002)

Pode ser efetiva em soluções alcoólica e aquosa. Para o sistema de canais foi idealizada na concentração de 2% apresentando resultados clínicos satisfatórios. A associação com gel de natrosol, composto carbônico, *hydroxethyl cellulose*, apresenta uma ação mais efetiva. FERRAZ et al<sup>4</sup> (2001).

## MATERIAL E MÉTODOS

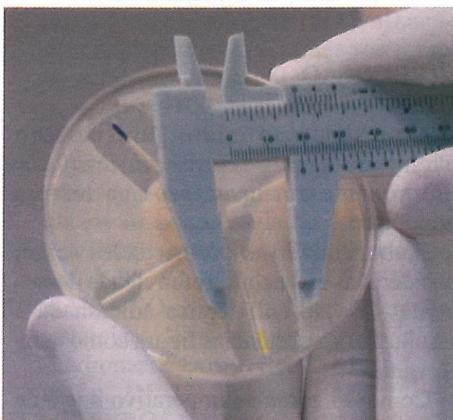
Foram utilizadas amostras de *Enterococcus faecalis* liofilizadas (American Type Culture Collection ATCC® 19433, lote 93-05sv). Para suscetibilidade microbiana, adotou-se o método de **Kirby-Bauer**, utilizando-se cones de papel impregnados pelas substâncias - Figura 1. Foi confeccionado meio de cultura ágar BHI (Biobrás - Montes Claros - MG - Brasil), distribuído em 30 placas de *Petri*, 15ml por placa. Em seguida, foram inseridos 1ml de caldo de *Thioglicolato* (DIFCO - Maryland - USA) contendo *E. faecalis*, correspondendo ao tubo de ensaio número 10 da escala de *McFarland*. MENEZES E SILVA<sup>8</sup> (1999).

Como controle utilizaram-se 5 placas com 4 cones de papel estéreis (TANARI - Manacapuru - AM - Brasil), dos quais dois foram embebidos com solução salina 0,9% (Halex Istar - Goiânia - GO) e dois com hipoclorito de sódio 5% (Miyaco - Guarulhos - SP). Vinte e cinco placas foram submetidas à aplicação de 4 cones de papel estéreis (TANARI - Manacapuru - AM - Brasil), embebidos por dez minutos com as

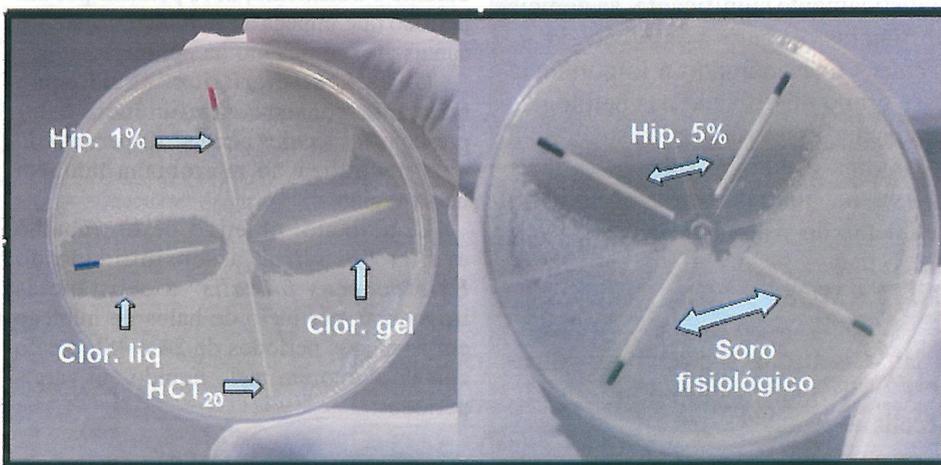
substâncias-teste: a - solução aquosa de clorexidina 2% (FGM - Joinville - SC - Brasil); b - gel de clorexidina e natrosol 2% (FARMACOTÉCNICA - Brasília - DF - Brasil); c - hipoclorito de sódio 1% (MIYACO - Guarulhos - SP); d - solução aquosa saturada de hidróxido de cálcio associada a 20% lauril-dietileno-éster-sulfato de sódio HCT<sub>20</sub> (LABORATÓRIO BIOMATERIAIS - UnB - Brasília - DF).

As placas foram estocadas em estufa a 37°C por 24h. Transcorrido o período de 24h foram registrados os halos formados ao redor do cone de papel, no sentido perpendicular ao seu comprimento.

Então, as placas foram colocadas em estufa por 48h. Em seguida, procedeu-se ao segundo registro, usando-se a metodologia anterior. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística - *Mann-Whitney-test*.



**Figura 1** - Imagem evidenciando método de medição dos halos de inibição do crescimento microbiano promovido pelas substâncias auxiliares na limpeza do sistema de canais



**Figura 2** - Formação de halos ao redor dos cones de papel embebidos com substâncias auxiliares na limpeza do sistema de canais, período 24h. Cultura de *E. faecalis* em meio BHI

Para verificar a suscetibilidade do *E. faecalis* em meio líquido utilizou-se inicialmente dez tubos de ensaio contendo 10ml de meio de *thioglicolato* contaminados com cepas de *E. faecalis*, correspondendo ao tubo número 10 da escala de *McFarland*. Em seguida inoculou-se 1,0ml de meio de cultura de *E. faecalis* em tubos de ensaio contendo 9ml de cada substância-teste. O período de contato com as substâncias ficou arbitrado em intervalos de 10 minutos, estendendo-se por até duas horas. Foram utilizadas cinco amostras para cada período/substância. Transcorrido o tempo, coletou-se 1,0ml da mistura para inoculação em 9ml de meio de *thioglicolato*. Os tubos foram armazenados em estufa a 37°C, por 48h.

Os resultados foram considerados negativos para ação antimicrobiana pela turvação do meio. Foram consideradas efetivas as amostras que apresentaram, no espectrofotômetro (FEMTO 600 - TECNAL - LABORATÓRIOS - Itaboraí - São Paulo - SP), absorvância inferior à obtida com o tubo de ensaio correspondente ao número 1 da escala de *McFarland*.

Os resultados foram expressos por meio de curva de morte e submetidos à análise estatística - *Mann-Whitney-test*.

## RESULTADOS

Os resultados encontram-se descritos na figura 2 e no gráfico 1 e tabela 1

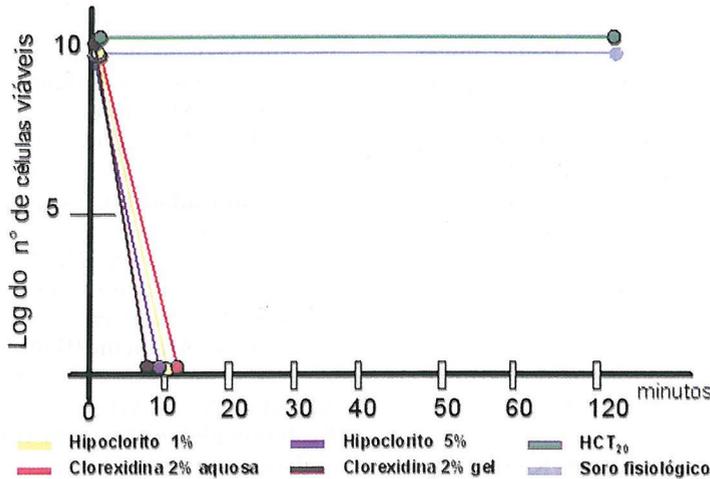


Gráfico 1 - Curva de morte *E. faecalis*, amostras submetidas às substâncias auxiliares do sistema de canais - razão 1:10

Tabela 1 - Halo de sensibilidade do *E. faecalis* às substâncias auxiliares em culturas de 24 e 48h - meio ágar BHI.

Substâncias	Halo formação <i>E. Faecalis</i> (média ± desvio-padrão)	
	24h	48h
Clorexidina 2% gel	18,94 ± 1,27mm*	19,73 ± 1,86 mm*
Clorexidina 2% líq.	18,49 ± 2,13mm*	18,85 ± 2,77 mm*
Hipoclorito 1%	1,96 ± 1,27 mm	2,04 ± 2,73 mm
HCT <sub>20</sub>	2,02 ± 1,50 mm	0,22 ± 1,04 mm
Soro fisiológico	0 mm	0 mm
Hipoclorito 5%	19,16 ± 3,03 mm*	20,35 ± 1,90 mm*

\*Amostras que apresentaram diferença estatisticamente significante comparativamente ao soro fisiológico - Mann-Whitney test - p = 0,005.

## DISCUSSÃO

A suscetibilidade microbiana a agentes irrigadores durante o tratamento endodôntico constitui-se em fator importante na sua seleção.

O método de Kirby-Bauer é considerado muito eficiente pela rapidez e reprodutibilidade. A adoção de cones de papel embebidos permitiu uma análise similar aos discos de papel com antibióticos. (FERNANDES<sup>3</sup>, 2000).

A escolha do *E. faecalis* recaiu sobre dois aspectos: a-tratar-se de microrganismo hemolítico encontrado em infecções endodônticas, diretamente

relacionado com endocardite bacteriana e; b - por apresentar alta resistência a agentes químicos, sendo frequentemente usado como padrão no controle antimicrobiano.

A adoção do hipoclorito de sódio 5% como controle positivo ratificou seu efeito antimicrobiano. Apresentando halos expressivos seu resultado assemelhou-se aos encontrados na literatura. Em meio líquido impediu o crescimento em apenas 10 min. As amostras com soro fisiológico - controle negativo - apresentaram um crescimento satisfatório sem inibição, demonstrando que as condições de crescimento foram ideais - Figura 2.

A clorexidina evidenciou sua

capacidade antimicrobiana tanto nas formas aquosa quanto gel. FERRAZ et al<sup>4</sup> (2001), ao compararem a ação antimicrobiana da clorexidina, formas gel e líquida, ao hipoclorito de sódio 5%, na desinfecção de canais radiculares, evidenciaram a semelhança na capacidade demonstrada.

Em outra análise LEONARDO et al<sup>5</sup> (1999), demonstraram que a atividade antimicrobiana da clorexidina a 2%, *in vivo* apresentou-se com efeito residual superior a 48 horas.

No presente trabalho, o HCT<sub>20</sub>, em meio líquido, não apresentou ação antimicrobiana, nem no período de 2h. Observou-se que, além da baixa difusão em ágar, essa associação interfere no pH do hidróxido de cálcio, reduzindo para 10,8, sendo que algumas cepas de *E. faecalis* podem encontrar-se viáveis em níveis de até 11.

A associação de hidróxido de cálcio com detergente em meio aquoso para diminuição de sua tensão superficial representou uma melhora em algumas propriedades mecânicas. O trabalho de BARBOSA et al<sup>1</sup> (1994), aponta para ação antimicrobiana do HCT<sub>20</sub> quando em contato direto com microrganismos.

SEABRA et al<sup>9</sup> (2000), avaliando a redução de placa bacteriana, verificaram redução de 26,70% pelo HCT<sub>20</sub> e de 31,17% pela clorexidina 0,12%. Porém, semelhante ao trabalho de BARBOSA et al<sup>1</sup> (1994), não foi utilizado controle negativo no trabalho.

A necessidade de contato direto do hidróxido de cálcio puro parece estar presente no HCT<sub>20</sub>. Essa substância demonstrou um acentuado decréscimo em sua ação antimicrobiana, na transição dos períodos de 24 para 48h.

O hipoclorito de sódio 1%, embora tenha mantido seu halo de inibição, tanto no período de 24h quanto no de 48h, apresentou valores não-significativos em comparação ao controle negativo. Entretanto, sua ação em meio aquoso mostrou-se satisfatória. Considerada substância mais utilizada no sistema de canais, o hipoclorito de sódio possui diversas restrições, em decorrência da irritabilidade aos tecidos humanos.

WALTIMO et al<sup>12</sup> (1999), adotando metodologia semelhante ao compararem os efeitos antimicrobianos do acetato de clorexidina, solução aquosa saturada de hidróxido de cálcio e hipoclorito de sódio, 5% e 0,5%, e suas combinações, verificaram que a *Cândida albicans* mostrou-se altamente resistente ao hidróxido de cálcio. As demais substâncias foram capazes de inibir as cepas de *C.*

*albicans*.

Convém enfatizar que o gênero *E. faecalis* consiste num grupo de grande importância, como demonstrado, nas patologias pulpo-periapicais, com destaque às infecções persistentes e re-infecções, sendo sua resistência a fármacos considerada como padrão, na indicação de substâncias com finalidade antimicrobiana. Portanto, torna-se essencial a adoção de uma substância que seja eficaz na inibição desse grupo de microrganismos LOVE<sup>6</sup> (2001).

## CONCLUSÃO

A – o hipoclorito de sódio 5% e a clorexidina 2%, solução aquosa e gel, mostraram-se eficientes na inibição do *E. faecalis*, em ágar BHI e líquido de *thioglicolato*;

B – o HCT<sub>20</sub> foi a única substância que não apresentou capacidade de inibição significativa do *E. faecalis*, em todas as amostras em meio ágar BHI e líquido de *thioglicolato*;

## SUMMARY

An important aspect of a root canals irrigants is its antimicrobial ability. This work evaluated the susceptibility of *E. faecalis* to 2% chlorhexidine, aqueous and gel, 1% and 5% sodium hypochlorite and calcium hydroxide solution associated with detergent (HCT<sub>20</sub>). The first chosen method was the measurement of the halos of inhibition in Petri dishes with BHIa after 24 and 48h. The second chosen method was the analysis of the solution of aliquots of 1ml fluid thioglicollate medium with *E. faecalis* (bacteria inoculum) and 9ml of test substance. The test times were 10 min to 2

hours. The results showed that 2% chlorhexidine was as effective as 5% sodium hypochlorite. The 1% sodium hypochlorite and HCT<sub>20</sub> showed lower inhibition ability and there was no statistically significant difference between them and the saline solution (negative control). HCT<sub>20</sub> was unique solution that allowed the grown of microorganisms in all periods when the direct contact was tested.

## UNITERMS

Sodium hypochlorite; Chlorhexidine; Calcium hydroxide; Irrigants; *E. faecalis*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARBOSA, S.V.; SPANGBERG, L. W.; ALMEIDA, D. Low surface tension calcium hydroxide solutions is an effective antiseptic. *Int Endod J*, v. 27, n. 1, p 6-10, Jan. 1994.
2. ESTRELA, C.; ESTRELA, C. R.; BARBIN, E. L.; SPANÓ, J. C. MARCHESAN, M. A.; PÉCOR, J. D. Mechanism of action sodium hypochlorite. *Braz Dent J*, v. 13, n. 2, p. 113-17, Feb. 2002.
3. FERNANDES, A. T. **Infecção hospitalar e suas interfaces na área de saúde**. São Paulo: Atheneu, vol. 1 e 2, 2000.
4. FERAZ, C. C. R.; GOMES, B. P. F. A.; ZAIA, A. A.; TEIXEIRA, F. B.; SOUZA-FILHO, F. J. *In vitro* assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod*, v. 27, n. 7, p. 452-5, July. 2001.
5. LEONARDO, M. R.; TANOMARU

- FILHO, M.; SILVA, L. A. B.; NELSON FILHO, P.; BONIFÁCIO, K. C.; ITO, I. Y. *In vitro* antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *J Endod*, v. 25, n. 3, p. 167-71, Mar. 1999.
6. LOVE, R.M. *Enterococcus faecalis* - a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J*, v. 34, n. 5, p. 399-405, July. 2001.
7. MAKI, D. G.; AGGER, W. A. Enterococcal bacteremia: clinical features, the risk of endocarditis, and management. *Medicine (Baltimore)*, v. 67, n. 4, p. 248-69, July. 1988.
8. MENEZES E SILVA, C. H. P. **Bacteriologia: um texto ilustrado**. Rio de Janeiro. Eventos, 1999.
9. SEABRA, E. J. G.; SEABRA, E. G.; BARBOSA, S. V. Redução da placa bacteriana com o uso de clorexidina e HCT<sub>20</sub> em pacientes com gengivite e periodontite crônicas. *ROBRAC*, v.27, n.9, p. 13-7, set. 2000.
10. SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; LOPES, H. P. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J*, v. 32, n.5, p. 361-9, Sept.1999.
11. SOUZA FILHO, F. J. **Avaliação em microscopia eletrônica de varredura da ação de substâncias químicas irrigadoras de canais radiculares na permeabilidade da dentina radicular**. 2002. 62 f. Tese (Livro-Docência) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, São Paulo.
12. WALTIMO, T. M.; ORSTAVIK, D.; SIRÉN, E. K.; HAAPASALO, M. P. *In vitro* susceptibility of *Cândida albicans* to four disinfectants and their combinants. *Int Endod J*, v. 32, n. 6, p. 421-9, Nov. 1999.

# Luciano Augusto de Jesus

CRO GO 4313

## Cirurgia Bucocomaxilofacial

Especialista em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial - ABO - Uberlândia-MG

Especializando em Imaginologia Dento-Maxilo-Mandibular - FOA - Anápolis-GO

Professor das disciplinas de Cirurgia e Farmacologia da FOA - Anápolis-GO

Corpo Clínico do Serviço de Cirurgia e Traumatologia Maxilo-Facial do Hospital Geral de Goiânia

- ☞ Dor orofacial
- ☞ Cirurgia dos traumas faciais
- ☞ Cirurgia bucal
- ☞ Cirurgias avançadas em Implantodontia
- ☞ Patologia bucal
- ☞ Tratamento das desordens têmporo-mandibulares

# Cynara Mathias Costa

CRO GO 4307

## Odontopediatria

Especialista em Odontopediatria pela UFU - Uberlândia-MG

Odontologia para:

- ☞ bebês
- ☞ gestantes
- ☞ crianças
- ☞ pacientes especiais
- ☞ adolescentes



**NÚCLEO  
ODONTO  
MÉDICO**

RUA 32-A, Nº 182 - Setor Aeroporto -  
Goiânia - Goiás - Cep: 74075-480  
Fone: (62) 223-8604 - lcodondo@ig.com.br