

Estudo *in vitro* da atividade antimicrobiana de soluções irrigadoras na eliminação de *Enterococcus faecalis*

In vitro study of antimicrobial activity of irrigating solutions in the elimination of *Enterococcus faecalis*

Luiz Fernando TOMAZINHO*
Danielli Cristina Cavalcante da SILVA**
Flávia Sens FAGUNDES***
Paulo Henrique TOMAZINHO****

Endereço para correspondência:

Luiz Fernando Tomazinho
Rua Inajá, 3.560 – ap. 42 – Centro
Umuarama – PR – CEP 87501-160
E-mail: luizft@usp.br

* Professor de Endodontia da UNIPAR/PR. Especialista em Endodontia (UNIP/SP) e Doutor em Microbiologia (ICB-USP/SP).

** Mestranda em Ortodontia (CPO São Leopoldo Mandic/SP).

*** Mestranda em Endodontia (CPO São Leopoldo Mandic/SP).

**** Professor de Microbiologia do UnicenP/PR. Especialista em Periodontia (SOBRAPE) e Mestre em Microbiologia (ICB-USP).

Recebido em 10/8/06. Aceito em 21/10/06.

Palavras-chave:

endodontia; soluções irrigadoras; atividade antimicrobiana.

Resumo

Bactérias facultativas como *Enterococcus faecalis* têm sido isoladas de patologias ligadas a canais radiculares, sendo consideradas uma das espécies mais resistentes da cavidade oral e uma das possíveis causas de falha nos tratamentos endodônticos. O objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, a efetividade de várias soluções irrigadoras na eliminação de *Enterococcus faecalis*. Foi aplicado o teste de disco-difusão em ágar neste trabalho. A bactéria utilizada foi *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), e as soluções irrigadoras foram NaOCl 0,5%, 1%, 2,5% e 5%; clorexidina 0,12% e 2%; EDTA 17%; e H₂O₂ 10 vol. A clorexidina 2% e NaOCl 5% foram as soluções irrigadoras mais eficientes, e NaOCl 0,5%, EDTA 17% e H₂O₂ mostraram-se inefetivas na eliminação dessa espécie. Os resultados sugerem que a eliminação de *E. faecalis* depende da concentração e do tipo de solução irrigadora utilizada.

keywords:

endodontics; irrigating solutions; antimicrobial activity.

Abstract

Facultative bacteria such as *Enterococcus faecalis*, have been isolated from pathologically involved root canals, being considered one of the most resistant species in the oral cavity one of the possible causes of failure of root canal treatment. The aim of this study was to assess, in vitro, the effectiveness of the several irrigating solutions in the elimination of *Enterococcus faecalis*. The disk-diffusion in agar test was utilized in this study. The bacteria utilized was *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and the irrigating solutions were NaOCl 0,5%, 1%, 2,5% and 5%; chlorhexidine 0,12% and 2%; EDTA 17% and H₂O₂ 10 vol. Chlorhexidine 2% and NaOCl 5% were the most effective irrigators and NaOCl 0,5%; EDTA 17% and H₂O₂ showed ineffectiveness in the elimination of this specie. These results suggest that the elimination of *E. faecalis* depends on the concentration and type of irrigator used.

Introdução

Bactérias e seus produtos metabólicos são considerados agentes etiológicos primários da mortificação pulpar e da lesão periapical. Em virtude disso, a eliminação de microrganismos é um dos passos mais importantes na terapia endodôntica. Bactérias anaeróbias, principalmente as gram-negativas do gênero *Prevotella* spp. e *Porphyromonas* spp., estão freqüentemente associadas a sinais e sintomas de origem endodôntica [10]. Já bactérias facultativas, como *Enterococcus faecalis*, têm sido isoladas de patologias relacionadas a canais radiculares e também possuem grande freqüência em casos de lesões renitentes ou refratárias [6, 18].

O emprego de substâncias químicas durante o preparo químico-mecânico do canal radicular assume especial importância na desinfecção e limpeza do sistema de canais radiculares. É imperioso ressaltar que a substância química utilizada durante o preparo deve conter propriedades que permitam as ações bactericida e solvente tecidual. Por sua vez, as soluções empregadas nos procedimentos de irrigação-aspiração desempenham ação física importante na remoção de detritos e na redução do número de bactérias existentes no interior do canal radicular [19]. Assim, a utilização de uma solução química com propriedades antimicrobianas é de valor incontestável na desinfecção do sistema de canais radiculares.

Várias soluções, como hipoclorito de sódio, EDTA, ácido cítrico, clorexidina e outras, têm sido usadas como substâncias auxiliares da instrumentação, entretanto o irrigante ideal ainda não foi encontrado [12]. A solução de hipoclorito de sódio tem sido a substância química mais utilizada no preparo de canais radiculares por mais de cinco

décadas. Vários efeitos são atribuídos a ela, tais como: ação solvente de matéria orgânica; lubrificante; clareador; desodorizante; e atividade antimicrobiana [2, 5, 8, 9]. Em virtude do poder citotóxico do hipoclorito de sódio, recomenda-se o emprego de soluções menos concentradas, as quais devem manter uma atividade antimicrobiana satisfatória [25].

Outra substância alternativa tem sido estudada como irrigante e medicação intracanal, a clorexidina, por possuir ação antimicrobiana imediata, amplo espectro antimicrobiano e relativa ausência de toxicidade [7]. Em baixas concentrações ela é bacteriostática e em concentrações mais elevadas é bactericida, de acordo com Lopes *et al.* (1999) [17].

Como o tratamento endodôntico é realizado para evitar que a infecção se espalhe dos canais radiculares para os tecidos periapicais e essas infecções são tratadas por procedimentos mecânicos auxiliados por substâncias químicas, é oportuno avaliar a atividade antimicrobiana de algumas dessas substâncias utilizadas rotineiramente no preparo dos canais radiculares.

Materiais e métodos

As soluções irrigadoras empregadas foram: hipoclorito de sódio a 0,5%, 1%, 2,5% e 5%; clorexidina a 0,12% e 2%; água oxigenada 10 volumes e EDTA a 17% (Fórmula & Ação Farmácia de Manipulação – São Paulo – SP). A espécie bacteriana utilizada foi *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. A bactéria foi cultivada e mantida em caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Biobrás – Montes Claros – MG), suplementado com hemina (5 g/mL) e menadiona (0,5 g/mL). Culturas de 48 horas da espécie bacteriana testada foram usadas como inóculo.

O teste de disco-difusão em ágar foi a metodologia utilizada. Placas de Petri contendo o meio Triptycase-Soy Agar (TSA), enriquecido com 10 mL de sangue de carneiro desfibrinado e suplementado com hemina e menadiona, foram inoculadas com as bactérias testadas. A concentração bacteriana foi padronizada por intermédio da turbidez do meio, de acordo com a escala 0,5 de McFarland, a qual corresponde a uma concentração bacteriana de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ céls/mL. Inoculou-se 0,1 mL do caldo bacteriano padronizado na superfície do ágar, onde foi uniformemente espalhado com o auxílio de alças de vidro em "L" estéreis.

Discos de papel-filtro (padronizados com 5 mm de diâmetro) estéreis foram saturados com as soluções irrigadoras e depositados de maneira equidistante sobre a superfície do ágar. Em seqüência, as placas inoculadas foram incubadas em uma estufa a 37°C por um período de 48 horas. Ao término do período de incubação, o diâmetro dos halos de inibição do crescimento bacteriano em torno dos discos de papel contendo as soluções foi mensurado, com o auxílio de uma régua milimetrada transparente.

O grupo controle consistiu em placas de ágar-sangue inoculadas com a espécie bacteriana testada e contendo discos de papel secos, sem soluções irrigadoras. Efetuou-se todo o experimento em duplicata. O procedimento foi realizado assepticamente, empregando-se apenas instrumental estéril.

Resultados

As médias dos diâmetros dos halos inibitórios do crescimento bacteriano proporcionados pelas soluções irrigadoras testadas estão expressas na tabela I. As soluções irrigadoras que apresentaram maior atividade antimicrobiana perante a espécie bacteriana testada foram, em ordem decrescente: clorexidina 2% (figura 1); NaOCl 5%; clorexidina 0,12%; NaOCl 2,5%; e NaOCl 1%. As demais soluções irrigadoras não apresentaram halos de inibição demonstrativos de atividade antimicrobiana ante a espécie testada.

Tabela I - Medida dos diâmetros (em mm) dos halos de inibição do crescimento de *E. faecalis* pelo método de disco-difusão

Soluções irrigadoras	Média dos halos
NaOCl 0,5%	0
NaOCl 1%	1
NaOCl 2,5%	3
NaOCl 5%	5
Clorexidina 0,12%	4
Clorexidina 2%	7
EDTA 17%	0
H ₂ O ₂ 10 volumes	0

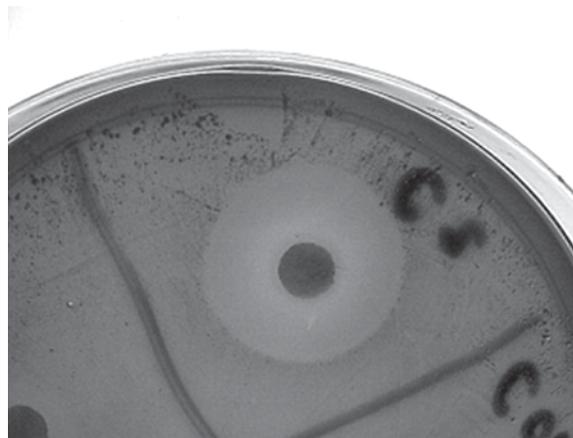


Figura 1 - Halo de inibição de crescimento proporcionado pela clorexidina 2%

Discussão

As metodologias experimentais realizadas *in vitro* apresentam vantagens e desvantagens. Alguns fatores relacionados diretamente com a metodologia podem vir a ser de difícil padronização, como por exemplo: pH do substrato, tanto em ágar quanto em caldo, sensibilidade da droga testada, densidade e número de células bacterianas inoculadas, período de incubação e atividade metabólica dos microrganismos.

Enterococcus faecalis é um coco gram-positivo facultativo e tem sido relacionado com quadros de infecções de canais radiculares persistentes [11, 18]. Em virtude disso, essa espécie bacteriana já foi e ainda é usada em testes para avaliar a efetividade de substâncias antimicrobianas utilizadas na terapia endodôntica [1, 15, 23, 24], especialmente pelo seu alto índice de resistência aos agentes antimicrobianos [14].

No presente estudo, nós utilizamos uma cepa de referência (ATCC 29212), pelo fato de tal bactéria já ter sido empregada em estudos anteriores para avaliação da eficácia de agentes antimicrobianos [11, 24].

Byström e Sundqvist (1983) [3] demonstraram que o preparo químico-cirúrgico com uso de uma solução irrigadora sem caráter antimicrobiano reduz em 50% o número de bactérias no interior do canal radicular. Entretanto, quando foi utilizado hipoclorito de sódio a 0,5%, 80% das bactérias foram eliminadas. Com isso, fica estabelecido que a aplicação de substâncias químicas com poder antimicrobiano durante o preparo do canal radicular desempenha um importante papel na desinfecção do sistema de canais radiculares.

O hipoclorito de sódio possui propriedades germicida e bactericida proporcionais à sua concentração, embora sua toxicidade se eleve também proporcionalmente com o aumento da concentração [25]. Atualmente o hipoclorito de sódio

é a substância mais freqüentemente utilizada para irrigação de canais radiculares. Entretanto vários pesquisadores têm sugerido que o uso da clorexidina como solução irrigadora também vem obtendo bons resultados em virtude de suas propriedades [4]. Pesquisas que comparam o efeito antimicrobiano do hipoclorito de sódio e da clorexidina mostram resultados conflitantes [16, 22].

Em estudo realizado por Siqueira *et al.* (1998) [24] demonstrou-se que a solução de hipoclorito de sódio a 4% produziu maior atividade antimicrobiana que a clorexidina a 2%. Esse resultado discorda do observado em outros trabalhos encontrados na literatura, em que a clorexidina a 2% se mostrou mais efetiva que o hipoclorito de sódio a 5% [16, 20].

Nossos resultados concordam com os de Ohara *et al.* (1993) [20] e Jeansonne e White (1994) [16], os quais apresentam a clorexidina a 2% como mais efetiva que o hipoclorito de sódio a 5%. Também mostramos que a capacidade antimicrobiana da solução de hipoclorito de sódio aumenta proporcionalmente à sua concentração, corroborando os achados de Siqueira *et al.* (1998) [24] e Ringel *et al.* (1982) [22].

Quanto à busca por uma solução ideal, outras propriedades também devem ser analisadas. A clorexidina é relativamente não-tóxica nas concentrações utilizadas, enquanto o hipoclorito de sódio pode ser citotóxico e irritante [21]. Por outro lado, o hipoclorito de sódio possui capacidade solvente tecidual, que a clorexidina não apresenta [13]. Enfim, cada substância tem vantagens e desvantagens que devem ser consideradas no momento da escolha da solução irrigadora a ser utilizada.

Conclusão

O EDTA a 17%, a água oxigenada 10 volumes e o hipoclorito de sódio a 0,5% não foram capazes de inibir o crescimento bacteriano. Já as soluções de hipoclorito de sódio nas concentrações de 1%, 2,5% e 5% apresentaram atividade antimicrobiana, a qual foi diretamente proporcional ao aumento da concentração. Entre as soluções irrigadoras utilizadas em nosso estudo, a clorexidina a 2% foi a que alcançou maior capacidade antimicrobiana ante a espécie *Enterococcus faecalis in vitro*; assim, podemos correlacionar esses resultados com a clínica, de modo a contribuir na desinfecção do sistema de canais radiculares, visando sempre a um aumento no sucesso dos tratamentos endodônticos.

Referências

1. Ayhan H, Sultan N, Cirak M, Ruhi MZ, Bodur H. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. *Int Endod J.* 1999;32:99-102.
2. Bloomfield SF, Miles GA. The antibacterial properties of sodium dichloroisocyanurate and sodium hypochlorite formulations. *J Appl Bacteriol.* 1979;46:65-73.
3. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology.* 1983;55:307-12.
4. Delany GM, Patterson SS, Miller MS, Newton CW. The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology.* 1982;53:518-23.
5. Dychdala GR. Chlorine and chlorine compounds. In: Block SS. *Desinfection, sterilization, and preservation.* 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1991. p. 133-5.
6. Engström B. The significance of enterococci in root canal treatment. *Odont Revy.* 1964;15:87-105.
7. Ferraz CCR. Avaliação in vitro do gel de clorexidina usado como irrigante endodôntico [Tese – Doutorado]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas; 1999. p. 141.
8. Foley DB. Effectiveness of selected irrigants in the elimination of *Bacteroides melaninogenicus* from the root canal system: an in vitro study. *J Endodon.* 1983;9:236-41.
9. Georgopoulou M. Evaluation of the antimicrobial effectiveness of citric acid and sodium hypochlorite on the anaerobic flora of the infected root canal. *Int Endod J.* 1994;27:139-43.
10. Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J.* 1994;27:291-8.
11. Gomes BPFA, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Variations in the susceptibility of selected microorganisms to endodontic irrigants. *J Endodon.* 1996;25:299-301.

12. Gomes BPPA. Microrganismos: Quais são? Onde estão? Que danos causam? In: Cardoso RJA, Gonçalves EAN. Odontologia: endodontia e trauma. [S.l.]: Artes Médicas; 2002. v. 2, p. 77-97.
13. Gordon TM. Solvent effect of various dilutions of sodium hypochlorite on vital and necrotic tissue. *J Endodon.* 1981;7:466-9.
14. Heath CH, Blackmore TK, Gordon DL. Emerging resistance in *Enterococcus* spp. *Medical Journal of Australia.* 1996;164:116-20.
15. Heling I, Chandler NP. Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. *Int Endod J.* 1998;31:8-14.
16. Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endodon.* 1994;20:276-8.
17. Lopes HP, Siqueira Jr. JF, Elias CN. Substâncias químicas empregadas no preparo dos canais radiculares. In: Lopes HP, Siqueira Jr. JF. *Endodontia: biologia e técnica.* Rio de Janeiro: Medsi; 1999. p. 369-96.
18. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with periodontitis. *Int Endod J.* 1998;31:1-7.
19. Moodnik RM. Efficacy of biomechanical instrumentations: A scanning electron microscope study. *J Endodon.* 1976;2:261-6.
20. Ohara PK, Torabinejad M, Kettering JD. Antibacterial effects of various endodontic irrigants on selected anaerobic bacteria. *Endodontics and Dental Traumatology.* 1993;9:95-100.
21. Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, Pashley DH. Cytotoxic effects of sodium hypochlorite on vital tissue. *J Endodon.* 1985;11:525-8.
22. Ringel AM, Patterson SS, Newton CW, Miller CH, Mulhern JM. In vivo evaluation of chlorhexidine gluconate solution and sodium hypochlorite solution as root canal irrigants. *J Endodon.* 1982;8:200-4.
23. Shin M, Marshall J, Rosen S. The bactericidal efficiency of sodium hypochlorite as an endodontic irrigant. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology.* 1970;29:613-9.
24. Siqueira Jr FJ, Batista MMD, Fraga RC, Uzeda M. Antimicrobial effects of endodontic irrigants on black-pigmented Gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endodon.* 1998;24:414-6.
25. Spanberg LSW. Intracanal medication. In: Ingle JI, Bakland LK. *Endodontics.* 4. ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994. p. 627-40.

DENTSPLY

MAILLEFER