



Pedro Henrique Souza Calefi

**Avaliação da ação antimicrobiana de agentes mucolíticos sobre
biofilme *in vitro* de *Enterococcus faecalis***

**BAURU
2021**

FACSETE – Faculdade Sete Lagoas

**Avaliação da ação antimicrobiana de agentes mucolíticos sobre
biofilme *in vitro* de *Enterococcus faecalis***

Monografia apresentada ao curso de
Especialização Lato Sensu da Faculdade Sete
Lagoas, como requisito parcial para conclusão
do Curso de especialização de Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Ferreira Da
Silva

**BAURU
2021**

CALEFI, PHS. **Avaliação da ação antimicrobiana de agentes mucolíticos sobre biofilme *in vitro* de *Enterococcus faecalis***. 2020. 16 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Endodontia). Instituto Odontológico de Pós Graduação. Bauru – São Paulo. 2020.

RESUMO

Em casos de necrose pulpar, a medicação intracanal é fundamental no sucesso do tratamento endodôntico. Atualmente vêm sendo sugeridas alterações na pasta de Hidróxido de Cálcio (CHP), de modo a otimizar sua ação antisséptica, bem como novas alternativas de medicação intracanal. A N-Acetilcisteína (NAC) é um fármaco capaz de agir sobre muco que tem mostrado resultados antimicrobianos favoráveis sobre biofilme. Já o Cloridrato de Ambroxol (AMB), também é um mucolítico, porém não possui estudos em odontologia, sendo bastante utilizado na pneumologia. Logo, este trabalho teve por objetivo avaliar a ação antimicrobiana sobre biofilme, das pastas: CHP + Propilenoglicol, NAC + Propilenoglicol, AMB + Propilenoglicol. Sobre 20 blocos de dentina bovina será induzida a formação de biofilme *in vitro* de *Enterococcus faecalis*. Após a maturação deste, as amostras foram tratadas com as pastas por 7 dias e, em seguida, coradas para avaliação em microscopia confocal e a porcentagem de células vivas mensurada pelo software bioImage. A CHP não apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) com o grupo controle (sem tratamento), já as pastas experimentais mostraram resultados favoráveis sobre o biofilme, com destaque para o AMB que apresentou a menor taxa de bactérias viáveis entre todos os grupos testados. Conclui-se então que novas alternativas de medicação devem ser estudadas, a fim de buscar o êxito do tratamento e, neste cenário o Cloridrato de Ambroxol pode ter notoriedade, devido sua ação sobre a camada de exopolissacarídeos e atividade antimicrobiana sobre biofilme.

Palavras-chave: *Enterococcus faecalis*, biofilme, Hidróxido de Cálcio, Cloridrato de Ambroxol, N-Acetilcisteína.

CALEFI, PHS. **Avaliação da ação antimicrobiana de agentes mucolíticos sobre biofilme *in vitro* de *Enterococcus faecalis***. 2020. 16 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Endodontia). Instituto Odontológico de Pós Graduação. Bauru – São Paulo. 2020.

ABSTRACT

In cases of pulp necrosis, intracanal medication is essential for the success of endodontic treatment. Currently, changes in the Calcium Hydroxide (CHP) paste have been suggested in order to optimize its antiseptic action, as well as new alternatives for intracanal medication. N-Acetylcysteine (NAC) is a drug capable of acting on mucus that has shown favorable antimicrobial results on biofilm. Ambroxol Hydrochloride (AMB), is also a mucolytic agent, however it does not have studies in dentistry, being widely used in pneumology. Therefore, this work aimed to evaluate the antimicrobial action on biofilm, from pastes: CHP + Propylene glycol, NAC + Propylene glycol, AMB + Propylene glycol. About 20 blocks of bovine dentin will be contaminated with biofilm *in vitro* of *Enterococcus faecalis*. After maturation, the samples were treated with pastes for 7 days and then stained for evaluation by confocal microscopy and the percentage of live cells measured by the bioImage software. The CHP did not show statistical difference ($p < 0.05$) with the control group (without treatment), whereas the experimental pastes showed favorable results on the biofilm, with emphasis on the AMB which presented the lowest rate of viable bacteria among all groups tested. It is concluded that new medication alternatives should be studied in order to seek treatment success and, in this scenario, Ambroxol Hydrochloride may have notoriety, due to its action on the exopolysaccharide layer and antimicrobial activity on biofilm.

Keywords: *Enterococcus faecalis*, biofilm, Calcium Hydroxide, Ambroxol Hydrochloride, N-Acetylcysteine.

Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	5
2.	OBJETIVO	6
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	7
•	Preparo das pastas.....	7
•	Teste antimicrobiano	7
•	Análise da capacidade antimicrobiana	7
•	Análise estatística	7
4.	RESULTADOS.....	8
5.	DISCUSSÃO	9
6.	CONCLUSÃO	11
	REFERÊNCIAS.....	12
7.	TABELA.....	15
8.	FIGURA.....	16

1. INTRODUÇÃO

O combate à infecção endodôntica é um desafio na clínica, devido ao alto número de patógenos no interior do sistema de canais radiculares, mesmo após a conclusão do preparo biomecânico (Vera *et al.* 2012).

O uso da medicação intracanal entre sessões é capaz de otimizar a taxa de sucesso da terapia endodôntica, especialmente a pasta de Hidróxido de Cálcio. (Zancan *et al.* 2016, Zancan *et al.* 2019). Entretanto, devido a um mecanismo de membrana, conhecido como “bomba de prótons”, alguns patógenos como o *Enterococcus faecalis* são capazes de resistir à esta substância (Evans *et al.* 2002; Nakajo *et al.* 2006; Chávez de Paz *et al.* 2007).

Visando a antissepsia do sistema de canais radiculares e buscando uma ação mais direta sobre a estrutura do biofilme bacteriano, a N-Acetilcisteína, um agente mucolítico, tem mostrado resultados promissores, inclusive como já relatado previamente, sobre o *E. Faecalis* (Quah *et al.* 2012; Ulusoy *et al.* 2016; Choi *et al.* 2018).

Uma outra substância semelhante é o Cloridrato de Ambroxol, utilizado na medicina pulmonar para a desagregação e dissolução de muco (Cataldi *et al.* 2014). Este fármaco tem a capacidade de agir em diferentes estágios da formação do muco, podendo ajudar a chegar nas células bacterianas (Hull *et al.* 2018).

Considerando o que foi comentado anteriormente a respeito da resistência do *E. Faecalis* quando exposto ao Hidróxido de Cálcio, este trabalho teve por objetivo avaliar a ação antimicrobiana de pastas a base de Cloridrato de Ambroxol e N-Acetilcisteína.

2. OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi avaliar a ação antimicrobiana das pastas de Cloridrato de Ambroxol e N-Acetilcisteína, comparadas à pasta de Hidróxido de Cálcio sobre biofilme *in vitro* de *Enterococcus faecalis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

- **Preparo das pastas**

As pastas de N-Acetilcisteína/ Propilenoglicol, Cloridrato de Ambroxol/ Propilenoglicol, Hidróxido de Cálcio/ Propilenoglicol foram preparadas na concentração de 1g/ 1mL, com a ajuda de uma balança digital e uma pipeta volumétrica.

- **Teste antimicrobiano**

Dos terços cervical e médio de incisivos bovinos foram obtidos discos de dentina bovina que foram regularizados, polidos e esterelizados a 121 °C.

A cepa ATCC 4083 do *Enterococcus faecalis* foi reativada e a densidade celular ajustada de acordo com a escala de McFarland 0.5. Feito isso, os discos de dentina foram contaminados e alocados em placa de 24 poços (1 disco de dentina + 100 µL de *E. Faecalis* + 1900 µL de BHI) e mantidos em estufa a 37 °C durante 21 dias (Guerreiro-Tanomaru *et al.* 2013).

Após a maturação do biofilme, os espécimes foram colocados em placas de Petri para o teste de contato direto com as pastas, onde permaneceram por 7 dias, diretamente sobre a superfície dentinária, encubados em estufa a 37° C.

Todos os procedimentos foram conduzidos no interior de uma câmara de fluxo laminar (VecoFlow Ltda, Campinas, SP, Brasil).

- **Análise da capacidade antimicrobiana**

Os discos foram lavados com PBS abundantemente a fim de remover excessos de pasta e células desagregadas, em seguida, o corante SYTO8 foi aplicado sobre as superfícies onde permaneceu por 10 minutos e então levados para análise em microscópio confocal de varredura a laser. Por essa coloração, células coradas em verde apresentam-se viáveis, já as coradas em amarelo, laranja ou vermelho, tiveram sua membrana afetada.

- **Análise estatística**

Todos os dados obtidos, foram analisados primeiramente quanto a normalidade através do teste de Shapiro-Wilks, sendo observada distribuição não normal. O teste de Kruskal-Wallis não paramétrico foi aplicado para comparação geral, seguido pelo teste de Dunn. Foi adotado 5% de significância.

4. RESULTADOS

A tabela 1 apresenta os valores da mediana, mínimo e máximo da porcentagem de células vivas no biofilme. Ambas as pastas experimentais, mostraram diferença estatística com o grupo controle ($P < 0.05$), sendo os melhores resultados da pasta AMB; o grupo CHP não apresentou diferença estatística com o grupo controle ($P > 0.05$).

5. DISCUSSÃO

O uso do Hidróxido de Cálcio em endodontia, tem sido estabelecido por décadas, devido a sua ação biológica (Siqueira Jr *et al.* 1999; Peters *et al.* 2005), entretanto sua dificuldade em adentrar os túbulos dentinários pode afetar sua ação antimicrobiana, principalmente quando somados a certos fatores de resistência bacteriana (Wang *et al.* 1988; Nerwich *et al.* 1993; Zancan *et al.* 2016). Tal fato é confirmado neste trabalho, onde o CHP não mostrou diferença estatística com o grupo sem tratamento, possivelmente devido a mecanismos que patógenos como o *E. Faecalis* apresentam quando submetidos ao estresse, principalmente a bomba de prótons em sua membrana, que através do transporte de íons, impede que o meio se alcalinize pela ação do CHP, mantendo a homeostase bacteriana e diminuindo consideravelmente a capacidade antisséptica da pasta (Zancan *et al.* 2016; Estrela *et al.* 2005).

Devido aos fatores citados anteriormente, substâncias capazes de reduzir a eficácia da membrana celular, e promover uma ação mais direta sobre a célula bacteriana, devem ser estudadas, logo neste trabalho, observou-se interações interessantes de substâncias mucolíticas sobre o biofilme.

A N-Acetilcisteína, um fármaco capaz de reduzir a agregação bacteriana (Riise *et al.* 2000; Costa *et al.* 2017) tem mostrado resultados interessantes quanto a sua capacidade antimicrobiana, incluindo contra o *E. Faecalis* (Evans *et al.* 2002; Siqueira *et al.* 2010; Quah *et al.* 2012), porém não havia estudos prévios a este, quanto seu uso como pasta aplicado como medicação intracanal. Na mesma categoria de fármacos que o supracitado, o Cloridrato de Ambroxol, usado comumente na medicina pulmonar (Cataldi *et al.* 2014; Jhajharia *et al.* 2015; Moon *et al.* 2016) nunca havia sido usado em odontologia, porém suas propriedades mostraram resultados favoráveis.

Neste presente estudo, as pastas experimentais AMB e NAC mostraram resultados favoráveis sobre o biofilme bacteriano, com diferença estatística em relação ao CHP, porém sem diferenças significantes entre si. Contudo o grupo tratado com o Cloridrato de Ambroxol apresentou os menores valores de células viáveis, comprovando sua ação anti biofilme (Toker *et al.* 2009; Jhajharia *et al.* 2015). O Ambroxol é capaz de agir em diferentes etapas da formação do biofilme, o que favorece sua ação (Jhajharia *et al.* 2015). De acordo com o que foi observado, pode-se constatar também que houve crescimento bacteriano mesmo quando em contato com o Hidróxido de Cálcio, confirmando a resistência do *E. Faecalis* ao meio alcalino (Holland *et al.* 2017), principalmente quando nesta forma organizada em biofilme que favorece sua aderência (Nakajo *et al.* 2006; Cheng *et al.* 2015).

Considerando a metodologia aplicada, é possível afirmar que o uso do Cloridrato de

Ambroxol e da N-Acetilcisteína como medicação intracanal mostraram resultados promissores sobre o biofilme de *E. Faecalis*, com destaque para o Cloridrato de ambroxol. O uso de substâncias mucolíticas pode ser uma alternativa a complementar a etapa de desinfecção durante o tratamento endodôntico.

6. CONCLUSÃO

As pastas experimentais a base de Cloridrato de Ambroxol e N-Acetilcisteína apresentaram efetividade antimicrobiana sobre o biofilme de *Enterococcus faecalis*, sendo o Ambroxol mais eficiente. O uso destes fármacos deve ser estudado mais a fundo, para então, poderem ser sugeridos na prática endodôntica.

REFERÊNCIAS

- Vera J, Siqueira Jr JF, Ricucci D, Loghin S, Fernández N, Flores B, et al. One-versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. *Journal of Endodontics*. 2012;38(8):1040-52.
- Zancan RF, Calefi PHS, Borges MMB, Lopes MRM, de Andrade FB, Vivan RR, et al. Antimicrobial activity of intracanal medications against both *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* biofilm. *Microsc Res Tech*. 2019;82(5):494-500.
- Zancan RF, Vivan RR, Lopes MRM, Weckwerth PH, de Andrade FB, Ponce JB, et al. Antimicrobial activity and physicochemical properties of calcium hydroxide pastes used as intracanal medication. *Journal of Endodontics*. 2016;42(12):1822-8.
- Evans M, Davies J, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *International Endodontic Journal*. 2002;35(3):221-8.
- Nakajo K, Komori R, Ishikawa S, Ueno T, Suzuki Y, Iwami Y, et al. Resistance to acidic and alkaline environments in the endodontic pathogen *Enterococcus faecalis*. *Oral microbiology and immunology*. 2006;21(5):283-8.
- Chávez de Paz LE, Bergenholtz G, Dahlén G, Svensäter G. Response to alkaline stress by root canal bacteria in biofilms. *International Endodontic Journal*. 2007;40(5):344-55.
- Quah SY, Wu S, Lui JN, Sum CP, Tan KS. N-acetylcysteine inhibits growth and eradicates biofilm of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics*. 2012;38(1):81-5.
- Ulusoy AT, Kalyoncuoğlu E, Reis A, Cehreli ZC. Antibacterial effect of N-acetylcysteine and taurolidine on planktonic and biofilm forms of *Enterococcus faecalis*. *Dent Traumatol*. 2016 Jun;32(3):212-8.
- Choi Y-S, Kim C, Moon J-H, Lee J-Y. Removal and killing of multispecies endodontic biofilms by N-acetylcysteine. *brazilian journal of microbiology*. 2018;49(1):184-8.
- Cataldi M, Sblendorio V, Leo A, Piazza O. Biofilm-dependent airway infections: a role for ambroxol? *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2014;28(2):98-108.
- Hull J, Lyon R. In vitro pharmacology of ambroxol: Potential serotonergic sites of action. *Life sciences*. 2018;197:67-72.

Guerreiro-Tanomaru JM, de Faria-Júnior NB, Duarte MAH, Ordinola-Zapata R, Graeff MSZ, Tanomaru-Filho M. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates. *Journal of Endodontics*. 2013;39(3):346-50.

Siqueira Jr J, Lopes H. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *International Endodontic Journal*. 1999;32(5):361-9.

Peters CI, Koka R, Highsmith S, Peters OA. Calcium hydroxide dressings using different preparation and application modes: density and dissolution by simulated tissue pressure. *International Endodontic Journal*. 2005;38(12):889-95.

Wang JD, Hume W. Diffusion of hydrogen ion and hydroxyl ion from various sources through dentine. *International Endodontic Journal*. 1988;21(1):17-26.

Nerwich A, Figdor D, Messer HH. pH changes in root dentin over a 4-week period following root canal dressing with calcium hydroxide. *Journal of Endodontics*. 1993;19(6):302-6.

Estrela C, Estrela CRdA, Guimarães LF, Silva RS, Pécora JD. Surface tension of calcium hydroxide associated with different substances. *Journal of Applied Oral Science*. 2005;13(2):152-6.

Riise GC, Qvarfordt I, Larsson S, Eliasson V, Andersson BA. Inhibitory effect of N-acetylcysteine on adherence of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* to human oropharyngeal epithelial cells in vitro. *Respiration*. 2000;67(5):552-8.

Costa Fo, Sousa DM, Parreira P, Lamghari M, Gomes P, Martins MCL. N-acetylcysteine-functionalized coating avoids bacterial adhesion and biofilm formation. *Scientific reports*. 2017;7(1):17374.

Siqueira JF, Rôças IN, Ricucci D. Biofilms in endodontic infection. *Endodontic Topics*. 2010;22(1):33-49.

Jhajharia K, Parolia A, Shetty K, Mehta L. Biofilm in endodontics: A review. *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry*. 2015;5(1):1-12.

Moon J-H, Choi Y-S, Lee H-W, Heo JS, Chang SW, Lee J-Y. Antibacterial effects of N-acetylcysteine against endodontic pathogens. *Journal of Microbiology*. 2016;54(4):322-9.

Toker H, Ozdemir H, Eren K, Ozer H, Sahin G. N-Acetylcysteine, a Thiol Antioxidant, Decreases Alveolar Bone Loss in Experimental Periodontitis in Rats. *Journal of Periodontology*. 2009;80(4):672-8.

Holland R, Gomes Filho JE, Cintra LTA, Queiroz ÍOdA, Estrela C. Factors affecting the periapical healing process of endodontically treated teeth. *Journal of Applied Oral Science*. 2017;25:465-76.

Cheng C, Du L, Yu J, Lu Q, He Y, Ran T. Ciprofloxacin plus erythromycin or ambroxol ameliorates endotracheal tube-associated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in a rat model. *Pathology-Research and Practice*. 2015;211(12):982-8.

Li X, Zhao Y, Huang X, Yu C, Yang Y, Sun S. Ambroxol Hydrochloride Combined with Fluconazole Reverses the Resistance of *Candida albicans* to Fluconazole. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2017;7:124.

7. TABELA

Tabela 1 – Valores de mediana, mínimo e máximo do percentual de células bacterianas viáveis após 7 dias de contato com as pastas

	CHP	AMB	NAC	Controle
% Células viáveis	81,79 ^{ac} (23,33 – 99,42)	20,05 ^b (0 – 94,35)	59,74 ^{ab} (2,76 – 98,19)	93,31 ^c (76,53 – 99,87)

Diferentes letras minúsculas sobrescritas indicam diferença estatística significativa ($P < 0.05$)

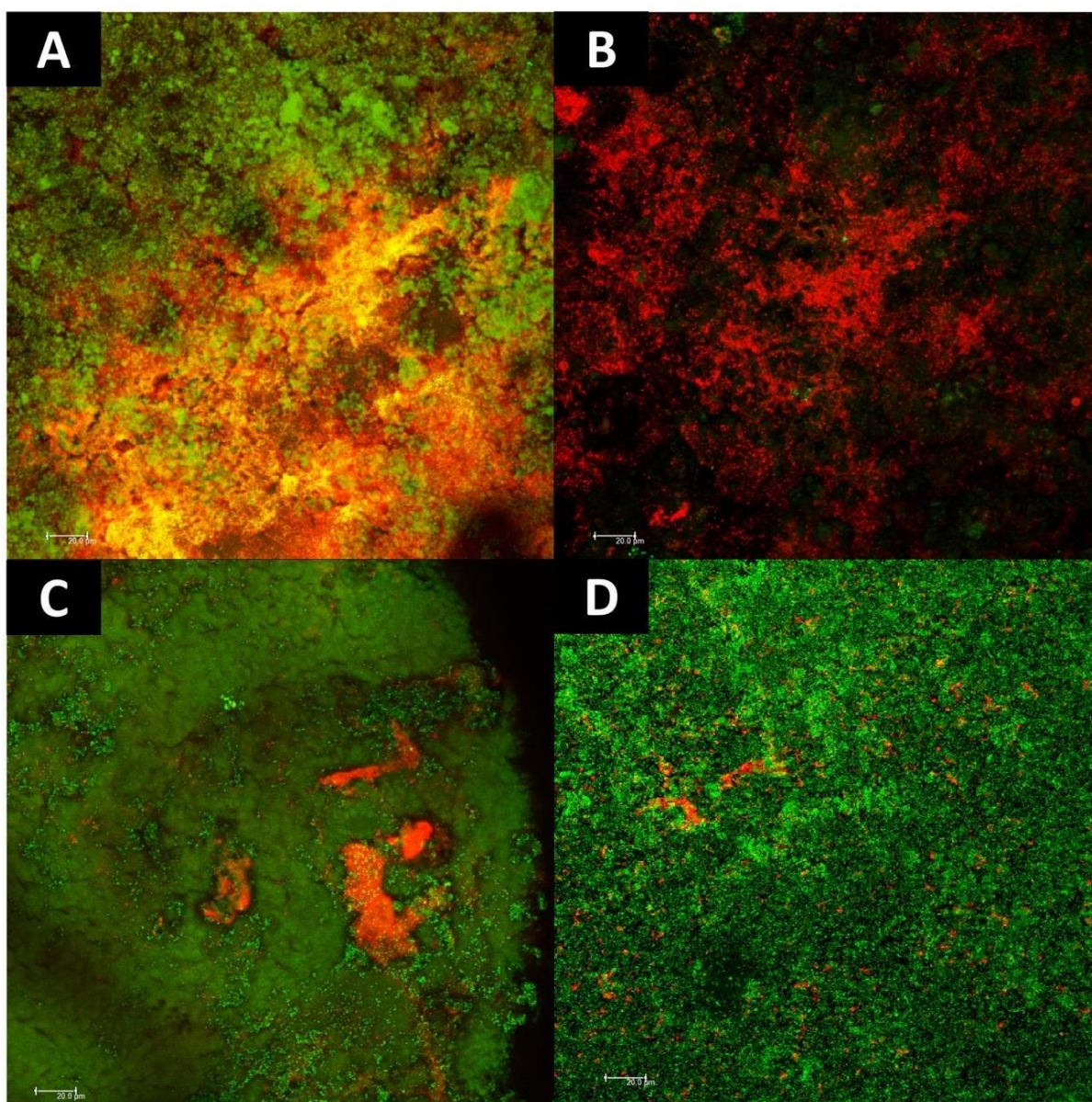
8. FIGURA

Figura 1 – Imagens de microscopia confocal de varredura a laser dos grupos testados. A – N-Acetilcisteína; B- Cloridrato de Ambroxol, C- Hidróxido de Cálcio; D- Controle