



CFC: uma alternativa para as infecções endodônticas resistentes?

CFC: an alternative to endodontic refractory infections?

Andre Rodrigues Tavares

Jonas Beumer

Cirurgiões-dentistas

Robson Roman Pereira

Professor Mestre de Microbiologia da Uniplac/SC

Anelise Viapiana Masiero

Professora Doutora de Endodontia da Uniplac/SC

Resumo

O objetivo deste trabalho foi testar a efetividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio, metronidazol e ciprofloxacina, quando utilizados isolados ou em associações sobre o *Enterococcus faecalis*. Uma colônia de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 foi cultivada e, após o desenvolvimento, os microrganismos foram removidos e inoculados em infusão de Mueller-Hinton. As placas foram divididas em quatro partes e ao centro de cada divisão foi realizado um poço para a colocação das medicações. A ciprofloxacina isolada foi a medicação mais efetiva. Considerando as associações, todas promoveram inibição, sem diferenças estatisticamente significativas. O hidróxido de cálcio e metronidazol isolados não apresentaram poder antimicrobiano.

Palavras-chave: ciprofloxacina; metronidazol; hidróxido de cálcio; *enterococcus faecalis*.

Abstract

The objective of this study was to verify the antimicrobial effectiveness of calcium hydroxide, metronidazole and ciprofloxacin, when used alone or in associations against *Enterococcus faecalis*. A colony of *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 was grown and after development, the microorganisms were removed and inoculated on Mueller-Hinton infusion. The objective of this study was to verify the antimicrobial effectiveness of calcium hydroxide, metronidazole and ciprofloxacin, when used alone or in associations against *Enterococcus faecalis*. A colony of *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 was grown and after development, the microorganisms were removed and inoculated on Mueller-Hinton infusion. The plates were divided into four parts and in the center of each division a well was done for placement of the medications. The ciprofloxacin alone was the most effective medication. Considering the associations, all promoted inhibition, without statistically significant differences. The calcium hydroxide and metronidazole alone showed no antimicrobial action.

Keywords: ciprofloxacin; metronidazole, calcium hydroxide; *enterococcus faecalis*.

Introdução

A Endodontia, enquanto especialidade, visa o tratamento das afecções pulpares e periapicais com o intuito de manter o dente envolvido em condições funcionais. No entanto, em determinadas situações o profissional se depara com sinais e sintomas não condizentes com o reparo dos tecidos acometidos, caracterizando-se desta forma o insucesso da terapia instituída.

Dentro deste contexto, a limpeza e modelagem assumem grande importância em relação à medicação intracanal como forma de sanificação dos canais radiculares (9). No entanto, há de se considerar a importância da medicação intracanal como um passo essencial principalmente nos casos de lesões resistentes, onde se destaca o *Enterococcus Faecalis* como um dos principais microrganismos responsáveis por estas patologias (18).

Na tentativa de suprir as limitações do hidróxido de cálcio, outras medicações têm sido propostas. Dentre elas destaca-se a associação medicamentosa à base de hidróxido de cálcio, metronidazol e ciprofloxacina – CFC - (8, 14, 19). No entanto, poucos estudos com o emprego de tal medicação são relatados na literatura. Frente ao exposto, o presente estudo teve por objetivo: avaliar a atividade antimicrobiana da referidas substâncias que compõe o CFC, isoladas ou em associação, bem como, em diferentes concentrações sobre o *Enterococcus Faecalis*.

Material e Método

A atividade antimicrobiana foi avaliada através do método clássico de difusão radial em ágar. Inicialmente, retirou-se um disco de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 liofilizado, prensado e inoculado em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) para crescimento em temperatura de 35°C por 24h. Após crescimento, observado pela turvação do meio de cultura, as bactérias foram semeadas em uma placa de Petri contendo ágar Muller Hinton suplementado com sangue de carneiro desfibrinado (ágar sangue) e colocada em cultura a 35°C por 24 horas. Attingido o desenvolvimento bacteriano, várias colônias foram removidas com uma alça de platina, inoculadas em cinco placas de petri contendo ágar Muller Hinton e deixadas em estufa por 24h a 35°C. A partir do crescimento, com auxílio de alça de platina, algumas colônias foram retiradas e inoculadas em tubos contendo 2,5 ml solução fisiológica (NaCl 0,9%) e a turgidez foi

ajustada a 0,5 padrão de McFarland utilizando-se um densímetro.

Para avaliação da efetividade das medicações, foi realizada a técnica da difusão em ágar pelo método de poço, em placas com camada dupla, ou seja, camada base e camada *seed* de meio de cultura de ágar Muller Hinton. Após a solidificação, foram adicionados 12,5 mL de ágar Muller Hinton esterilizado e resfriado a 50°C, ao qual foi incorporado 2,5 mL de inóculo de microrganismo indicador com auxílio de uma pipeta esterilizada para a obtenção da camada *seed*. Solidificada a camada *seed*, as placas foram divididas em quatro partes iguais e ao centro de cada divisão poços foram confeccionados pela remoção do ágar, com cilindros plásticos com cerca de 4 mm de diâmetro.

As medicações foram preparadas em farmácia de manipulação de acordo com as especificações contidas no quadro 1. Os grupos 1, 2 e 3 deveriam conter cápsulas de 40mg da associação entre hidróxido de cálcio p.a., ciprofloxacina e metronidazol, tendo como variação a proporção entre as medicações. No grupo 1 a maior concentração foi de metronidazol, no grupo 2 de ciprofloxacina e no grupo 3 de hidróxido de cálcio. Este último grupo caracterizou a formulação padrão, considerando-se as proporções de 50%Ca(OH)₂ e 25% ciprofloxacina e 25% metronidazol (10).

Nos grupos 4, 5 e 6 foram testadas as medicações isoladamente em cápsulas de 10mg.

Os medicamentos foram manipulados utilizando-se placa de vidro e espátula metálica estéreis. Para composição da pasta, utilizou-se em todos os grupos como veículo o propilenoglicol atingindo a mesma consistência preconizada nas pastas à base de

hidróxido de cálcio. Com o objetivo de facilitar a colocação dos materiais, após a sua manipulação, cada uma das drogas testadas foi inserida nos poços utilizando-se seringa de plástico esterilizada. Teve-se o cuidado para que cada um dos orifícios fosse preenchido com as respectivas pastas, sem, entretanto extravasar as mesmas para o restante da placa.

Desta forma, cada placa continha quatro medicações testes, sendo três combinações das diferentes concentrações da associação e uma medicação isolada. Ao final, obtiveram-se três repetições para cada grupo.

Em seguida, as placas foram pré-incubadas à temperatura ambiente por 2 horas, para difusão das substâncias antes do início do desenvolvimento das cepas. Após, as placas foram colocadas em estufa por 48h a 35°C. Decorrido este período, as placas de petri foram levadas a um contador de colônias e um único avaliador, realizou a leitura do diâmetro dos halos de inibição com auxílio de uma régua milimetrada. Os dados foram analisados pelo Programa Estatístico GMC versão 8.1

Resultados

As médias das medidas, em milímetros, dos halos de inibição encontram-se descritas na tabela I. Inicialmente verificou-se a distribuição da amostra pelo teste de aderência à curva, detectando-se uma distribuição não normal da amostra. Em sequência, aplicou-se o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* para múltiplas comparações. Na avaliação geral, comparando as substâncias isoladas ou em associações, o grupo 4 foi o mais efetivo de todos com diferenças estatisticamente significantes em nível de 5%. Entre os demais não houve diferença.

Levando em consideração a efetividade das substâncias isoladas, pode-se observar que a ciprofloxacina foi a medicação mais efetiva, enquanto o metronidazol e o hidróxido de cálcio não apresentaram ação antibacteriana ao *Enterococcus Faecalis*. Em relação às diferentes concentrações das associações (grupos 1, 2 e 3), não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre si, sendo que todas as associações promoveram inibição do crescimento bacteriano no período analisado (tabela II).

Quadro 1. Classificação dos grupos testados, considerando o uso isolado ou em associação e a concentração de cada substância

Grupo	Componentes da medicação
1	Ca(OH) ₂ 10mg + Ciprofloxacina 10mg + Metronidazol 20mg
2	Ca(OH) ₂ 10mg + Ciprofloxacina 20mg + Metronidazol 10mg
3	Ca(OH) ₂ 20mg + Ciprofloxacina 10mg + Metronidazol 10mg
4	Ciprofloxacina 10mg
5	Metronidazol 10mg
6	Ca(OH) ₂ 10mg

Tabela I. Médias, em milímetros, dos halos de inibição atingidos por cada grupo

Grupos	Médias
1	3,13
2	3,1
3	3
4	3,37
5	0
6	0

Tabela II. Comparação entre os grupos

Comparação entre grupos	Comparação entre grupos
1 X 4	1 X 4
2 X 4	2 X 4
3 X 4	3 X 4
3 X 5	3 X 5
3 X 4	3 X 4

Discussão

Há um consenso de que a lesão periapical persistente após terapia endodôntica apresenta uma etiologia e uma terapêutica mais complexas (13). Mesmo os tratamentos mais cuidadosos podem apresentar lesões persistentes devido à complexidade anatômica do sistema de canais radiculares com regiões que não podem ser adequadamente instrumentadas e obturadas (12).

O tratamento em sessão única tem mostrado a permanência de infecção residual, principalmente localizada nas áreas inacessíveis à instrumentação, podendo atingir índices superiores a 85% dos casos (12). Nesta lógica, as taxas de sucesso são significativamente maiores com o uso da medicação intracanal nos casos com presenças de lesões apicais, quando comparado ao tratamento em sessão única (15).

Considerando as bactérias envolvidas nos casos resistentes assintomáticos, poucas espécies foram identificadas, sendo principalmente encontrados cocos gram positivos e filamentos. A presença do *Enterococcus faecalis* nos casos de lesões persistentes tem interesse particular, porque este microrganismo raramente é identificado nas infecções endodônticas primárias (17). No entanto, é considerado o microrganismo mais relacionado aos casos de insucesso (19).

Neste particular é fundamental mencionar que o microrganismo é resistente à maioria das medicações intracanaís e tolera pH superiores a 11,5 (1), o que pode justificar sua resistência à ação do hidróxido de cálcio quando utilizado como medicação intracanal. Esta resistência provavelmente ocorre por sua habilidade em regular o pH internamente através de uma bomba de prótons (5). Ele sobrevive a prolongados períodos de falta de alimento (7) e pode crescer como uma monoinfecção, não necessitando de sinergismo (6).

Ainda, sugere-se que o *Enterococcus Faecalis* pode ser inibido por outros microrganismos geralmente presentes nas infecções primárias. No entanto, tem a capacidade de sobrevivência e latência, adaptando-se a várias condições ambientais, isto inclui a habilidade de sobreviver em ambientes com nutrientes escassos e de se multiplicar quando fontes nutricionais são restabelecidas (18).

A adesão dentinária é apontada como principal fator que aumenta a resistência do *Enterococcus Faecalis* ao hidróxido de cálcio (4).

Seguindo a mesma linha, estudo recente destaca que o *Enterococcus Faecalis* pode formar um biofilme calcificado na porção externa radicular bem como no interior dos canais e que a presença do hidróxido de cálcio pode ter um efeito negativo aumentando a força de aderência do microrganismo ao colágeno tipo I, dificultando ainda mais sua eliminação (16).

Levando em consideração o presente estudo, o uso isolado da ciprofloxacina atingiu os maiores halos de inibição. Acredita-se que a eficácia sobre o *Enterococcus Faecalis* ocorreu devido ao espectro de ação que o medicamento possui sobre cocos gram positivos. Em relação ao metronidazol, este apresentou apenas uma inibição parcial, a qual não foi considerada. Tal fato, provavelmente justifica-se por ser uma medicação que tem como ação principal a eliminação de microrganismos gram negativos (20).

Quanto ao hidróxido de cálcio, esse tem como ação principal manter o pH alcalino, inibindo o crescimento e proliferação bacteriana. Com o uso do propilenoglicol como veículo, a liberação e dissociação do hidróxido de cálcio dão-se de forma lenta (11). Talvez esta característica justifique o resultado insatisfatório do hidróxido de cálcio no período analisado, o qual não permitiu a dissociação e liberação dos íons OH para elevação do pH.

É oportuno lembrar que, a partir da tentativa de explicação do mecanismo antimicrobiano do hidróxido de cálcio, observa-se, como alvo vulnerável às alterações de pH, as enzimas presentes na membrana citoplasmática, que podem ser levadas à inativação, reversível ou irreversível,

quando considerados microrganismos anaeróbios e aeróbios. É claro que o efeito antimicrobiano depende da velocidade de liberação de íons hidroxila, do tempo de contato de ação direto ou indireto, para que possam expressar seu real efeito controlador sobre os microrganismos (3).

Quanto à associação do grupo 1 ter demonstrado uma ação superior ao grupo 2, a diferença estatisticamente não pode ser considerada, mas é sugestivo de potencialização da ação devido à soma da inibição total da ciprofloxacina com a inibição parcial do metronidazol (2).

Na terceira associação, onde foi aumentada a quantidade de hidróxido de cálcio e a qual se caracteriza pela composição original (10), não houve alteração significativa na inibição antimicrobiana, provavelmente devido à ação lenta do hidróxido de cálcio.

Os resultados promissores do presente estudo corroboram com os relatados na literatura (14) onde o CFC foi a medicação mais efetiva na eliminação do *Enterococcus Faecalis* e a apontam como uma alternativa eficiente para as infecções endodônticas de difícil solução. Considerando-

se o grupo mais efetivo, poderia se indicar o uso da ciprofloxacina isolada, pois esta apresentou os maiores níveis de inibição sendo estes estatisticamente superiores as demais medicações e associações testadas. No entanto, sabe-se que a maioria das infecções endodônticas são mistas. Assim, acredita-se que o uso isolado da ciprofloxacina não deve ser recomendado, uma vez que, empregando-se a associação de hidróxido de cálcio, ciprofloxacina e metronidazol amplia-se o espectro de ação da medicação intracanal, aumentando as chances de eliminação das infecções endodônticas resistentes. Ainda, em relação ao teste das diferentes concentrações, observou-se que a menor concentração da ciprofloxacina isolada foi a mais eficiente para inibir o crescimento bacteriano.

Frente ao exposto, evidencia-se que a conduta clínica em relação ao emprego da medicação intracanal deve ser criteriosa, iniciando-se pelo diagnóstico preciso da presença de uma lesão resistente. Em outras palavras, o profissional deve cercar-se de indícios que apontem que a infecção que persiste no canal não seja resultado de procedimentos clínicos inadequados, e sim re-

sultante da presença de microrganismos mais patogênicos. Assim, o uso responsável do CFC, não o empregando em qualquer situação, pode evitar uma possível resistência bacteriana. Dentro deste contexto, novos estudos que avaliem a possibilidade da resistência bacteriana e principalmente o comportamento clínico desta medicação devem ser realizados.

Conclusão

Frente às condições do presente estudo foi possível concluir que:

1. a medicação mais efetiva frente ao *Enterococcus Faecalis* foi a ciprofloxacina de uso isolado, com resultados significantes ao nível de 5%;
2. o metronidazol e o hidróxido de cálcio, quando utilizados isoladamente, considerando o tempo avaliado, não apresentaram ação antibacteriana sobre o microrganismo analisado;
3. em relação às diferentes concentrações das associações (grupos I, II e III), não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas, sendo que todas as associações promoveram inibição do crescimento bacteriano no período analisado.

Referências Bibliográficas

1. BYSTROM, A., CLAESSESON, R., SUNDQVIST, G. The antibacterial effect of camphorate paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod. Dent. Traumatol.*, v. 1, n. 5, p. 170-5, 1985.
2. CARREIRA, C. M., SANTOS, S. S., JORGE, A. O. et al. Antimicrobial effect of intracanal substances. *J. Appl. Oral Sci.*, v. 15, n. 5, p. 453-8, 2007.
3. ESTRELA, C., FIGUEIREDO, J. A. P. **Endodontia: princípios biológicos e mecânicos**. São Paulo: Artes Médicas, 2001.
4. ESTRELA, C., ESTRELA, C. R., HOLLANDA, A. C. et al. Influence of iodoform on antimicrobial potential of calcium hydroxide. *J. Appl. Oral Sci.*, v. 14, n. 1, p. 33-7, 2006.
5. EVANS, M., DAVIES, J. K., SUNDQVIST, G. et al. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int. Endod. J.*, v. 35, n. 3, p. 221-8, 2002.
6. FABRICIUS, L., DAHLÉN, G., HOLM, S. E. et al. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand. J. Dent. Res.*, v. 90, n. 3, p. 200-6, 1982.
7. FIGDOR, D., DAVIES, J. K., SUNDQVIST, G. starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 18, n. 4, p. 234-9, 2003.
8. FERRARI, P. H. P., CAI, S., BOMBANA, A. C. *Avaliação antimicrobiana in vitro de medicações intracanal*. In: 16ª Reunião da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 1999, Águas de São Pedro. 16ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa odontológica, 1999.
9. KAWASHIMA, N., WADACHI, R., SUDA H. et al. Root canal medicaments. *Int. Dent. J.*, v. 59, n. 1, p. 5-11, 2009.
10. LAGE-MARQUES, J. L. S., ANTONIAZZI, J. H. Quando a Medicação é Fundamental para sucesso da Terapia endodôntica. In: Riad Gorab, Elenice Aparecida Nogueira (Org.). *Atualização na Clínica Odontológica*. São Paulo: Artes Médicas, 2000, v. 1, p. 59-89.

11. MCHUGH, C. P., ZHANG, P., MICHALEK, S. *et al.* pH Required to Kill *Enterococcus faecalis* in vitro. *J. Endod.*, v. 30, n. 4, p. 218-20, 2004.
12. NAIR, P. N., HENRY, S., CANO, V. *et al.* Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, v. 99, n. 2, p. 231-52, 2005.
13. Nair, P. N. R. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int. Endod. J.*, v. 39, n. 4, p. 249-81, 2006.
14. PALLOTA, R. C., RIBEIRO, M. S., DE LIMA MACHADO, M. E. Determination of minimum inhibitory concentration of four medicaments used as intracanal medication. *Aust. Endod. J.*, v. 33, n. 3, p. 107-11, 2007.
15. SILVEIRA, A. M., LOPES, H. P., SIQUEIRA, J. F. *et al.* Periradicular repair after two-visit endodontic treatment using two different intracanal medications compared to single-visit endodontic treatment. *V. 18, n. 4, p. 299-304, 2007.*
16. SUM, C., MOHANTY, S., GUPTA, P. K. *et al.* Influence of endodontic chemical treatment on *Enterococcus faecalis* adherence to collagen studied with laser scanning confocal microscopy and optical tweezers: a preliminary study. *J. Biomed. Opt.*, v. 13, n. 4, 2008.
17. SUNQVIST, G., FIGDOR, D. Endodontic treatment of apical periodontitis. In: Ortavik, D., Pitt Ford, T. R. *Essential Endodontology*. Oxford: Blackwell, p. 242-77, 1998.
18. ROÇAS, I. N., SIQUEIRA JR., J. F., SANTOS, K. R. N. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J. Endod.*, v. 30, n. 5, p. 315-20, 2004.
19. TAKEUTI, M. L., LAGE-MARQUES, J. L. S., ANTONIAZZI, J. H. Penetração dentinária da associação hidróxido de cálcio, ciprofloxacina e metronidazol variando o veículo. *RPG*, v. 4, n. 2, p. 146-52, 1997.
20. VADE-MÉCUM. 6ª ed., São Paulo: Sorriak, 2000.

Recebido em: 10/03/2010

Aprovado em: 10/05/2010

Anelise Viapiana Masiero

Rua Marechal Deodoro, 635, Centro,
Lages/SC, Brasil - CEP: 88.501-001
E-mail: anemasiero@uniplac.net