

Manoel Eduardo de Lima Machado

Professor Livre Docente em Endodontia pela FOU SP



Arlindo Di Spagna Souza

Professor Doutor em Endodontia pela FOU SP e Professor Titular da Disciplina de Endodontia da Unicastelo



Eluise Cristina de Rezende

Especialista em Endodontia pela ABO-Ponta Grossa-Pre Mestre em Endodontia pelo CPO São Leopoldo Mandic

Elizabeth Brasil dos Santos

Professora Doutora em Microbiologia pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba/Unicamp e Professora Adjunto do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa

Evaluación in vitro de la actividad antibacteriana del Paramonoclorofenol Alcanforado, Clorhexidina al 2% y Extracto de Própolis al 50% sobre tres bacterias encontradas en el interior del canal radicular.

ABSTRACT

Several studies evaluate the antimicrobial activity of drugs used as intracanal dressing. The effective antimicrobial action of paramonoclorophenol and chlorexidine had already been proved, although the use of paramonoclorophenol in Endodontics is avoided because of its high citotoxicity. Substances such as propolis may be an excellent alternative medication of natural origin, although yet not properly explored, and it is used empiricly. The aim of this study was to evaluate the antibacterial activity of camphorated paramonoclorophenol, 2% chlorexidine and propolis extract against Enterococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus. Bacterial suspensions containing 5×10^8 cels/mL were homogeneized and diluted up to 10^{-4} . One mililiter of each sample was transferred to glass tubes containing 0.1 mL of the test substances. These solutions were homogeneized and maintained at room temperature for 30 min. After this period, aliquots of 0.1 mL were plated on BHI and nutrient agar and incubated in 37°C for 24h. After this incubation period, the number of CFU/mL was determined. The results showed that Paramonoclorophenol and Chlorexidine significantly reduced the number of CFU/mL of the three bacterial samples and Propolis

was efficient against S. aureus but not against E. faecalis and P. aeruginosa.

KEYWORDS:

Camphorated paramonoclorophenol, Chlorexidine, Propolis, Intracanal dressing, Bacteria.

RESUMEN

Varios estudios han validado las propiedades antimicrobianas de sustancias usadas como medicación intracanal. Del paramonoclorofenol y la clorhexidina ya se han comprobado su efectiva acción antimicrobiana, sin embargo, el uso del paramonoclorofenol ha sido limitado en Endodoncia debido a su toxicidad. Sustancias de origen natural como el Própolis, han sido poco exploradas por la ciencia, siendo utilizada la mayoría de las veces en forma empírica. De este modo, el objetivo de este trabajo fue evaluar la acción del Paramonoclorofenol Alcanforado, de la Clorhexidina al 2% y del Extracto de Própolis al 50% sobre el Enterococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa e Staphylococcus aureus. El experimento consistió en estandarizar las suspensiones hasta obtener 5×10^8 células/mL, a partir de la suspensión pura. Diluciones decimales de hasta 10^{-4} y 1mL de cada muestra fueron transferidas

a tubos de ensayo donde se agregó 0,1mL de Paramonoclorofenol Alcanforado, solución de Clorhexidina al 2% y extracto de Própolis al 50%. Las soluciones fueron dejadas en reposo por 30 minutos, después de este período alíquotas de 0,1mL fueron quintuplicadas y sembradas en agar BHI y en agar nutriente; e incubadas a 37°C por 24 horas. A continuación, se determinó el número de UFC/mL. Los resultados demostraron que el Paramonoclorofenol Alcanforado y la Solución de Clorhexidina al 2% poseen acción antibacteriana y que el extracto de Própolis al 50% posee actividad antibacteriana sobre S. aureus, pero no posee sobre E. faecalis y P. aeruginosa.

PALABRAS CLAVES:

Própolis. Clorhexidina. Paramonoclorofenol Alcanforado. Medicación intracanal. Bacterias.

INTRODUCCIÓN

El proceso de desinfección del sistema de canales radiculares ha sido por mucho tiempo tema de estudio en Endodoncia. La potencialización de las infecciones de los canales radiculares y de la región periapical, está normalmente asociada al predominio de bacterias anaerobias y aerobias facultativas. El conocimiento de los microorganismos

encontrados con más frecuencia al interior de los canales radiculares infectados representa un factor decisivo para la elección de un antimicrobiano eficaz.

El control antimicrobiano del sistema de canales radiculares es realizado primordialmente por la preparación químico-mecánica, pero en algunos casos existe la necesidad de medicación intracanal como medida para potenciar el proceso de desinfección (CHONG & PITT FORD, 1992; SOARES et al., 2004).

Varios autores (AYHAN et al., 1999; FERGUSON et al., 2002; FERREIRA et al., 2002; SILVA et al., 2004) han evaluado las propiedades antimicrobianas de sustancias usadas como medicación intracanal. En el caso del paramonoclorofenol, ya se ha podido comprobar la efectiva acción antimicrobiana (BARBOSA et al., 1997; Ayhan et al., 1999; Amorim, 2004), su asociación con el alcanfor, además, de actuar como vehículo, propicia un aumento del potencial germicida de la mezcla, y disminuye también su potencial irritativo. Es utilizado en varias concentraciones y también combinado con otras sustancias, como es el caso del hidróxido de calcio, con el objeto de aumentar el espectro antimicrobiano de la pasta (GOMES et al., 2002; FERGUSON et al., 2002); también ha sido asociado a la pasta Guedes (GUEDES PINTO et al., 1981), muy utilizada en dientes temporales.

La clorhexidina, actualmente utilizada, ha mostrado ser eficaz como agente antimicrobiano (SHAFER & BOSSMANN, 2005; Tanomaru et al., 2005; ONÇAÄG et al., 2006), presentando un amplio espectro de acción, posee acción sobre bacterias aerobias, anaerobias estrictas, anaerobias facultativas, gram-positivas y negativas, y también sobre hongos y levaduras (FERGUSSON, 2002). Presenta relativa ausencia de toxicidad (KALIL, et al., 2004) y actúa como agente bacteriostático o bactericida de acuerdo a la concentración en que sea utilizada.

Una sustancia que presenta actividad antimicrobiana es el própolis (GEBARA et al., 2002; VARGAS et al., 2004), y que, a pesar del poco estudio en el área odontológica,

demuestra ser una alternativa como medicación de origen natural. El própolis es extraído por las abejas desde ciertas flores, hojas y corteza de árboles; después de recolectar esta resina, las abejas la mastican, enriqueciéndola con los componentes enzimáticos existentes en su saliva. Es utilizada desde la época anterior a Egipto Antiguo debido a sus propiedades medicinales, sin embargo esas propiedades, la composición y variación de acuerdo a la región de donde es extraída, así como sus indicaciones terapéuticas no han sido bien esclarecidas, siendo utilizada de manera empírica.

De esta manera ha aumentando el interés por esta sustancia utilizada desde largo tiempo por la medicina natural, y que de a poco va ganando espacio entre las alternativas ya consagradas en el tratamiento con antimicrobianos.

Por esta razón, el objeto de este trabajo es evaluar la acción del Extracto de Própolis al 50% contra bacterias comúnmente encontradas al interior del sistema de canales radiculares comparándola con sustancias ya conocidas por su efectiva acción antimicrobiana, como es el caso del Paramonoclorofenol Alcanforado y la Solución de de Clorhexidina al 2%.

PROPÓSITO

El presente trabajo tiene como objetivo, evaluar in vitro por el método de la dilución en cultivo, la actividad antibacteriana del Paramonoclorofenol Alcanforado, la Solución de Clorhexidina al 2% y el Extracto de Própolis al 50% frente al *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Las suspensiones bacterianas utilizadas en el experimento fueron realizadas transfiriéndose, con ayuda de pinzas; las muestras de microorganismos cultivados en agar nutriente y BHI se llevaron a un tubo de ensayo con 5mL de solución fisiológica esterilizada. Las suspensiones puras fueron

estandarizadas para que presentasen cerca de 5×10^8 células/mL. La estandarización fue hecha durante lectura en espectrofotómetro, que registra de forma aproximada la cantidad de células bacterianas por mL. (DO=580; absorbancia presentes en los tubos. Luego fueron realizadas las diluciones decimales de las suspensiones puras, transfiriéndose con ayuda de una pipeta 1 mL de suspensión pura hacia un tubo que contenía 9 mL de solución fisiológica estéril; este tubo corresponde a la dilución 10^{-1} , de esta primera dilución se transfirió 1 mL para otro tubo con 9 mL de solución fisiológica estéril, que sería el tubo referente a la dilución 10^{-2} y así sucesivamente hasta obtener la dilución 10^{-4} . 1mL de cada muestra bacteriana diluida y también, de las suspensiones puras fueron transferidos para tubos de ensayo donde se agregaron 0,1mL de PMCFA, de Solución de Clorhexidina a 2% y de Extracto de Própolis al 50%. 45 tubos en total fueron homogeneizados en agitador de tubos y dejados en reposo a temperatura ambiente por 30 minutos. Después de este período alíquotas de 0,1mL fueron sembradas, en quintuplicado, en agar BHI y agar nutriente, formando un total de 225 placas que fueron incubadas a 37°C por 24h. Después de este período de incubación, se realizó el conteo del número de UFC/mL de cada bacteria frente a cada una de las tres medicaciones.

RESULTADOS

Los resultados referentes a la utilización del PMCFA, la Solución de Clorhexidina a 2% y del extracto de Própolis al 50% frente *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* están ilustrados en la TABLA 1.

Tabla 1

| | E. faecalis | P. aeruginosa | S. aureus |
|--------------------------------|-------------|---------------|-----------|
| PMCFA | 4 | 2 | 0 |
| Solución de Clorhexidina al 2% | 0 | 28 | 0 |
| Extracto de Própolis al 50% | 1906 | 20620 | 8 |

TABLA 1. Medidas de los valores expresados en UFC/mL encontrados, contra las tres bacterias por la acción de las tres medicaciones.

Los valores obtenidos contra las tres bacterias frente al PMCFA, muestran su efectiva acción antibacteriana. El crecimiento bacteriano que ocurre utilizando esta medicación es apenas 1 de las 25 placas con *E. faecalis*, así como en 1 placa de las 25 con *P. Aeruginosa*. Este pequeño crecimiento ocurrido no indica que esta medicación no actúa sobre el *E. faecalis* o sobre la *P. aeruginosa*. El PMCFA inhibe totalmente el crecimiento en las 25 placas de *S. aureus*.

Los valores obtenidos contra las tres bacterias por la acción de la Solución de Clorhexidina al 2%, muestran que esta sustancia fue bactericida contra *E. faecalis* y el *S. aureus*, inhibiendo el crecimiento en las 50 placas referentes a las dos bacterias. Hubo crecimiento en las 5 placas donde la medicación fue utilizada sobre *Pseudomonas aeruginosa* en suspensión pura, lo que no ocurrió en ninguna de las 20 placas donde fueron realizadas las diluciones de suspensión bacteriana. Este crecimiento de *P. aeruginosa* encontrado en las placas no indica que la Solución de Clorhexidina al 2% no tenga acción antibacteriana frente a esta bacteria.

Un pequeño crecimiento bacteriano ocurrió cuando fue utilizado el Extracto de Própolis al 50% en 4 de las 5 placas de *S. aureus* en suspensión pura, lo que no aconteció en ninguna de las placas referentes a sus diluciones. Hubo crecimiento bacteriano en las placas correspondientes a la suspensión pura de *E. faecalis*, así como en las referentes a las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} , no ocurriendo crecimiento en las placas de las diluciones 10^{-3} e 10^{-4} . El Extracto de Própolis al 50% no inhibió el crecimiento de *P. aeruginosa*, siendo que en las placas referentes a la acción de esa sustancia en suspensión pura no hubo posibilidad de hacer el conteo de UFC/mL, debido al alto número de colonias formadas. El conteo fue realizado a partir de la dilución 10^{-1} , habiendo crecimiento en todas las placas hasta la dilución 10^{-3} . En las

placas correspondientes a la dilución 10^{-4} no hubo crecimiento bacteriano.

DISCUSIÓN

En el siglo pasado ya se hablaba de la infección de los canales radiculares y se atribuía a la presencia bacteriana como principal factor etiológico de los problemas endodónticos. Algunos de estos microorganismos persisten en el canal radicular después de la instrumentación, lo que hace necesaria la utilización de medicación intracanal para que haya descontaminación (CHONG & PITT FORD, 1992; SOARES et al., 2004).

Existe una tendencia mundial actual a buscar en la naturaleza, productos con finalidades terapéuticas, sin embargo poquísimas de esas sustancias tienen en su composición, propiedades e indicaciones terapéuticas científicamente comprobadas, siendo utilizadas de manera empírica, difundida por curanderos que lo han recibido de generación en generación.

En virtud de esto, el objetivo de este trabajo fue analizar in vitro la actividad antibacteriana, del Extracto Alcohólico de Própolis al 50%, de la Solución de Clorhexidina al 2% y del Paramonoclorofenol Alcanforado verificando su eficacia frente a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*, que son bacterias asociadas frecuentemente a procesos patológicos de origen endodóntico.

El primer grupo a ser estudiado fue el Paramonoclorofenol Alcanforado, que dentro de los antisépticos empleados como medicación intracanal en canales radiculares es un enérgico agente antimicrobiano que fue introducido por Walkhoff y utilizado por más de 70 años.

Experimentos realizados han mostrado ser eficaz como agente bactericida (ORSTRAVIK & HAAPASALO, 1990; OHARA et al., 1993; AYHAN et al., 1999).

Respecto al segundo grupo, la Solución de Clorhexidina al 2%, es una sustancia que presenta un amplio espectro de acción; algunos trabajos obtuvieron mejores

resultados de la clorhexidina cuando fue comparada con el hidróxido de calcio como medicación intracanal (Shafer & BOSSMANN, 2005; Onçaäg et al., 2006).

Los resultados de la capacidad antibacteriana obtenidos con la Solución de Clorhexidina al 2% confirmaron su efectiva acción antibacteriana, lo que ya había sido afirmado por otros autores (FERREIRA et al., 2002; TANOMARU et al., 2005; ONÇAÄG et al., 2006).

El tercer grupo del Extracto de Própolis al 50%, una sustancia de composición compleja (Franco et al., 1986) que ha sido indicada en tratamiento de diversos estados patológicos en Medicina y más recientemente en Odontología, debido a sus propiedades antimicrobianas, antifúngicas, analgésicas, antioxidantes, antiinflamatorias, bactericidas, bacteriostáticas, antiviral, inmunorreguladora, inmunoestimuladora, cicatrizantes y de incremento de la respuesta inmune local, antitumoral, como colector de radicales libres, por su evidente actuación positiva en la reorganización de tejidos en superficie, entre otras (Cunha et al., 1997; Manara et al., 1999; De Castro, 2001).

En el presente estudio, la acción antimicrobiana del Extracto de Própolis al 50% no fue verificada sobre la *Pseudomonas aeruginosa*, resultados semejantes fueron encontrados en otros trabajos (Langoni et al., 1996; Vargas, et al., 2004). El *Enterococcus faecalis* también se mostró resistente al própolis; esta resistencia ya había sido observada, siendo observados como más resistentes que otros cocos (PANZERI et al., 1999). El própolis mostró acción inhibitoria sobre el *Staphylococcus aureus*, la acción antibacteriana del própolis sobre esta bacteria ya había sido relatada (FERNANDES JR et al., 1995; 1997; 2001).

El hecho de que el trabajo haya sido realizado in vitro utilizando la metodología de la dilución en cultivo, que permite el contacto directo entre las bacterias y la medicación, no nos permite correlacionar los resultados del experimento con la práctica clínica. Pues "in vivo" existen otros factores que deben ser considerados

como los tipos bacterianos encontrados y el sinergismo existente entre ellos, y también lo que se refiere a las interacciones de los microorganismos y de las medicaciones con el medio, en este sentido, se sabe que no todas las medicaciones actúan de la misma manera in vitro e in vivo, principalmente debido a la presencia de material orgánico.

Debe tenerse en cuenta durante el análisis de los resultados del Extracto de Própolis al 50% el período de tiempo que la sustancia se mantuvo en contacto con las bacterias, el número de la muestra, la concentración de las medicaciones y el origen del própolis utilizado, ya que está confirmada su variación de acuerdo a la región de donde es extraído (FERNANDES JR. et al., 2006). Tal vez si esas variables fuesen manejadas los resultados serían mejores, en lo que se refiere a reducción bacteriana con el uso de própolis.

Para que el própolis sea lanzado en Endodoncia, se necesita realizar investigaciones en el sentido de avalar la correlación existente entre las propiedades antimicrobianas del própolis y su composición química, así como su actividad terapéutica.

CONCLUSIÓN

El análisis de los resultados obtenidos en el presente trabajo permite concluir:

PMCA y la Solución de Clorhexidina al 2% poseen acción bactericida sobre las bacterias testeadas.

El Extracto de Própolis al 50% posee acción antibacteriana sobre el *Staphylococcus aureus*, pero no sobre el *Enterococcus faecalis* y la *Pseudomonas aeruginosa*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Amorim CVG, Aun CE, Mayer MPA. Susceptibilidade de alguns microorganismos orais frente a clorexidina e ao paramonoclorofenol. *Braz Oral Res.* 2004 jul-set;18(3): 242-46.
- 2-Ayhan, H, Sultan NI, Cirak M., et al. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. *Int Endod J.* mar. 1999; 32(2): 99-102.
- 3-Barbosa CAM et al. Evaluation of the antibacterial activities of calcium hydroxide, clorexidine and camphorated paramonochlorophenol as intracanal medicament. A clinical laboratory study. *J Endod.* 1997; 23 (5): 297-300.
- 4- Chong BS, Pitt Ford TR. The role of intracanal medication in root canal treatment. *Int Endod J.* 1992; 25: 97-106.
- 5- Cunha IBS, Bueno MIMS, Marcucci MC et al. Caracterização de própolis brasileiras por fluorescência de raios-X: evidência de contaminação por chumbo. *Revista Lecta, Bragança Paulista.* 1997; 15(1 / 2): 99-104.
- 6-De Castro SL. Própolis: biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. *ARBS Annu Rev Biomed Sci.* 2001; 3: 49-83.
- 7- Ferguson JW, Hatton JF, Gillespie J. Effectiveness of intracanal irrigants and medications against the yeast *Candida albicans*. *J Endod.* 2002 feb; 28(2): 68-71.
- 8- Fernandes JR. A, Sugizaki MF, Fogo ML, et al. In vitro activity of própolis against bacterial na yeast pathogens isolated from human infections. *J Venom Anim Toxins.* 1995; 1(2): 63-9.
- 9- Fernandes JR. A, Lopes CAM, Sforcin JM, et al. Population analysis of susceptibility to própolis in reference strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Venom Anim Toxins.* 1997; 3(2): 287-94.
- 10- Fernandes JR. A, Leomil L, Fernandes AAH, et al. The antibacterial activity of própolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees. *J Venom Anim Toxins.* 2001 dec; 7(2): 173-82.
- 11- Fernandes JR A, LOPES MMR, COLOMBARI V et al. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. *Cienc Rural* 2006 jan./fev, 36(1): 294-297.
- 12- Ferreira CM, Rosa OPS, Torres AS, et al. Atividade antimicrobiana de agentes antibacterianos utilizados em endodontia sobre bactérias anaeróbias estrictas. *Braz Dent J.* 2002; 13(2): 118-22.
- 13- Franco TT, Kurebayashi AK. Isolamento de princípios ativos da própolis por cromatografia em papel bidimensional e doseamento espectrofotométrico. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 1986; 46(1 / 2): 81-86.
- 14- Gebara ECE, Lima LA, Mayer MPA. Atividade antimicrobiana da própolis contra bactérias periodontogênicas. *Braz J Microbiol.* 2002 out-dez; 33 (4): 365-9.
- 15- Gomes BPFA. Ferraz CCR, Garrido FD et al. Microbial susceptibility to calcium hydroxide pastes and their vehicles. *J Endod.* 2002-nov; 28(11): 758-61.
- 16- Guedes-Pinto AC, Paiva JG, Bozzola JR. Tratamento endodôntico de dentes decíduos com polpa mortificada. *Rev Assoc Paul Cirur Dent.* 1981 mai-jun; 35(3): 240-5.
- 17- Kalil MV, Fidel RAS, Araújo HP, et al. Avaliação da citotoxicidade da solução aquosa de clorexidina a 0,5%. *J Bras Endod.* 2004 jan-mar;5(16): 33-7.
- 18- Langoni H, Domingues PF, Funari SRC, et al. Efeito antimicrobiano in vitro da própolis. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 1996; 48(2):277-9.
- 19- Manara LRB, Anconi SI, Gromatzky A, et al. Utilização da própolis em odontologia. *Rev Fob.* 1999 jul-dez; 7 (3 / 4): 15-20.
- 20- Ohara P, Torabinejad m, Kettering JD. Antibacterial effects of various endodontic medicaments on selected anaerobic bacteria. *J Endod.* 1993-oct; 19(10): 498-500.
- 21- Onçaãg O, Gogulu D, Uzel A. Efficacy of various intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis* in primary teeth: an in vivo study. *J Clin Pediatr Dent.* 2006; 30(3):233-7.
- 22- Orstravik D, Haapasalo M. Desinfection by endodontic irrigants and dressing of experimentally infected dental tubules. *Endod Dent Traumatol.* 1990; 6: 142-9.
- 23- Panzeri H, Pedrazzi V, Ogasawara MS, et al. Um dentifríco experimental contendo própolis: avaliações físicas, microbiológicas e clínicas. *Rev ABO nacional.* 1999 mar-fev; 7(1): 26-30.
- 24- Schafer E, Bossmann K. antimicrobial efficacy of clorexidine and two calcium hydroxide formulations against *Enterococcus faecalis* *J Endod.* 2005 jan; 31(1): 53-6.
- 25- Silva ARP, Pires MAV, Chavasco JK, et al. Atividade antimicrobiana de substâncias químicas no preparo do sistema de canais radiculares. *J Bras Endod.* 2004 jan-mar; 5(16): 40-3.
- 26- Soares JA, Leonardo MR, Silva LAB, Tanomaru Fº M, Ito IY. Influência do preparo biomecânico e da medicação intracanal na anti-sepsia dos canais radiculares. *Rev Bras Odontol.* 2004 abr-mai; 61(2): 96-99.
- 27- Tanomaru JMG, Rodrigues VMT, Tanomaru Filho M et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de soluções irrigadoras empregadas em endodontia. *Rev Paul Odontol.* 2005 jan-mar; 27(1):38-40.
- 28- Vargas AC, Loguercio AP, Witt NM, et al. Atividade antibacteriana in vitro de extrato alcoólico de própolis. *Ciênc Rural.* 2004 jan-fev; 34(1): 159-63.