

UNIVERSIDADE DE UBERABA
PAULA REZENDE BANDEIRA DE MELLO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS TIANFENICOL E AGENTES
ANTIMICROBIANOS SOBRE A VIABILIDADE E FORMAÇÃO DO
BIOFILME DE *Enterococcus faecalis* E *Candida albicans* *in vitro*.**

Uberaba, MG
2017

PAULA REZENDE BANDEIRA DE MELLO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS TIANFENICOL E AGENTES
ANTIMICROBIANOS SOBRE A VIABILIDADE E FORMAÇÃO DO
BIOFILME DE *Enterococcus faecalis* E *Candida albicans* *in vitro***

Dissertação apresentada para a Banca Examinadora para Defesa de Mestrado em Odontologia, área de concentração em Biopatologia da Universidade de Uberaba.

Orientadora: Profa. Dra. Ruchele Dias Nogueira Geraldo-Martins

Uberaba, MG

2017

DEDICATÓRIA

Em primeiro lugar, a Deus.

Aos meus pais queridos, José Bandeira de Mello, eterno exemplo de vida e à minha amada mãe, Zaida, sempre presente, carinhosa e disposta a cuidar de tudo e de todos na minha ausência.

A Luísa, minha filha amada, a quem dedico todo meu amor e esforço.

Ao meu grande amigo e irmão Rodrigo, que sempre me acolheu com tanto carinho e amor.

Aos meus queridos tios e grandes companheiros José Elias de Resende e Lucy, nessa longa jornada, que não pouparam esforços, amor e paciência.

A minha querida tia-mãe Ana Helena Jordão, que sempre me recebeu de braços abertos.

Aos meus amigos queridos que me incentivaram a seguir sempre em frente mesmo nas horas mais difíceis.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora Prof^a Dr^a. Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins por seu carinho, paciência e presença nessa jornada de aprendizado e conquistas.

Ao Prof^o Benito André Silveira Miranzi por toda atenção e colaboração no desenvolvimento desta pesquisa.

Muito Obrigada!

AGRADECIMENTOS

A Universidade de Uberaba, por meio do Reitor Prof. Marcelo Palmério.

A Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-graduação e Extensão por meio do Pró-Reitor Prof. Dr. André Luís Teixeira Fernandes.

Aos Professores do Mestrado pelo apoio e ensinamento.

Aos colegas do curso de Mestrado pela convivência e as experiências trocadas.

Àos queridos amigos Leonardo Gaia, Mariana Pacífico, Maiza Segatto e Michele Gomides por todo amor, companheirismo, paciência e dedicação.

A querida amiga Camilla Beatriz por estar presente em todos os momentos dessa longa jornada sempre com uma palavra amiga, uma mão estendida pronta a ajudar e muito amor e paciência.

Ao meu amigo, pai da minha filha e sempre companheiro nos momentos mais difíceis desse curso, Luciano Ildo Cunha Silva.

Ao meu eterno Mestre, Anderson Silva, que sempre me guiou pela Periodontia e através dela me trouxe para esse curso de mestrado, em busca de mais conhecimento.

Aos funcionários do laboratório pela colaboração nos procedimentos laboratoriais e momentos de confraternização.

A secretária do curso de pós-graduação e extensão Flávia Michele da Silva pela prontidão e eficiência em sempre atender com carinho e boa vontade.

A todos os funcionários da Universidade Uberaba, pelo trabalho executado.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que esta dissertação pudesse ser realizada.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

As infecções endodônticas representam uma importante e desafiadora manifestação dentária em que o tratamento químico e mecânico são cruciais para a eliminação microbiana e determinantes para o sucesso restaurador. Micro-organismos como *Enterococcus faecalis* (EF) e *Candida albicans* (CA), fazem parte das infecções secundárias ou persistentes do sistema de canais radiculares por sua sobrevivência mesmo após o tratamento endodôntico. A busca de antimicrobianos intracanais com baixa toxicidade e com boas propriedades antimicrobianas representam uma importante ferramenta para a eliminação destas espécies persistentes, principalmente se conseguirem desorganizar os biofilmes. Tianfenicol é um antibiótico pouco explorado e com baixa toxicidade e suas propriedades antimicrobianas precisam ser exploradas. Para tanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a viabilidade e a formação do biofilme de EF e CA *in vitro* em presença de fármacos já utilizados na prática clínica como: Clorexidina 2% (CHX), Extrato de Própolis 11% (Pro), Hidróxido de Cálcio 35% (HC) e Hipoclorito de sódio 2,5% (Hip) e comparar com o Tianfenicol (Tia). Um grupo com o inóculo microbiano sem a adição de substâncias químicas (Con) foi incluído para cada teste. Foram realizados ensaios de difusão em ágar com os antimicrobianos citados em concentrações fixas, os quais foram distribuídos em placa de ágar contendo o inóculo microbiano. A viabilidade celular foi mensurada pela contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) dos inóculos provenientes do contato em quatro tempos distintos: 15, 45 e 60 minutos e 24 horas. Os ensaios de biofilme foram realizados em placas de 96 poços de microtitulação onde os antimicrobianos foram aplicados e após 24 horas de contato, a biomassa foi corada e as densidades ópticas (DO) mensuradas em espectrofotômetro digital. Foram considerados significativamente diferentes os valores de $p < 0,05$. Os resultados de CA mostraram que CHX e Pro apresentaram maiores halos de inibição de crescimento (média=18,5 e 18,1 mm, respectivamente) seguido por Tia (média 12,1 mm) e Hip (média de 8,3 mm) sendo maiores estatisticamente do que o controle e HC ($p < 0,05$). CA não ficou viável após contato de 15 min com CHX e Hip. O Tia reduziu a população microbiana significativamente em todos os períodos analisados em comparação com o controle. A biomassa do biofilme de CA foi significativamente diminuída em presença de Tia, Hip e Pro. Os resultados dos ensaios com EF mostraram que Tia apresentou halo de inibição estatisticamente superior a todos os antimicrobianos testados ($p < 0,05$). O número de UFC de EF após contato com Tia foi estatisticamente superior ao obtido para Hip e CHX ($p < 0,05$), porém menor que o Con e foi gradativamente reduzindo com o tempo de contato. O biofilme de EF em contato com Tia apresentou menor média de DO seguidos por HC, Hip e

CHX, que foram significativamente menores que o Con. Os resultados permitiram concluir que Tia apresentou boas propriedades antimicrobianas contra CA e EF, especialmente se o contato for prolongado quando comparado com substâncias comumente utilizadas na prática clínica odontológica.

Palavras-Chave: Tianfenicol, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*

ABSTRACT

Endodontic infections represent an important and challenging dental manifestation in which chemical and mechanical treatment is crucial for microbial elimination and determinants of restorative success. Microorganisms such as *Enterococcus faecalis* (EF) and *Candida albicans* (CA) are part of secondary or persistent infections of the root canal system for their survival even after endodontic treatment. The search for intracanal antimicrobials with low toxicity and good antimicrobial properties represents an important tool for the elimination of these persistent species, especially if they can disorganize the biofilms. Thiamphenicol is a poorly exploited antibiotic with low toxicity and its antimicrobial properties need to be explored. The aim of the present study was to evaluate the feasibility and the biofilm formation of EF and CA in vitro in the presence of drugs already used in clinical practice such as Chlorhexidine 2% (CHX), Propolis Extract 11% (Pro), Hydroxide Calcium 35% (HC) and Sodium Hypochlorite 2.5% (Hip) compared to Thiamphenicol (Tia). A control group was utilized without chemicals substances (Con). Agar diffusion assays were performed with the antimicrobials mentioned in fixed concentrations, which were distributed in agar plate containing the microbial inoculum. Cell viability was measured by counting the number of colony forming units (CFU) of inoculum coming from contact at four distinct times: 15, 45, 60 minutes, and 24 hours. Biofilm assays were performed in 96-well microtiter plates. The antimicrobials were applied and after 24 hours of contact, the biomass was stained and the optical densities (OD) measured in a digital spectrophotometer. Values of $p < 0.05$ were considered significantly different. The CA results showed that CHX and Pro presented higher growth inhibition halos (mean = 18.5 and 18.1 mm, respectively) followed by Tia (mean 12.1 mm) and Hip (mean 8.3 mm) and were statistically higher than control and HC ($p < 0.05$). CA was not feasible after 15 min contact with CHX and Hip and Tia significantly reduced the microbial population in all analyzed periods compared to the control. The biomass of the CA biofilm was significantly decreased in the presence of Tia, Hip and Pro. The results of the EF assays showed that Tia had a statistically superior inhibition halo to all antimicrobials tested ($p < 0.05$). The number of CFU of EF after contact with Tia was statistically higher than that obtained for Hip and CHX ($p < 0.05$), but smaller than Con and was gradually reducing with contact time. The biofilm of EF in contact with Tia had a lower mean OD. HC, Hip and CHX presented values lower than the Con. The results showed that Tia presented good antimicrobial properties against CA and EF, especially if the contact is prolonged when compared to substances commonly used in the clinical practice.

Keywords: Thiamphenicol, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Culturas microbianas de 24 horas de incubação20
- Figura 2.** Média dos halos de inibição do crescimento microbiano de *Candida albicans* (em milímetros) em presença de Hip (Hipoclorito), Pro (Própolis), Tia (Tianfenicol), CHX (Clorexidina), HC (Hidróxido de cálcio) e Con (Controle – Água estéril).....23
- Figura 3.** Médias de DO (Densidade Óptica) e desvio Padrão obtidas dos biofilmes de CA (*Candida albicans*) formados após contato das substâncias Hip (Hipoclorito), Pro (Própolis), Tia (Tianfenicol), CHX (Clorexidina), HC (Hidróxido de cálcio) e Con (Controle – Água estéril).....25
- Figura 4.** Média dos halos de inibição do crescimento microbiano de *Enterococcus faecalis* (em milímetros) em presença de Hip (Hipoclorito), Pro (Própolis), Tia (Tianfenicol), CHX (Clorexidina), HC (Hidróxido de cálcio) e Con (Controle – Água estéril).....26
- Figura 5.** Médias de DO (Densidade Óptica) obtidas dos biofilmes de *Enterococcus faecalis* formados após contato das substâncias Hip (Hipoclorito), Pro (Própolis), Tia (Tianfenicol), CHX(Clorexidina), HC (Hidróxido de cálcio) e Con (Controle – Água estéril).....28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Substâncias usadas, marcas comerciais e procedência	19
Tabela 2. Cepas usadas, registro de ATCC e os meios de cultura empregados.	20
Tabela 3. Média do número de UFC de <i>Candida albicans</i> em presença de Hip (Hipoclorito), Pro (Própolis), Tia (Tianfenicol), CHX (Clorexidina), HC (Hidróxido de cálcio) e Con (Controle – Água estéril) de acordo com o tempo de contato.....	24
Tabela 4. Média do número de UFC de <i>Enterococcus faecalis</i> em presença de Hip (Hipoclorito), Pro (Própolis), Tia (Tianfenicol), CHX (Clorexidina), HC (Hidróxido de cálcio) e Con (Controle – Água estéril) de acordo com o tempo de contato.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATCC - American Type Culture Collection

BHI - Brian Heart Infusion

CA - *Candida albicans*

Con - Controle

CHX - Clorexidina

DO - Densidade óptica

DP - Desvio padrão

°C - Grau Celsius.

EF- *Enterococcus faecalis*

IE - Infecção endodôntica

h - Hora

Hip - Hipoclorito de sódio

min - Minuto

mL - Mililitro

µL - Microlitro

mm - milímetro

Nm - Nanômetro

Pro - Própolis

PMCC - Paramonoclorofenol

Tia - Tianfenicol

UFC - Unidade formadora de colônia

HC – hidróxido de cálcio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. HIPÓTESE	17
3. OBJETIVOS	18
3.1. GERAL	18
3.1.1 ESPECÍFICOS	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1. Antimicrobianos testados e delineamento do estudo	19
4.2. Seleção das cepas	19
4.3. Parte I - Teste de difusão em disco	20
4.4. Parte II: Viabilidade celular após contato em diversos tempos	21
4.5. Parte III – Formação de biofilme microbiano <i>in vitro</i>	21
4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	22
5. RESULTADOS	23
5.1. Halos de inibição do crescimento de <i>Candida albicans</i> em presença das substâncias testadas.	23
5.2. Viabilidade do crescimento de <i>Candida albicans</i> em tempos de contato diferentes com as substâncias testadas.	24
5.3. Desenvolvimento do biofilme de <i>Candida albicans</i> em contato com as substâncias testadas.	25
5.4. Halos de inibição do crescimento de <i>Enterococcus faecalis</i> em presença das substâncias testadas.	26
5.5. Viabilidade do crescimento de <i>Enterococcus faecalis</i> em tempos de contato diferentes com as substâncias testadas.	27
5.6. Desenvolvimento do biofilme de <i>Enterococcus faecalis</i> em contato com as substâncias testadas.	27
6. DISCUSSÃO	29
7. CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1. INTRODUÇÃO

A infecção endodôntica (IE) é caracterizada pela invasão de diversos tipos microbianos no sistema de canais radiculares. Estes micro-organismos invasores podem se organizar como biofilme, que pode ser definido como um consórcio microbiano em que comunidades dinâmicas de células sésseis interagentes estão aderidas a um substrato sólido e embebidas em uma matriz própria de substâncias poliméricas extracelulares em ambiente aquático (Costerton *et al.*, 1994; Costerton *et al.*, 1999; Narayanan & Vaishnavi, 2010). O biofilme é uma forma de crescimento microbiano sendo que os micro-organismos sobrevivem em condições ambientais e nutricionais desfavoráveis e o canal radicular acaba favorecendo sua formação (Shokraneh *et al.*, 2014).

A microbiota endodôntica é muito diversa e tem uma composição diferente quando se compara as infecções primárias e as secundárias, principalmente nos casos de retratamento devido às infecções persistentes. Nas infecções primárias, observam-se micro-organismos gram positivos e negativos, anaeróbios obrigatórios, capazes de fermentar aminoácidos e peptídeos. Predominam as espécies de *Prevotella* (*P. intermedia* e *P. nigrescens*) e *Porphyromonas* (*P. endodontalis* e *gingivalis*), seguidas de *Fusobacterium nucleatum*, *Veillonella parvula* e *Eubacterium*. Já em dentes indicados para retratamento, observa-se alta prevalência de gram positivas anaeróbias facultativas como *Enterococcus* e *Streptococcus* seguidos de *Lactobacillus*, *Agregobacter*, *Candida*, *Eubacterium*, *Alactolyticus*, *Propionibacterium propionicum*, *Dialister pneumosintes* e *Filifactoralocis* (Rocas *et al.*, 2004).

Dentre estes micro-organismos, destacam-se *Enterococcus faecalis* (EF) (Molander *et al.*, 1998) e *Candida albicans* (CA) (Love, 2001; Rocas *et al.*, 2008) por apresentarem capacidade de penetrar nos túbulos dentinários de canais instrumentados e retratados (Valera *et al.*, 2013).

Enterococcus faecalis é uma bactéria gram positiva anaeróbia facultativa, podendo estar isolada, aos pares ou em cadeias curtas (Só *et al.*, 2011). É predominantemente intestinal, mas pode ser encontrada na cavidade oral e no sulco gengival formando biofilmes (Figdor *et al.*, 2003; Gurgel-filho, 2007). Esta capacidade de EF de infectar o canal radicular está associada com variados fatores de virulência que possui, tais como capacidade de penetração profunda nos túbulos dentinários facilitada pelo seu tamanho diminuto (Al-Nazhan *et al.*, 2014). Adere-se facilmente em superfícies como o colágeno da dentina, possui resistência aos antimicrobianos (Costerton *et al.*, 1994), capacidade de sobreviver em situações de baixo pH,

34 alta salinidade e temperatura (Weckwerth *et al.*, 2013). É ainda capaz de suportar longos
35 períodos de escassez de nutrientes (Siren *et al.*, 1997) e utilizar fluidos teciduais como fontes
36 nutricionais provenientes do ligamento periodontal (Narayanan & Vaishnavi, 2010; Valera *et*
37 *al.*, 2013). Pode sobreviver na presença de medicações como hidróxido de cálcio e soluções
38 irrigantes como o hipoclorito de sódio (Love, 2001; Só *et al.*, 2011, Mozayeni *et al.*, 2014). EF
39 é um micro-organismo que está presente em apenas 5% dos canais não tratados
40 endodonticamente (Portenier *et al.*, 2003; Peciuliene *et al.*, 2008), enquanto que na maioria
41 dos casos de insucesso do tratamento endodôntico esta espécie é predominante.

42 Uma hipótese pode justificar a presença desta espécie microbiana nos canais
43 radiculares de quadros de infecções persistentes. Pode ocorrer uma contaminação de canais
44 deixados abertos para drenagem da infecção e tratamento de sintomas (Siren *et al.*, 1997;
45 Rocas *et al.*, 2004), o que pode transformar uma infecção simples em uma mais resistente à
46 medicação intracanal. Desta maneira, acredita-se que quanto mais rápido for obturado o canal
47 radicular, melhor será o controle dos micro-organismos dentro dele (Trope *et al.*, 1999).

48 Outra espécie microbiana muito encontrada em canais de dentes com falha no
49 tratamento endodôntico ou infecção persistente é a CA (Baumgartner *et al.*, 2000), que é uma
50 espécie de fungo leveduriforme. Possui atividade colagenolítica e usa a dentina como fonte de
51 nutrição (Shaik *et al.*, 2014), é resistente à ação antimicrobiana de algumas substâncias
52 intracanaís como o hidróxido de cálcio (Waltimo *et al.*, 1999).

53 A terapia pulpar envolve a eliminação desses micro-organismos presentes no canal,
54 completa remoção do tecido pulpar infectado pelo preparo mecânico, irrigação do canal,
55 controle microbiano, aplicação de medicamentos intracanaís e preenchimento completo
56 desses canais com materiais obturadores apropriados (Mozayeni *et al.*, 2014). Micro-
57 organismos viáveis remanescentes após preparo do canal radicular e desinfecção, contribuem
58 significativamente para a falha da terapia endodôntica (Rosenthal *et al.*, 2004; Melker *et al.*,
59 2006).

60 Há evidências de que istmos e canais acessórios desses sistemas de canais radiculares
61 permanecem intocados mesmo após instrumentação mecânica, daí a importância dos
62 irrigantes químicos e medicações intracanaís que servem de coadjuvantes na erradicação de
63 tecidos infectados (Nair *et al.*, 1999). As medicações intracanaís devem apresentar efetiva
64 atividade antimicrobiana, capacidade de dissolver tecido orgânico e não causar danos aos
65 tecidos perirradiculares, auxiliando assim, no combate à infecção em locais de difícil acesso
66 mecânico pelos instrumentos endodônticos (Siqueira & Lopes, 1999).

67 Estudos realizados para comparar a atividade antimicrobiana entre medicamentos e
68 soluções irrigadoras buscam melhores resultados para o sucesso da terapia endodôntica falha.
69 Existem várias formulações intracanalais que são largamente utilizadas na prática odontológica
70 como hidróxido de cálcio, clorexidina, hipoclorito de sódio e antibióticos, dentre outros. A
71 medicação intracanal mais conhecida e difundida é a pasta de hidróxido de cálcio, que possui
72 boa atividade antimicrobiana e baixa solubilidade em água (Weckwerth *et al.*, 2013). Apesar
73 de empregado como medicação intracanal por ser capaz de alcalinizar o meio e desfavorecer a
74 sobrevivência de várias espécies microbianas (Bhandari *et al.*, 2014), há algumas evidências
75 que mostraram sua ineficiência contra EF, por se manter sobrevivente nos túbulos dentinários
76 (Mozayeni *et al.*, 2014).

77 O hipoclorito de sódio, que pode ser encontrado nas concentrações de 0,5% a 5,25%, é
78 indicado como solução irrigadora durante o preparo radicular, e age interrompendo várias
79 funções bacterianas e causando sua morte. Porém, em altas concentrações, é muito tóxico para
80 os tecidos perirradiculares (Shokraneh *et al.*, 2014). A clorexidina a 2% também é empregada
81 como solução irrigadora, principalmente em casos onde o hipoclorito de sódio não pode ser
82 aplicado. Apresenta alta atividade antimicrobiana e biocompatibilidade com os tecidos
83 perirradiculares (Mohammadi & Abbott, 2009; Gomes *et al.*, 2013), sendo eficaz na
84 eliminação de EF (Mozayeni *et al.*, 2014).

85 Estudos recentes baseados nas propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias,
86 antioxidantes e antitumorais do extrato de própolis propõem sua utilização no tratamento
87 endodôntico, devido à presença de compostos como flavonoides e ácidos fenólicos (Araújo &
88 Marcucci, 2011; Bhandari *et al.*, 2014). Entretanto, suas propriedades reais e aplicação ainda
89 vêm sendo cientificamente testadas.

90 Além dessas soluções intracanalais clássicas, os antibióticos também podem ser
91 empregados como coadjuvantes na terapia endodôntica, mas seu uso deve estar reservado às
92 circunstâncias especiais como casos de lesão apical persistente, relato de dor pelo paciente e
93 casos de retratamento onde a terapia convencional não eliminou completamente os micro-
94 organismos. Os antibióticos normalmente utilizados na prática odontológica são:
95 metronidazol, ciprofloxacina e minociclina aplicados em forma de pasta tripla diretamente no
96 conduto radicular mostrando-se mais eficaz que suas administrações por via oral (Shaik *et al.*,
97 2014).

98 O tianfenicol é um antimicrobiano de largo espectro que age sobre bactérias gram
99 positivas, gram negativas e anaeróbias, com ação bacteriostática e bactericida muito usado no
100 tratamento de doenças sexualmente transmissíveis (Cattapan, 1995) e do trato respiratório

101 (Grassi *et al.*, 2002). É um derivado do Cloranfenicol, tendo sido obtido pela remoção do
102 grupo nitro pelo grupo metil sulfonil, possuindo um espectro antimicrobiano comparável à do
103 composto de origem (Drago *et al.*, 2001).

104 Sua formulação veio substituir o Cloranfenicol sintético, pois, causava anemia aplásica
105 em primatas (Kaufman *et al.*, 1996). É caracterizado por parâmetros farmacocinéticos
106 favoráveis (Drago *et al.*, 2000) e toxicidade reduzida (Turton *et al.*, 2000). A grande
107 vantagem nos testes recentes com tianfenicol estão na sua eficiente atividade no controle de
108 bactérias super-resistentes (Marquese *et al.*, 2002; Raymond *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2016)
109 especialmente quando combinado com o fluorfenicol (Wei *et al.*, 2016). A concentração
110 mínima inibitória para cepas de *Staphylococcus aureus* foi de 32 mg/L (Wei *et al.*, 2016).

111 Uma pasta endodôntica preparada com tetraciclina, tianfenicol e óxido de zinco
112 mostrou-se efetiva na formação de halos de inibição em teste de difusão em ágar de culturas
113 de *Bacillus cereus*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium nucleatum*,
114 *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis* e *Candida albicans* (Mattos *et al.*, 2008).

115 No entanto, há pouca informação disponível na literatura sobre a ação de tianfenicol
116 agindo no biofilme de CA e EF e o tempo necessário para que os micro-organismos fiquem
117 inviáveis.

118

119 2. HIPÓTESE

120 O Tianfenicol possui boas propriedades antimicrobianas que inviabilizam o
121 crescimento e a formação do biofilme de EF e CA e que são comparáveis aos fármacos
122 utilizados na prática clínica como clorexidina, hipoclorito de sódio, extrato de própolis e
123 hidróxido de cálcio.

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143 3. OBJETIVOS

144

145 3.1. GERAL

146 Os objetivos do presente estudo foram avaliar e comparar a eficácia de
147 antimicrobianos de uso odontológico como clorexidina 2%, hipoclorito de sódio 2,5%,
148 hidróxido de cálcio 35% (pasta Ultracal XS), extrato de própolis 11% e o tianfenicol no
149 crescimento *in vitro*, viabilidade celular e formação do biofilme de EF e CA.

150

151 3.1.1 ESPECÍFICOS

152 Avaliar o efeito antimicrobiano do tianfenicol, clorexidina, hipoclorito de sódio,
153 hidróxido de cálcio e extrato de própolis sobre EF e CA.

154 Verificar a viabilidade dos micro-organismos após diferentes tempos de contato com
155 os antimicrobianos testados.

156 Quantificar a biomassa de biofilme de EF e CA na presença dos antimicrobianos
157 mencionados e comparar resultados entre eles.

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170 **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

171

172 **4.1. Antimicrobianos testados e delineamento do estudo**

173 Para realização do presente estudo foram testadas várias substâncias (Tabela 1) a fim
 174 de avaliar sua efetividade no crescimento, viabilidade e capacidade de acumulação de
 175 *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* pelo teste de antibiograma (Parte I), pela análise da
 176 viabilidade celular após contato com as substâncias (Parte II) e o efeito no crescimento do
 177 biofilme em placas de micro titulação (Parte III). Água estéril foi utilizada como grupo
 178 controle (grupo Con).

179

180 **Tabela 1.** Substâncias usadas, concentrações, marcas comerciais e procedência:

Abreviatura/ Grupo	Substâncias	Concentrações	Nome comercial/Marca e Procedência
Hip	Hipoclorito de sódio	2,5%	Asfer, Campinas, SP.
Pro	Extrato de Própolis	11%	Appis flora, Ribeirão Preto, SP.
Tia	Tianfenicol	500mg/L	Glitisol® Zambom- Indianópolis, SP.
CHX	Clorexidina	2%	FGM; Joinville, SC.
HC	Hidróxido de cálcio	35%	Pasta Ultracal XS – Ultradent- Indaiatuba, SP.
Con	Controle - Água destilada estéril	-	-

181

182

183 **4.2. Seleção das cepas**

184 A Tabela 2 indica a cepa, seu registro de ATCC e os meios de cultura empregados para
 185 obtenção do inóculo para os testes que serão descritos a seguir:

186

187

188

189

190

191

192 **Tabela 2.** Cepas usadas, registro de ATCC e os meios de cultura empregados.

Micro-organismos	ATCC	Meios de cultura
<i>Candida albicans</i>	10231	BHI
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	BHI

193

194

195 **4.3. Parte I - Teste de difusão em disco**

196 Foi utilizada a Técnica de Bauer e Kirby (1996), em que foram inoculados 100µL de
 197 culturas microbianas de 24 horas de (DO 600 nm = 1,0 equivalendo 10^7 Unidades Formadoras
 198 de Colônias UFC/mL) mensuradas em Espectrofotômetro digital (ThermoScientific), em
 199 placas que continham 3 mm de BHI ágar (Figura 1). Discos de papel absorvente, secos e
 200 estéreis, medindo 11 mm de diâmetro, foram posicionados equidistantes nas placas com
 201 auxílio de uma pinça estéril, para onde foram transferidos 7 µL de cada substância
 202 antimicrobiana testada e água estéril como controle negativo.

203 As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Após essas
 204 24h, os halos de inibição foram mensurados e analisados Os testes foram realizados em vinte
 205 placas para cada micro-organismo.

206



207

208 **Figura 1.** Culturas microbianas de 24 horas de incubação

209

Fonte: Arquivo Pessoal

210

211

212 **4.4. Parte II - Viabilidade celular após contato em diversos tempos**

213 Dez microlitros de culturas microbianas de 24 horas de cada micro-organismo testado
214 (DO 600 nm = 1,0 equivalendo 10^7 Unidades Formadoras de Colônias UFC/mL) foram
215 inoculadas em tubos contendo 5 mL de caldo de BHI, sendo 10 tubos para cada substância
216 antimicrobiana testada. Cada tubo com a cultura microbiana recebeu 100 μ L de cada solução
217 antimicrobiana (clorexidina 2%, hipoclorito de sódio 2,5%, hidróxido de cálcio 35%, extrato
218 de própolis 11% e tianfenicol) e foram deixadas em contato por 15, 40, 60 minutos e 24 horas.
219 Em seguida, foram realizadas as inoculações de 20 μ L de cada tubo/grupo em placas. Após 24
220 horas de incubação a 37° C, a contagem das colônias e o número de UFC por mL foram feitos
221 com auxílio de uma lupa estereoscópica.
222

223 **4.5. Parte III - Formação de biofilme microbiano *in vitro*.**

224 Foram utilizadas amostras com dez repetições em placas estéreis de 96 poços de
225 microtitulação com fundo plano de poliestireno (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Os poços
226 receberam 50 μ L da cultura (DO=1), 1 mL do meio BHI e 20 μ L de cada substância estudada.
227 Após 24 horas de incubação a 37°C, os biofilmes foram avaliados e corados. Após remoção
228 das células planctônicas, os biofilmes formados nos poços das placas de microtitulação foram
229 fixados com 1 mL de solução de formaldeído a 10% e deixados *overnight* à temperatura
230 ambiente. O formaldeído foi removido e 1 mL de solução de 0,1% de cristal violeta foi
231 adicionado e as placas foram mantidas à temperatura ambiente durante 1h. A solução de
232 cristal violeta não aderida ao biofilme foi então lavada 2 vezes com água destilada. Após
233 lavagem e remoção da água, os poços receberam 1 mL de álcool absoluto solubilizando o
234 cristal aderido.

235 A determinação do crescimento bacteriano e a formação de biofilme foram avaliadas
236 através da leitura das absorbâncias de cada poço das placas de micro titulação a 490nm em
237 um Leitor de Elisa (Molecular Devices, Inc., Sunnyvale, CA).

242 **4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

243 Os valores de antibiograma e viabilidade celular foram submetidos aos testes
244 preliminares de normalidade de Lilliefors, resultando em distribuição normal. Para

245 comparação de mais de dois grupos utilizou-se o teste Anova com pós-teste de Bon Ferroni. O
246 nível α foi definido em 5%.

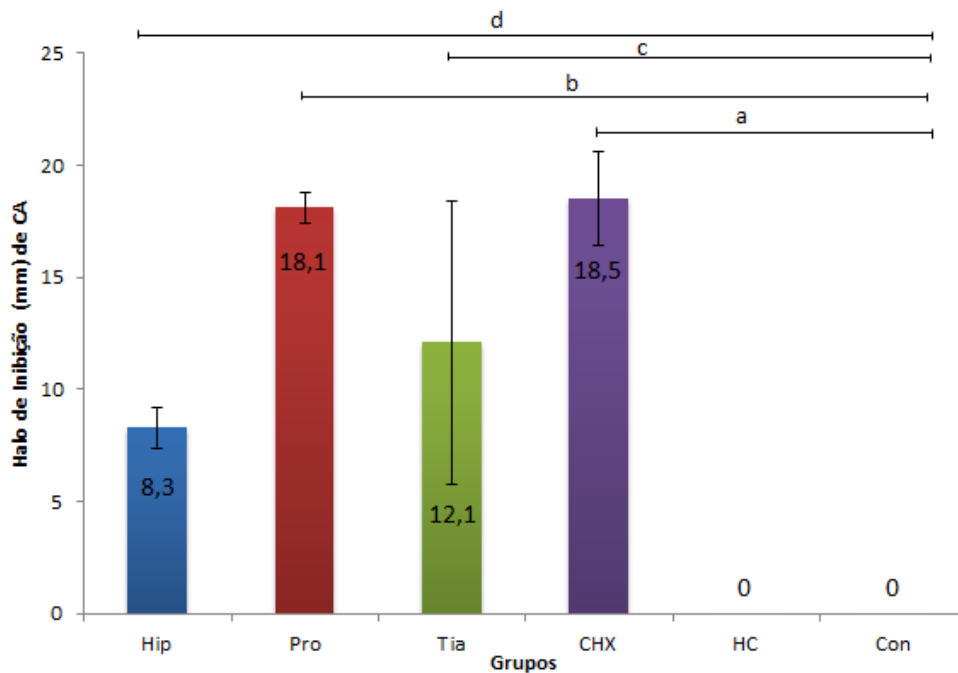
247

248

249 **5. RESULTADOS**

250 **5.1. Halos de inibição do crescimento de *Candida albicans* em presença das substâncias**
 251 **testadas.**

252 Os halos de inibição foram aferidos para todas as substâncias testadas clorexidina,
 253 hipoclorito de sódio, hidróxido de cálcio, extrato de própolis e tianfenicol e as médias destas
 254 mensurações foram calculadas (Figura 2). As melhores atividades antimicrobianas para CA
 255 foram consecutivamente de CHX, Pro, Tia, Hip. O hipoclorito apresentou halo de inibição
 256 menor ($p<0,05$) que Pro, Tia e CHX. Pro e CHX apresentaram halos de inibição semelhantes
 257 entre si ($p>0,05$), porém maiores que Tia e Hip. O tianfenicol apresentou um halo maior que
 258 Hip, entretanto, menor que Pro e CHX ($p<0,05$). Grupo controle (Con) e HC não
 259 apresentaram halos de inibição no crescimento de CA.



260

261 **Figura 2.** Média dos halos de inibição do crescimento microbiano de *Candida albicans* (em
 262 milímetros) em presença de Hip (Hipoclorito), Pro (Própolis), Tia (Tianfenicol), CHX
 263 (Clorexidina), HC (hidróxido de cálcio) e Con (Controle – Água estéril). Valores ^{a, b, c, d},
 264 $p<0,05$ (Anova).

265

266

267

5.2. Viabilidade do crescimento de *Candida albicans* em tempos de contato diferentes com as substâncias testadas.

As médias do número de UFC obtidas em placas após o contato com as substâncias clorexidina, hipoclorito de sódio, hidróxido de cálcio, extrato de própolis e tianfenicol estão na Tabela 3. Para CA, foi observada uma diminuição do número de UFC na presença de Hip que foi menor que o controle ($p < 0,05$). Além disso, quanto mais longo o contato com o Hip menor foi o número de UFC ($p < 0,05$).

O contato da CA com a CHX também reduziu as contagens à medida que o tempo de exposição aumentou ($p < 0,05$). Pro e HC, nos primeiros 15 e 40 minutos, reduziram as contagens em relação ao controle ($p < 0,05$), mas após 60 minutos e 24 horas, as contagens foram semelhantes e não diferiram do controle ($p > 0,05$). O Tia teve contagem inferior ao controle em todos os tempos de exposição ($p < 0,05$), porém, não diminuiu as contagens a medida que o tempo de exposição aumentou.

Tabela 3. Médias do número de UFC de *Candida albicans* em presença de Hip (Hipoclorito), Pro (Própolis), Tia (Tianfenicol), CHX (Clorexidina), HC (hidróxido de cálcio) e Con (Controle – Água estéril) de acordo com o tempo de contato.

Tempo de Exposição de CA com as substâncias				
Grupos	15'	40'	60'	24 H
Hip	492 ± 115	326 ± 189	84 ± 48	23 ± 16
CHX	158 ± 82	4 ± 7	0 ± 0	0 ± 0
Pro	472 ± 81	802 ± 216	1121 ± 428	1782 ± 532
HC	449 ± 91	542 ± 157	1357 ± 419	2937 ± 466
Tia	528 ± 89	455 ± 66	445 ± 106	525 ± 135
Con	1001 ± 112	1400 ± 34	1560 ± 34	2130 ± 16

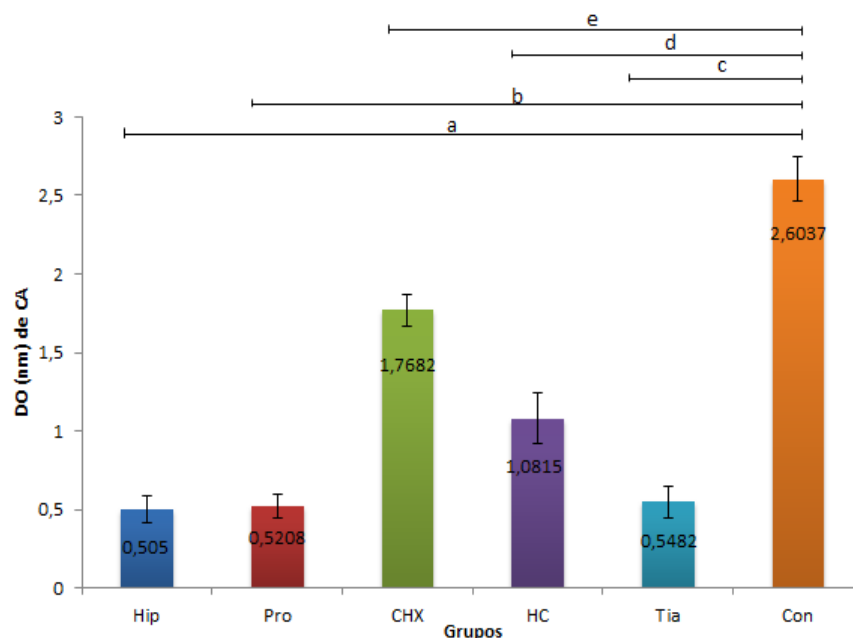
A análise comparativa entre as substâncias testadas mostrou que para todos os tempos, o número de UFC para os grupos que receberam a CHX (15', 40', 60' e 24 h) foi menor que as contagens obtidas para Hip ($p < 0,05$). Pro e HC tiveram respostas semelhantes quanto ao número de UFC ($p > 0,05$) em 15', mas diferiram após 40' de contato, pois as contagens na presença de Pro foram maiores ($p < 0,05$). O número de UFC dos grupos que receberam Hip foram menores e diferiram dos grupos que receberam HC e Pro após 40' de contato ($p < 0,05$).

292 O número de UFC dos grupos que recebeu Tia diferiu dos grupos que receberam Hip
 293 após 40' de contato, pois as contagens foram inferiores para o grupo Hip ($p < 0,05$). Todos os
 294 grupos que receberam CHX tiveram contagens inferiores aos que receberam Tia ($p < 0,05$). Os
 295 grupos que receberam Tia apresentaram menores contagens do que o grupo Pro após 40'
 296 ($p < 0,05$) e HC após 60' de contato ($p < 0,05$).

297

298 5.3. Desenvolvimento do biofilme de *Candida albicans* em contato com as substâncias 299 testadas.

300 As médias das densidades ópticas (DO) dos grupos que receberam as substâncias
 301 clorexidina, hipoclorito de sódio, hidróxido de cálcio, extrato de própolis e tianfenicol estão
 302 na figura 3. Quanto menor a DO, menor a formação e desenvolvimento do biofilme. Todos os
 303 grupos que receberam as substâncias testadas apresentaram médias de DO menores (Figura 3,
 304 Hip=0,50, Pro=0,52, CHX=1,76, HC=1,08, Tia=0,54) do que o grupo controle (média=2,60).
 305 Hip, Pro e Tia apresentaram DOs cerca de 5 vezes menores do que o grupo controle. Não
 306 houve diferenças entre as DOs de Hip, Pro e Tia ($p > 0,05$) porém, foram inferiores às DOs
 307 obtidas na presença de HC e CHX ($p < 0,05$).



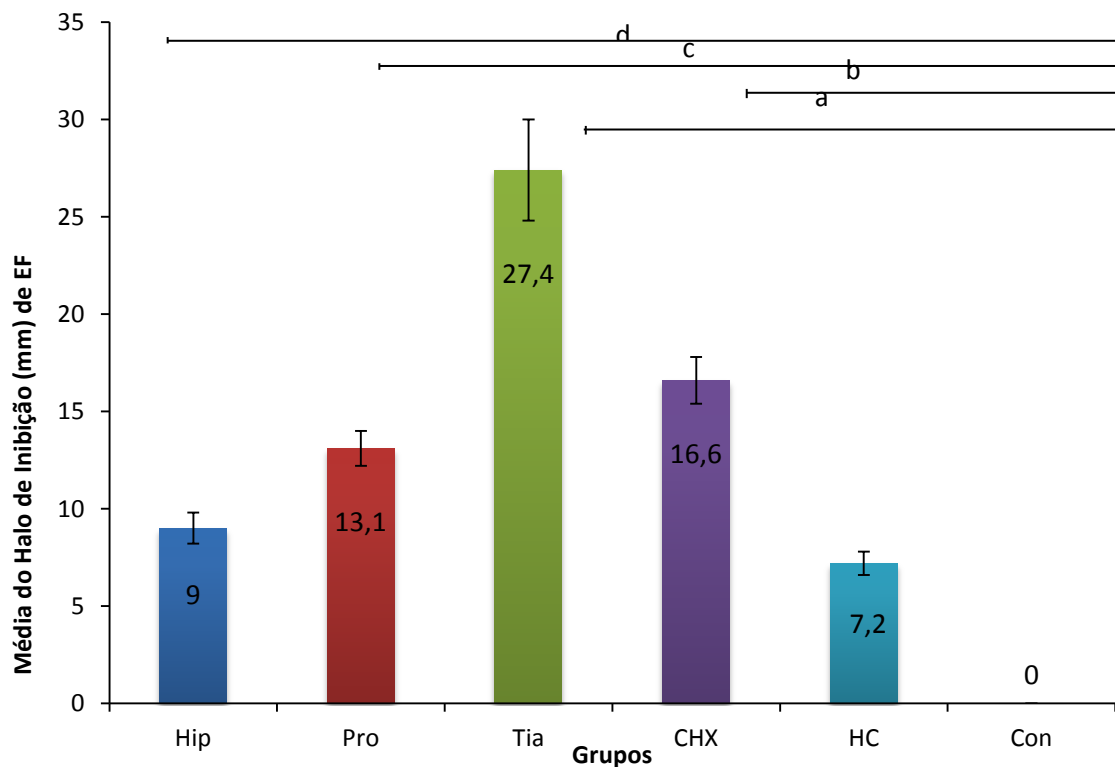
308

309 **Figura 3.** Médias de DO (Densidade Óptica) e desvio Padrão obtidas dos biofilmes de
 310 *Candida albicans* (CA) formados após contato das substâncias Hip (Hipoclorito), Pro
 311 (Própolis), Tia (Tianfenicol), CHX (Clorexidina), HC (hidróxido de cálcio) e Con (Controle).
 312 Valores ^{a, b, c, d}, $p < 0,05$ (Anova).

313 **5.4. Halos de inibição do crescimento de *Enterococcus faecalis* em presença das**
 314 **substâncias testadas.**

315 Os halos de inibição foram aferidos para cada substância química utilizada no estudo
 316 (Figura 4). As melhores atividades antimicrobianas de difusão em ágar mensuradas em mm e
 317 que diferiram entre si ($p < 0,05$) foram consecutivamente Tia, CHX, Pro, Hip e HC e por
 318 último o grupo Con, que não apresentou halo de inibição do crescimento de EF. O hipoclorito
 319 apresentou um halo de inibição menor que Pro, Tia e CHX ($p < 0,05$), entretanto maior que HC
 320 ($p < 0,05$). A Pro apresentou halo de inibição menor que Tia e CHX, porém maior que Hip e
 321 HC ($p < 0,05$). O tianfenicol apresentou o maior halo de inibição do que os encontrados nos
 322 demais grupos ($p < 0,05$).

323



324

325 **Figura 4.** Média dos halos de inibição do crescimento microbiano de *Enterococcus faecalis*
 326 (em milímetros) em presença de Hip (Hipoclorito), Pro (Própolis), Tia (Tianfenicol), CHX
 327 (Clorexidina), HC (hidróxido de cálcio) e Con (Controle). Valores ^{a, b, c, d}, $p < 0,05$ (Anova).

328

329

330 **5.5. Viabilidade do crescimento de *Enterococcus faecalis* em tempos de contato**
 331 **diferentes com as substâncias testadas.**

332 As médias do número de UFC obtidas em placas após o contato com as substâncias
 333 estão na tabela 4. EF teve uma diminuição do número de UFC na presença de Hip e CHX que
 334 foi menor que o controle ($p < 0,05$). Pro, HC e Tia reduziram as contagens de colônias em
 335 relação ao controle ($p < 0,05$) e foram mais evidentes à medida que o tempo de contato
 336 aumentou.

337

338 **Tabela 4.** Médias do número de UFC de *Enterococcus faecalis* em presença de Hip
 339 (Hipoclorito), Pro (Própolis), Tia (Tianfenicol), CHX (Clorexidina), HC (hidróxido de cálcio)
 340 e Con (Controle – Água estéril) de acordo com o tempo de contato.

Tempo de Exposição de EF com as substâncias				
Grupos	15'	40'	60'	24 H
Hip	123 ± 86	72 ± 34	0 ± 0	0 ± 0
CHX	57 ± 44	9 ± 6	0 ± 0	0 ± 0
Pro	3131 ± 147	2814 ± 60	2717 ± 77	2502 ± 57
HC	2234 ± 324	1772 ± 74	885 ± 73	527 ± 48
Tia	1758 ± 145	939 ± 63	697 ± 124	255 ± 88
Con	4760 ± 345	4794 ± 342	4836 ± 344	4779 ± 678

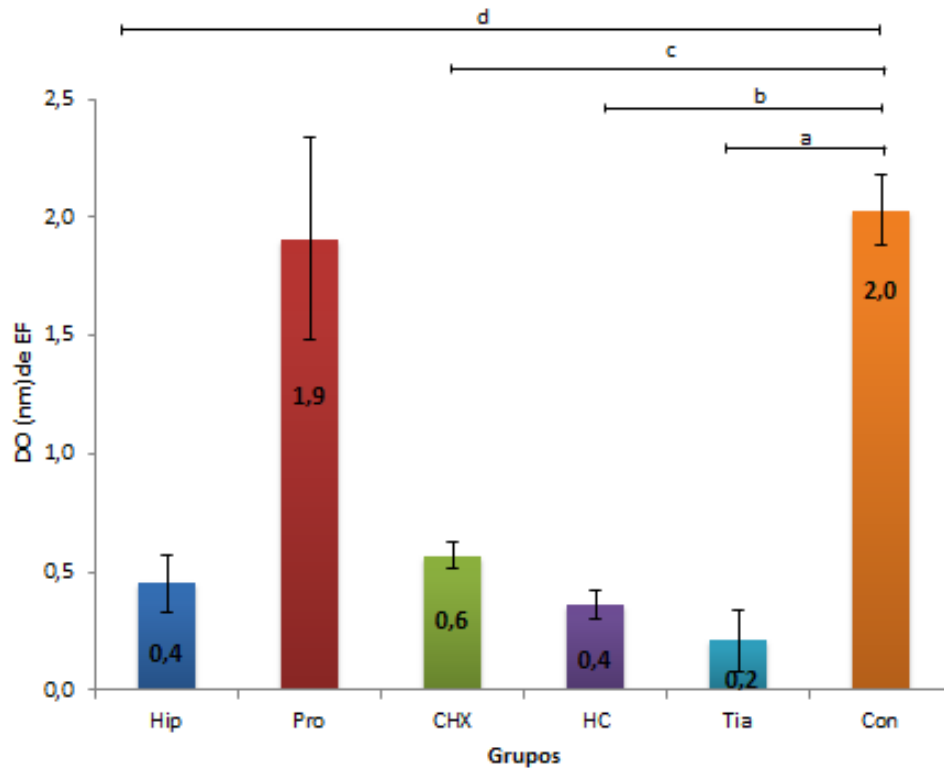
341

342

343 **5.6 Desenvolvimento do biofilme de *Enterococcus faecalis* em contato com as**
 344 **substâncias testadas.**

345 As médias das densidades ópticas dos grupos que receberam as substâncias estão na
 346 Figura 5. Com exceção da Pro, os demais grupos apresentaram médias de DO menores que o
 347 grupo controle ($p < 0,05$). A Pro não apresentou atividade inibitória no desenvolvimento do
 348 biofilme de EF. O Tia apresentou a menor DO, porém foi semelhante aos demais grupos
 349 ($p < 0,05$). As DOs de Hip e HC não diferiram entre si ($p < 0,05$) mas foram menores que Pro,
 350 CHX e Con. A DO da CHX foi superior às DOs obtidas nos grupos: Tia, HC e Hip ($p < 0,05$).

351



352

353 **Figura 5.** Médias de DO (Densidade Óptica) obtidas dos biofilmes de *Enterococcus faecalis*
 354 formados após contato das substâncias Hip (Hipoclorito), Pro (Própolis), Tia (Tianfenicol),
 355 CHX (Clorexidina), HC (hidróxido de cálcio) e Con (Controle – Água estéril). Valores ^{a, b, c, d},
 356 $p < 0,05$ (Anova).

357

358

359

360

361

362

363

364

365

366 6. DISCUSSÃO

367 A invasão bacteriana da polpa resulta em necrose pulpar devido à reação de defesa nos
368 tecidos periradiculares impedindo a disseminação dos patógenos. O tratamento endodôntico
369 consiste na remoção de tecido pulpar infectado e na utilização de substâncias irrigadoras e
370 medicamentos intracanaís com potencial antimicrobiano. A infecção persistente determina a
371 necessidade de reinstrumentação devido à presença de *Enterococcus faecalis* e *Candida*
372 *albicans*. A inclusão destas duas espécies neste estudo baseou-se na literatura que relaciona
373 esses micro-organismos às infecções da polpa (MAEKAWA *et al.*, 2007).

374 Os resultados do presente estudo mostraram que a clorexidina 2%, extrato de própolis
375 a 11%, tianfenicol 500mg/L e hipoclorito de sódio 2,5% foram efetivos nas concentrações
376 testadas para inibição do crescimento de *Candida albicans* em ágar. No entanto, houve
377 diferença na efetividade antimicrobiana destas substâncias testadas quando em contato com
378 biofilmes de CA e também na viabilidade após um tempo de contato.

379 O hipoclorito, e principalmente a clorexidina, foram os mais eficazes na eliminação de
380 CA conforme o tempo de exposição foi aumentando. A clorexidina é uma substância muito
381 usada como medicação intracanal por seu potencial de eliminar tecido orgânico, boa atividade
382 antimicrobiana (Siren *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2006; Mohammadi & Abbott, 2009; Gomes
383 *et al.*, 2013) e com excelente ação contra *Candida albicans* (Estrela *et al.*, 2003; Gurgel-Filho
384 *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Siqueira *et al.*, 2015). A atividade inibitória do crescimento de
385 CA sob efeito da clorexidina também foi encontrada por Salim *et al.*, 2013 e Shino *et al.*,
386 2016. Valera e colaboradores (2009) demonstraram que a irrigação com hipoclorito e
387 clorexidina consegue eliminar CA em canais radiculares. Por outro lado, HC e Pro
388 mostraram-se efetivos no controle dos micro-organismos até 40 minutos, já que após este
389 período, o número de UFC foi parecido com o controle, como demonstrado por Mattigatti *et*
390 *al.*; 2012. Entretanto, estudos de Chua e colaboradores (2014) não encontraram efetividade da
391 Pro no controle de CA em aplicações intracanaís, diferindo de Kujungiev *et al.*, 1999;
392 Quintero-mora *et al.*, 2007; Mattigatti *et al.*, 2012 que comprovaram essa atividade. O número
393 de UFC obtido após o contato do tianfenicol com a CA se manteve estável e abaixo dos níveis
394 encontrados no controle durante as 24 horas de contato do CA. A atividade inibitória de Tia
395 sobre CA foi semelhante à demonstrada por Popova e Bankova (2016), que encontraram halo
396 de inibição de 11,5 mm, muito próximo ao encontrado no presente estudo. Mattos e
397 colaboradores (2008) demonstraram os efeitos da pasta intracanal contendo tetraciclina,
398 tianfenicol e óxido de zinco. Essa pasta é biocompatível e eficaz na inibição de CA e outros

399 micro-organismos testados. Isto demonstra que a pasta tem uma atividade eficaz no uso
400 prolongado por ser fungistática e pela inibição da síntese de proteína microbiana (Shibli *et al.*,
401 1995). Pode então ser considerada como uma boa alternativa para o uso de CHX, que por sua
402 vez, pode levar às alterações desde inflamação a necrose tecidual, impossibilitando o seu uso
403 frequente (Faria *et al.*, 2007; Giannelli *et al.*, 2008).

404 O hidróxido de cálcio é também muito utilizado como medicação intracanal em
405 endodontia por sua baixa solubilidade e boa atividade antimicrobiana (Weckwerth *et*
406 *al.*, 2013). No entanto, no presente estudo, no antibiograma para CA, HC não apresentou
407 nenhuma atividade antimicrobiana e também não inviabilizou o crescimento desse micro-
408 organismo, como encontrado por Mattigatti *et al.*, 2012.

409 As influências inibitórias das substâncias testadas sobre o biofilme de CA foram mais
410 eficazes na presença de Hip, Pro e especialmente o Tia, que reduziram em cerca de 5 vezes a
411 biomassa de CA. A clorexidina, que apesar de ter demonstrado as melhores propriedades na
412 viabilidade e os maiores halos de inibição, reduziu pouco a densidade óptica do biofilme
413 quando comparada ao controle, o que corrobora com o estudo de Zand *et al.*, 2016, que
414 mostra a ineficácia de géis de clorexidina no biofilme de CA. Apesar da atividade
415 antimicrobiana da clorexidina, os micro-organismos contidos em uma estrutura de biofilme
416 tornam-se resistentes a este antimicrobiano desinfetante (Donlan *et al.*, 2001). Cepas de *C.*
417 *albicans* em biofilmes são 8 vezes mais resistentes a clorexidina quando comparadas as
418 mesmas cepas em crescimento planctônico (Lamfon *et al.*, 2004). Por outro lado, Salim e
419 colaboradores, 2013 encontraram que a CHX diminui a formação do biofilme em 75% e o
420 metabolismo em 84% para CA. O mesmo encontrado por Machado *et al.*, 2010; Shino *et al.*,
421 2016, que demonstraram a efetividade da clorexidina em relação ao biofilme de CA,
422 discordando dos resultados encontrados no presente estudo.

423 Os resultados dos efeitos das substâncias antimicrobianas testadas sobre EF
424 demonstraram que todas apresentaram atividade antimicrobiana, pois houve halo de inibição
425 em presença de Tia, CHX, Pro, Hip e HC. A atividade sobre o biofilme foi muito boa em
426 presença de Tia, seguida pela HC, Hip e CHX. A atividade antimicrobiana da CHX sobre EF
427 é bem descrita pela literatura e há um consenso quanto a sua excelente eficácia antimicrobiana
428 sobre este micro-organismo (Arslan *et al.*, 2011; Atila-Pektaş, 2013; De lucena *et al.*, 2013;
429 Carbajal Mejía, 2014; Mozayeni *et al.*, 2014) e Hip (Sahebi *et al.*, 2014; Zand *et al.*, 2016),
430 embora haja estudos sobre as melhores concentrações de uso intracanal para se evitar os seus
431 efeitos citotóxicos periapicais (Zand *et al.*, 2016). Os resultados do presente estudo

432 demonstraram que a CHX é muito eficaz como curativo de demora e ainda reduz o número de
433 colônias de EF concordando com Dametto *et al.*, 2005; De lucena *et al.*, 2013.

434 O hipoclorito é um potente irrigante, com largo espectro de ação antimicrobiana, que
435 causa quebra das proteínas e aminoácidos, através da liberação de cloro livre, com potencial
436 de dissolver tecido necrótico e restos orgânicos. Sua ação bacteriostática não foi totalmente
437 comprovada, entretanto, a inibição das reações enzimáticas dentro da célula e a desnaturação
438 das proteínas desempenham importantes papéis na destruição dos micro-organismos
439 (Menezes *et al.*, 2008; Chandra *et al.*, 2010). Seu efeito em relação ao EF depende de sua
440 concentração e tempo de exposição. Em baixas concentrações, torna-se ineficaz contra EF
441 (Gomes *et al.*, 2001). Quando associado a fungicidas como clotrimazol, numa porcentagem de
442 5,25%, diferente da usada no presente estudo, apresentou melhor eficácia contra CA do que a
443 CHX (Chandra *et al.*, 2010). No entanto, quando usado em altas concentrações, torna-se
444 citotóxico aos tecidos periradiculares (Estrela *et al.*, 2003; Menezes *et al.*, 2010).

445 O extrato de própolis, em comparação com as outras substâncias, apresentou pouca
446 efetividade contra EF, pois o biofilme não diminuiu em sua presença. Costa e colaboradores
447 (2008) observaram em seus estudos baixa atividade antimicrobiana do extrato de própolis
448 frente a esse micro-organismo. Por outro lado, vários autores apresentaram em estudos *in*
449 *vitro* boa atividade contra EF (Maia filho *et al.*, 2009, Madhubala *et al.*, 2011; Mattigatti *et*
450 *al.*, 2012) e também estudos de biofilmes (Arslan *et al.*, 2011; Bhardwaj *et al.*, 2013).

451 O hidróxido de cálcio apresentou resultado significativo na redução da formação do
452 biofilme de EF. Vários trabalhos demonstraram a eficácia do hidróxido de cálcio no controle
453 do crescimento de EF (Lima *et al.*, 2012; Hamidi *et al.*, 2012; Gondim *et al.*, 2012; Saatchi *et*
454 *al.*, 2014). Embora existam estudos que tenham relatado a resistência deste micro-organismo
455 frente a essa substância (Mozayeni *et al.*, 2014), vários outros demonstraram a eficiência do
456 hidróxido de cálcio sobre EF quando associado à outra substância antimicrobiana, como
457 PMCC (paramonoclorofenol) e clorexidina (Lima *et al.*, 2011; Adl *et al.*, 2012;). O
458 Tianfenicol, também apresentou eficácia sobre EF como reportado previamente (Neu *et*
459 *al.*, 1980). Visto que não existem pesquisas sobre esse medicamento na literatura endodôntica,
460 o mesmo pode ser comparado à pasta tripla antibiótica, sendo assim, o resultado do presente
461 estudo vai ao encontro do estudo de Shokraneh *et al.*, 2014, que comprovaram maior eficácia
462 da mistura de antibióticos frente ao EF.

463 Diante do exposto, a hipótese do estudo é que o tianfenicol possui boa ação
464 antimicrobiana, pois inviabilizou o crescimento e a formação do biofilme de EF e CA,
465 conforme foi comprovada. No entanto, tais propriedades puderam ser comparáveis somente

466 com a atividade da clorexidina e do hipoclorito de sódio. Os resultados *in vitro* da efetividade
467 do tianfenicol na eliminação e controle do biofilme de CA e EF parecem promissores para a
468 formulação de pastas intracanáis, onde medicações comumente utilizadas não obtiveram
469 êxito, o que encoraja futuros testes.

470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

484

485

486

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500 7. CONCLUSÃO

501 Diante dos resultados obtidos nos ensaios com CA concluiu-se que:

502 - A inibição de crescimento fúngico foi maior em presença de CHX e Pro, seguida do
503 Tia.

504 - O contato de CA com Hip e CHX inviabiliza o crescimento já nos primeiros 15 min
505 de contato. O Tia também diminui a população microbiana e a mantém estável o número de
506 UFC ao longo das 24 horas.

507 - O biofilme de CA foi diminuído em presença de Hip, Tia e Pro, mas não quando HC
508 ou CHX foram aplicados.

509 Já os ensaios de EF permitiram concluir que:

510 - A inibição de crescimento de EF foi maior na presença de Tia, CHX e Pro;

511 - A viabilidade de crescimento de EF foi completamente inibida pelo Hip e CHX nos
512 primeiros minutos de contato. Tia, Pro e HC reduziram as contagens microbianas ao longo do
513 tempo de contato.

514 - No teste de biofilme, as substâncias que apresentaram menores DO foram Tia, HC,
515 Hip e CHX. O extrato de própolis não apresentou atividade inibitória do biofilme de EF.
516 Nesse caso, as melhores substâncias contra EF foram CHX, Hip e Tia, pois inibiram o
517 crescimento e o biofilme.

518 Desta maneira, Tia apresentou boa atividade antimicrobiana que podem ser comparável
519 às propriedades do CHX e Hip.

520

521

522

523

524

525

526

527

528

529 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

530

- 531 1. ADL, A.; SHOJAEE, N. S.; MOTAMEDIFAR, M. A comparison between the
532 antimicrobial effects of triple antibiotic paste and calcium hydroxide against
533 *Enterococcus faecalis*. **Iranian Endodontic Journal**, v.7, n.3, p.149-155, 2012.
- 534 2. ARSLAN, S.; OZBILGE, H.; KAYA, E. G.; OZGUR, E. R. In vitro antimicrobial
535 activity of Própolis, BioPure MTAD, sodium hypochlorite, and chlorhexidine on
536 *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. **Saudi Med J**, v. 32, n.5, 2011.
- 537 3. AL-NAZHAN, S.; AL-SULAIMAN, A.; AL-RASHEED, F.; ALNAJJAR, F.; AL-
538 ABDULWAHAB, B.; AL-BADAH, A. Microorganism penetration in dentinal tubules of
539 instrumented and retreated root canal walls. *In vitro* SEM study. **Restorative Dentistry**
540 **& Endodontics**, v.39, n.4, p.258-264, Nov 2014.
- 541 4. ARAÚJO, K. C. S.; MARCUCCI, M. C. Efeito sinérgico da própolis tipificada contra
542 *Enterococcus faecalis*. **Rev. Pesq. Inov. Farm**, v. 3, n.1, p. 9-14, Mar 2011.
- 543 5. ATILA-PEKTA, S. B.; YURDAKUL, P.; GÜLMEZ, D.; GÖRDUYSUS, O.
544 Antimicrobial effects of root canal medicaments against *Enterococcus faecalis* and
545 *Streptococcus mutans*. **Int Endod J**, v. 46, n.5, p.413-8, May 2013.
- 546 6. BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M.
547 Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am J Clin**
548 **Pathol.**, v.45, n.4, p.493-6, Apr 1966.
- 549 7. BAUMGARTNER, J. C.; WATTS, C. M.; XIA, T. Occurrence of *Candida albicans* in
550 infections of endodontic origin. **J Endod**, v. 26, n. 12, p. 695-8, Dec 2000.
- 551 8. BHANDARI, S.; ASHWINI, T. S.; PATIL, C. R. An in Vitro Evaluation of
552 Antimicrobial efficacy of 2% chlorhexidine gel, Própolis and calcium hydroxide against
553 *Enterococcus faecalis* in human root dentin. **J Clin Diagn Res**, v. 8, n. 11, p. 60-3, Nov
554 2014.
- 555 9. BHARDWAJ, S.; DHAWALE, K. B. J.; MAHENDRA PATIL, M.; DIVASE, S.
556 *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*, the nosocomial pathogens with special
557 reference to multi-drug resistance and phenotypic characterization. **International**
558 **Journal of Pharmaceutical Science and Practice**. v. 2, n.1, p. 1-10, 2013.

- 559 10. COSTA, E. Avaliação da ação antimicrobiana da própolis e das substâncias utilizadas
560 em endodontia sobre o *Enterococcus faecalis*. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, v.8,
561 n.1, p. 21-25, Jan/Abr 2008.
- 562 11. CATTAPAN, A. Tianfenicol no tratamento das DST no Brasil. **Jornal Brasileiro de**
563 **DST**. v.7, n.4, p.4-22, 1995.
- 564 12. CHANDRA, S. S.; MIGLANI, R.; SRINIVASAN, M. R.; INDIRA, R. Antifungal
565 efficacy of 5.25% sodium hypochlorite, 2% chlorhexidine gluconate, and 17% EDTA
566 with and without an antifungal agent. **Journal of Endodontics**, v.36, n.4, p.675-678,
567 April 2010.
- 568 13. CHUA, G.; PAROLIA, A.; AHLAWAT, P.; PAU, A.; AMALRAJ, F. D.; Antifungal
569 effectiveness of various intracanal medicaments against *Candida albicans*: an ex-vivo
570 study. **BMC Oral Health**. v. 523, n.14, p.1472 - 6831, May 2014.
- 571 14. COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; DEBEER, D.; CALDWELL, D.;
572 KORBER, D.; JAMES, G. Biofilms, the customized microniche. **J Bacteriol**, v. 176, n.
573 8, p. 2137-42, Apr 1994.
- 574 15. COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a
575 common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-22, May 1999.
- 576 16. DAMETTO, F. R. ; FERRAZ, C. C. R.; GOMES, B. P. F. A.; ZAIA, A.A.; TEIXEIRA,
577 F. B.; SOUZA-FILHO, F. J. In vitro assessment of the immediate and prolonged
578 antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus*
579 *faecalis*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.99, p.768-72, 2005.
- 580 17. DE LUCENA, J. M.; DECKER, E. M.; WALTER, C.; BOEIRA L. S.; LÖSTC,
581 WEIGERR. Antimicrobial effectiveness of intra-canal medicaments on *Enterococcus*
582 *faecalis*: chlorhexidine versus octenidine. **International endodontic jornal**, v.46, n.1,
583 p.53-61, Jan 2013.
- 584 18. DONLAN, R. M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process.
585 **Clinical Infectious Disease**, v. 33, n.8, p. 1387-92, 2001.
- 586
- 587 19. DRAGO, L.; DE VECCHI, E.; FASSINA, M. C.; MOMBELLI, B.; TOCALLI, L.;
588 GISMONDO, M. R. Comparative *in vitro* activity of thiamphenicol-glycinate and
589 thiamphenicol-glycinate acatylcysteinate and other antimicrobials against respiratory
590 pathogens. **Drug Res**, v. 51, p. 315-324, 2001.

- 591 20. DRAGO, L.; DE VECCHI, E.; FASSINA, M. C.; MOMBELLI, B.; GISMONDO, M. R.
592 Serum and lung levels of thiamphenicol after administration of its glycinate N-
593 acetylcysteinate ester in experimentally infected guinea pigs. **Int J Antimicrob Agents**,
594 v. 13, p. 301-303, Feb 2000.
- 595 21. ESTRELA, C. R. A.; ESTRELA, C.; REIS, C.; BAMMANN, L. L.; PÉCORÁ, J. D.
596 Control of microorganisms *In Vitro* by endodontic irrigants. **Braz Dent J**, v. 14, n.3, p.
597 187-19, 2003.
- 598 22. FARIA, G. Evaluation of chlorhexidine toxicity injected in the paw of mice and added
599 to cultured L929 fibroblasts. **JOE**, v. 33, n. 6, June 2007.
- 600 23. FIGDOR, D.; DAVIES, J. K.; SUNDQVIST, G.; Starvation, survivor, growth and
601 recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. **Oral microbiology and**
602 **Immunology**, v.18, p.234-239, Jan 2003.
- 603 24. GIANELLI, M.; CHELLINI, F.; MARGHERI, M.; TONELLI, P.; TANI, A. Effect of
604 chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural
605 investigation. **Toxicology in vitro**, v.22, p. 308-317, 2008.
- 606 25. GOMES, B. P. F. A.; FERRAZ, C. C. R.; VIANNA, M. E. ; BERBER, V. B.;
607 TEIXEIRA, F. B.; SOUZA-FILHO, F. J. In vitro antimicrobial activity of
608 several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the
609 elimination of *Enterococcus faecalis*. **International Endodontic Journal**, p. 424-428,
610 2001.
- 611 26. GOMES, B. P. F. A.; VIANNA, M. E.; SENA, N. T.; ZAIA, A. A.; RANDI FERRAZ,
612 C. C. R. ; SOUZA FILHO, F. J. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of
613 calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament.
614 **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. Endod.**v. 102, n.4 , p.544-50, Oct
615 2006.
- 616 27. GOMES, B. P.; VIANNA, M. E.; ZAIA, A. A.; ALMEIDA, J. F.; SOUZA-FILHO, F.
617 J.; FERRAZ, C.C. Chlorhexidine in endodontics. **Braz Dent J**, v. 24, n. 2, p. 89-102,
618 2013.
- 619 28. GONDIM, J. O.; AVACA-CRUSCA, J. S.; VALENTINI, S. R.; ZANELLI, C. F;
620 SPOLIDORIO, D. M. P; GIRO, E. M. A. Effect of a calcium hydroxide/chlorhexidine
621 paste as intracanal dressing in human primary teeth with necrotic pulp against

- 622 *Porphyromonas gingivalis* and *Enterococcus faecalis*. **International Journal of**
623 **Paediatric Dentistry**, v.22, p.116–124, 2012.
- 624 29. GRASSI, C.; DE BENEDETTO, F. Recent clinical evidence of the efficacy and safety
625 of thiamphenicol glycinate acetylcysteinate and thiamphenicol glycinate. **J Chemother**,
626 v. 14, n.3, p. 279-284, Oct 2002.
- 627 30. GURGEL-FILHO, E.D.; VIVACQUA-GOMES, N.; GOMES, B. P. F. A.; FERRAZ, C.
628 C. R.; ZAIA, A. A.; SOUZA-FILHO, F. J. In vivo evaluation of the effectiveness of the
629 chemomechanical preparation against *Enterococcus faecalis* after single-or multiple-visit
630 root canal treatment. **Braz Oral Res**, v.21, n.4, p.308-13, 2007.
- 631 31. HAMIDI, M. R. Effect of Calcium Hydroxide and Chlorhexidine Medicaments on the
632 Apical Seal. **Iranian Endodontic Journal**, v.7, n.1, p.15-19, 2012.
- 633 32. KAUFMAN, D. W.; KELLY, J. P.; JURGELON, J. M.; ANDERSON, T.;
634 ISSARAGRISIL, S.; WIHOLMBE. Drugs in the aetiology of agranulocytosis and
635 aplastic anaemia. **Eur J Haematol Suppl**, v.60, p. 23–30, 1996.
- 636 33. KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.;
637 CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of Própolis
638 of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n.3, p. 235–
639 240, March 1999.
- 640 34. LAMFON, H.; PORTER, S. R.; MCCULLOUGH, M.; PRATTEN, J. Susceptibility of
641 *Candida albicans* biofilms grown in a constant depth film fermentor to chlorhexidine,
642 fluconazole and miconazole: a longitudinal study. **Journal of Antimicrobial**
643 **Chemotherapy**, v. 53, n.2, p. 383–385, Jan 2004.
- 644 35. LIMA, R. K. P.; GUERREIRO-TANOMARU, J. M.; FARIA-JÚNIOR, N. B.;
645 TANOMARU-FILHO, M. Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal
646 medicaments against *Enterococcus faecalis*. **International Endodontic Journal**, v.45,
647 p.311–316, 2012.
- 648 36. LOVE, R. M. *Enterococcus faecalis*– a mechanism for its role in endodontic failure.
649 **International endodontic journal**, v.34, issue 5, p. 399-405, July 2001.
- 650 37. MACHADO, F. C.; PORTELA, A. C. C.; SOUZA, I. P. R.; SOARES, R. M. A.;
651 CASTRO, G. F. B. A. Antifungal activity of chlorhexidine on *Candida* spp. biofilm.
652 **Rev Odontol UNESP**, v.39, n.5, p.271-275, Set/Out 2010.

- 653 38. MADHUBALA, M. M.; SRINIVASAN, N.; AHAMED, S. Comparative evaluation of
654 Própolis and triantibiotic mixture as an intracanal medicament against *Enterococcus*
655 *faecalis*. **JOE**, v. 37, n.9, September 2011.
- 656 39. MAEKAWA, L. E.; LAMPING, R.; MARCACCI, S.; MAEKAWA, M. Y.; NASSRI,
657 M. R. G.; KOGA-ITO, C. Y. Antimicrobial activity of chlorophyll-based solution on
658 *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. **RSBO**, v. 4, n. 2, p. 36-40, Oct 2007.
- 659 40. MAIA FILHO, E.; MATOS, E.; MAIA, C. C. R.; BASTOS, A. C. S. C.; NOVAIS, T.
660 M. Efeito antimicrobiano in vitro de diferentes medicações endodôntica e propólis
661 sobre *Enterococcus faecalis*. **RGO - Revista Gaúcha de Odontologia**, Abr 2009.
- 662 41. MARCHESE, A.; DEBBIA, E. A; TONOLI, E.; GUALCO, L.; SCHITO, A. M. In vitro
663 activity of thiamphenicol against multiresistant *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus*
664 *influenzae* and *Staphylococcus aureus* in Italy. **J Chemother**, v.14, n.6, p.554-61, Dec
665 2002.
- 666 42. MATTIGATTI, S.; JAIN, D.; RATNAKAR, P.; MOTURI, S.; VARMA, S.; RAIRAM,
667 S. Antimicrobial effect of conventional root canal medicaments vs Própolis against
668 *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. **The Journal of**
669 **Contemporary Dental Practice**, v.13, n.3, p.305-309, May/June 2012.
- 670 43. MATTOS, E. C. G.; CHAIN, M. C.; SANTOS, A. R. S.; SMÂNIA, E. F, A.; ARTUR
671 SMÂNIA JUNIOR, A. S.; FILHO; R. R. Atividade antimicrobiana in vitro da pasta
672 endodôntica preparada com tetraciclina, tianfenicol e óxido de zinco no método da
673 difusão em ágar. **Brasilian Dental Journal**, 2008.
- 674 44. MELKER, K. B.; VERTUCCI, F. J.; ROJAS, M. F.; PROGULSKE-FOX, A.;
675 BELANGER, M. Antimicrobial efficacy of medicated root canal filling materials. **J**
676 **Endod**, v. 32, n. 2, p. 148-51, Feb 2006.
- 677 45. MENEZES, M. M.; OLIVEIRA, L. D.; KOGA-ITO, C. Y.; JORGE, A. O. C.;
678 VALERA, M. C. Concentração fungicida mínima das soluções de clorexidina e
679 hipoclorito de sódio sobre *Candida albicans*. **Cienc Odontol Bras**, v. 11, n. 2, p. 23-28,
680 Abr/Jun 2008.
- 681 46. MOHAMMADI, Z.; ABBOTT, P. V. The properties and applications of chlorhexidine
682 in endodontics. **Int Endod J**, v. 42, n. 4, p. 288-302, Apr 2009.

- 683 47. MOLANDER, A.; REIT, C.; DAHLEN, G.; KVIST, T. Microbiological status of root-
684 filled teeth with apical periodontitis. **Int Endod J**, v. 31, n. 1, p. 1-7, Jan 1998.
- 685 48. MOZAYENI, M. A.; HAERI, A.; DIANAT, O.; JAFARI, A. R. Antimicrobial effects
686 of four intracanal medicaments on enterococcus faecalis: an in vitro study. **Iran Endod**
687 **J**, v. 9, n. 3, p. 19, 2014.
- 688 49. NAIR, P. N.; SJOGREN, U.; FIGDOR, D.; SUNDQVIST, G. Persistent periapical
689 radiolucencies of root-filled human teeth, failed endodontic treatments, and periapical
690 scars. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 87, n. 5, p. 617-27,
691 May 1999.
- 692 50. NARAYANAN, L. L.; VAISHNAVI, C. Endodontic microbiology. **J Conserv Dent**, v.
693 13, n. 4, p. 233-9, Oct 2010.
- 694 51. NEU, H.C.; FU, K.P In Vitro Activity of Chloramphenicol and Thiamphenicol Analogs.
695 **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.18, n.2, p. 311-316, Aug 1980.
- 696 52. POPOVA, T.P.; BANKOVA, R.. Antimicrobial Activity *in vitro* of Essential Oils from
697 Oregano (*Origanum compactum* L.) and Thyme (*Thymus vulgaris* L.)
698 **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci** , v.5, n. 10, p. 57-68,
699 2016.
- 700 53. PECIULIENE, V.; MANELIENE, R.; BALCIKONYTE, E.; DRUKTEINIS, S.;
701 RUTKUNAS, V. Microorganisms in root canal infections: a review. **Stomatologija,**
702 **Baltic Dental and Maxillofacial Journal**, v.10, n.1, p. 4-9, 2008.
- 703 54. PORTENIER, I.; WALTIMO, M. T.; HAAPASALO, M. *Enterococcus faecalis*– the
704 root canal survivor and ‘star’ in post-treatment disease. **Endodontic Topics**, v.6, issue1,
705 Nov 2003.
- 706 55. ROSENTHAL, S.; SPANGBERG, L.; SAFAVI, K. Chlorhexidine substantivity in root
707 canal dentin. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 98, n. 4, p. 488-
708 92, Oct 2004.
- 709 56. SAATCHI, M.; SHOKRANEH, A.; NAVAEI, H.; MARACY, M. R.; SHOJAEI, H.
710 Antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine on *Enterococcus*
711 *faecalis*: a systematic review and meta-analysis. **J. Appl Oral Sci**, v.22, n.5, p.356-65,
712 2014.

- 713 57. SAHEBI, S. A.; KHOSRAVIFAR, N. B.; SEDIGHSHAMSI, M. A.;
714 MOTAMEDIFAR, M. Comparison of the Antibacterial Effect of Sodium Hypochlorite
715 and Aloe Vera Solutions as Root Canal Irrigants in Human Extracted Teeth
716 Contaminated with *Enterococcus Faecalis*. **J Dent Shiraz Univ Med Sci.**, v.15, n.1,
717 p.39-43, March 2014.
- 718 58. SHAIK, J.; GARLAPATI, R.; NAGESH, B.; SUJANA, V.; JAYAPRAKASH, T.;
719 NAIDU, S. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of triple antibiotic paste
720 and calcium hydroxide using chitosan as carrier against *Candida albicans* and
721 *Enterococcus faecalis*: An in vitro study. **J Conserv Dent**, v. 17, n. 4, p. 335-9, Jul 2014.
- 722 59. SHIBLI, A. M.; PECHERE, C.; RAMADAN, M. Postantibiotic effect and host bacteria
723 interactions. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.36, p.885-890, 1995.
- 724 60. SHINO, B.; PEEDIKAYIL, F. C.; SHYAMALA, R.; JAIPRAKASH, S. R.; BIJAPUR,
725 G. A.; SONI KOTTAYI, S.; JOSE, D. Comparison of antimicrobial activity of
726 chlorhexidine, coconut oil, probiotics, and ketoconazole on *Candida albicans* isolated in
727 children with early childhood caries: an in vitro study, **Scientifica**, 2016.
- 728 61. SHOKRANEH, A.; FARHAD, A. R.; FARHADI, N.; SAATCHI, M.; HASHEMINIA,
729 S.M. Antibacterial effect of triantibiotic mixture versus calcium hydroxide in
730 combination with active agents against *Enterococcus faecalis* biofilm. **Dent Mater J**, v.
731 33, n. 6, p. 733-8, 2014.
- 732 62. SIQUEIRA, A. B. S.; RODRIGUEZ, L. R. N. A.; SANTOS, R. K. B.; MARINHO, R.
733 R. B.; ABREU, S.; PEIXOTO, R. F.; GURGEL, B. C. V. Antifungal activity of Própolis
734 against *Candida* species isolated from cases of chronic periodontitis. **Braz Oral Res** .
735 v.29, n.1, p.1-6, 2015.
- 736 63. SIQUEIRA, J. F.; LOPES, H. P. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium
737 hydroxide: a critical review. **International Endodontic Journal**, v.32, n.5, p.361-369,
738 September 1999.
- 739 64. SIREN, E. K.; HAAPASALO, M. P.; RANTA, K.; SALMI, P.; KEROSUO, E. N.
740 Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected
741 for microbiological investigation. **Int Endod J**, v. 30, n. 2, p. 91-5, Mar 1997.

- 742 65. SÓ, M. V. R.; WAGNER, M. H.; ROSA, R. A.; TELLES, L.; COLPANI, F.; HENZ, S.;
743 MAGRO, M. L. Antimicrobial in vitro activity of a Própolis suspension against
744 *Enterococcus faecalis*. **RFO**, v. 16, n. 3, p. 277-281, Set/Dez 2011.
- 745 66. RAYMOND, J.; BOUTROS, N.; BERGERET, M. Role of thiamphenicol in the
746 treatment of community-acquired lung infections. **Med Trop**, v.64, n.1, p.33-38, Mar
747 2004.
- 748 67. ROCAS, I. N.; SIQUEIRA, J. F.; SANTOS, K. R. N. Association of *Enterococcus*
749 *faecalis* with different forms of periradicular diseases. **Journal of endodontics**, v.30,
750 n.5, p.315-320, May 2004.
- 751 68. ROCAS, I. N.; HÜLSMANN, M.; SIQUEIRA, J. F. Microorganisms in root canal-
752 treated teeth from a German population. **Clinical Research**, v. 34, n. 8, August 2008.
- 753 69. TROPE, M.; DELANO, E. O.; ORSTAVIK, D. Endodontic treatment of teeth with
754 apical periodontitis: single vs. multivisit treatment. **Journal of endodontics**, v. 25, n. 5,
755 p. 345-350, May 1999.
- 756 70. TURTON, J. A.; HAVARD, A. C.; ROBINSON, S. An assessment of chloramphenicol
757 and thiamphenicol in the induction of aplastic anaemia in the BALB/c mouse. **Food**
758 **Chem Tox**, v.38, p. 925-938, 2000.
- 759
- 760 71. VALERA, M. C.; SILVA, K. C. G.; MAEKAWA, L. E.; CARVALHO, C. A. T.;
761 KOGA-ITO, C. Y.; CAMARGO, C. H. R.; LIMA, R. S. Antimicrobial activity of
762 sodium hypochlorite associated with intracanal medication for *Candida albicans* AND
763 *Enterococcus faecalis* inoculated in root canals. **J Appl Oral Sci**. v. 17, n.6, p. 555-9,
764 2009.
- 765 72. VALERA, M. C.; MAEKAWA, L. E.; DE OLIVEIRA, L. D.; JORGE, A. O.;
766 SHYGEI, E.; CARVALHO, C. A. In vitro antimicrobial activity of auxiliary chemical
767 substances and natural extracts on *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* in root
768 canals. **J Appl Oral Sci**, v. 21, n. 2, p. 118-23, Mar/Apr 2013.
- 769 73. WALTIMO, T. M. T.; SIREN, E. K.; ORSTAVIK, D.; HAAPASALO, M. P. P.
770 Susceptibility of oral *Candida* species to calcium hydroxide in vitro. **International**
771 **Endodontic Journal**, v. 32, p. 94-98, 1999.
- 772 74. WANG, C. S.; ARNOLD, R. R.; TROPE, M.; TEIXEIRA, F. B. Clinical efficiency of
773 2% chlorhexidine gel in reducing intracanal bacteria. **JOE**, v.33, n. 11, November 2007.

- 774 75. WECKWERTH, P. H.; ZAPATA, R. O.; VIVAN, R. R.; TANOMARU FILHO, M.;
775 MALIZA, A. G.; DUARTE, M. A. In vitro alkaline pH resistance of *Enterococcus*
776 *faecalis*. **Braz Dent J**, v. 24, n. 5, p. 474-6, Sep-Oct 2013.
- 777 76. WEI, C. F.; CHANG, S. K.; SHIEN, J. H.; KUO, H. C.; CHEN, W. Y.; CHOU, C. C.
778 Synergism between two amphenicol of antibiotics, florfenicol and thiamphenicol,
779 against *Staphylococcus aureus*. **Vet Rec**, v.178, n.13, p.319, Mar 2016.
- 780 77. ZAND, V.; LOTFI, M.; SOROUSH, M. H.; ABDOLLAHI, A. A.; SADEGHI, M.;
781 MOJADADI, A. Antibacterial efficacy of different concentrations of sodium
782 hypochlorite gel and solution on *Enterococcus faecalis* biofilm. **IEJ**,v.11, n.4, p. 315-
783 319, 2016.