

ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE SCAFFOLDS DE NANOCELULOSE IMPREGNADOS COM ANTIMICROBIANOS PARA USO NA TERAPIA ENDODÔNTICA REGENERATIVA

Fernanda Keil Kressin Ávila da Silva; Isabela Stahelin; Gilmar da Rosa Souza Jr.;
Dra. Josiane de Almeida Cava da Silveira (orientadora)

RESUMO:

O objetivo do estudo foi avaliar a atividade antibiofilme de scaffolds tridimensionais de nanocelulose bacteriana (BNC) incorporadas com clorexidina 0,12% (BNC/CHX), amoxicilina 1% (BNC/AMOX) e clindamicina 1% (BNC/CLI). Membranas sem agente antimicrobiano formaram o grupo controle (BNC/C). As membranas foram imersas em uma cultura multiespécie de *E. faecalis*, *A. naeslundii* e *S. sanguinis*, servindo de substrato para o crescimento do biofilme. Após 24h, 7 e 15 dias, o valor médio de unidades formadoras de colônias (UFC) foi determinado. Os dados foram analisados pelos testes Kruskal-Wallis e *post hoc* Dunn ($\alpha=5\%$). No período de 24h, BNC/AMOX inibiu a formação de biofilme na membrana, comparada aos demais grupos ($P < 0,05$). Contudo, os valores de UFC aumentaram ao longo do período experimental, sem diferença significativa comparada à BNC/C ($P > 0,05$). Por outro lado, BNC/CHX permitiu a formação densa de biofilme já em 24h, a qual aumentou progressivamente ao longo do período experimental, com valores de UFC semelhante ao controle ($P > 0,05$). BNC/CLI inibiu significativamente a formação de biofilme comparada à BNC/C apenas no período de 24h ($P < 0,05$); nos demais períodos, os valores de UFC foram semelhantes ($P > 0,05$). Amostras das diferentes membranas foram observadas em MEV e Confocal e ilustraram os resultados obtidos na análise quantitativa.

INTRODUÇÃO:

Os procedimentos endodônticos regenerativos (REPs) estão em constante evolução dentro da odontologia (1). Para seu êxito, três componentes são fundamentais: células-tronco, fatores de diferenciação celular e *scaffold*. (2,3,4) Contudo, algumas dificuldades são encontradas, como infecção persistente nos canais radiculares e citotoxicidade de alguns materiais *scaffolds* (5).



Avanços nas pesquisas têm focado no uso de *scaffolds* (6) como a nanocelulose bacteriana (BNC), por possuir excelentes propriedades e permitir a imobilização de moléculas ativas em sua rede de nanofibras (6). Portanto, esse estudo teve como objetivo avaliar a atividade antibiofilme prolongada de *scaffolds* tridimensionais de BNC impregnados com clorexidina, clindamicina e amoxicilina.

PALAVRAS-CHAVE:

Nanocelulose Bacteriana; Endodontia Regenerativa; Biofilme Multiespécie.

MÉTODO:

Foram utilizadas três espécies bacterianas relacionadas aos casos de necrose pulpar: *E. faecalis*, *A. naeslundii* e *S. sanguinis*.

As BNCsl foram impregnadas com os diferentes agentes antimicrobianos, compondo os seguintes grupos experimentais: Grupo 1: BNC convencional (CBNsl/C) (controle); Grupo 2: BNCsl + clorexidina 0,12% (BNCsl/CHX); Grupo 3: BNCsl + clindamicina 1% (BNCsl/CLI); e Grupo 4: BNCsl + amoxicilina 1% (BNCsl/AMOX).

Para o crescimento do biofilme, placas de cultura foram preenchidas com 1,5 mL/poço de meio de crescimento, inoculado com a cultura multiespécie diluída 1:100. As membranas foram posicionadas nos poços, e serviram de substrato. O aparato foi incubado e após 24 horas, 7 e 15 dias, as membranas foram removidas para avaliação da atividade antibiofilme.

Para a determinação do efeito antibiofilme, as membranas foram transferidas para recipientes com 2 mL de PBS. Os biofilmes foram removidos dos substratos por meio da sonicação por 15 min, e as suspensões resultantes foram diluídas (1:100). Alíquotas de 100 µL foram plaqueadas. As placas foram incubadas, por 24h e 48h. Após, o número de UFC/mL foi determinado.

Para a avaliação qualitativa da formação ou não do biofilme nas membranas, amostras foram observadas em MEV e Confocal.

Para o teste de viabilidade bacteriana o valor médio de UFC/mL para cada amostra, por período, foi determinado e os dados normalizados a partir da transformação em log₁₀ de cada valor de UFC/mL. Os testes Kruskal-Wallis e o teste



post hoc Dunn foram usados. O nível de significância foi estabelecido em 5%. As análises foram realizadas com o auxílio do software SPSS versão 21.0 (IBM, Armonk, NY, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

Amostras das diferentes membranas foram observadas em MEV e Confocal e ilustraram os resultados obtidos na análise quantitativa.

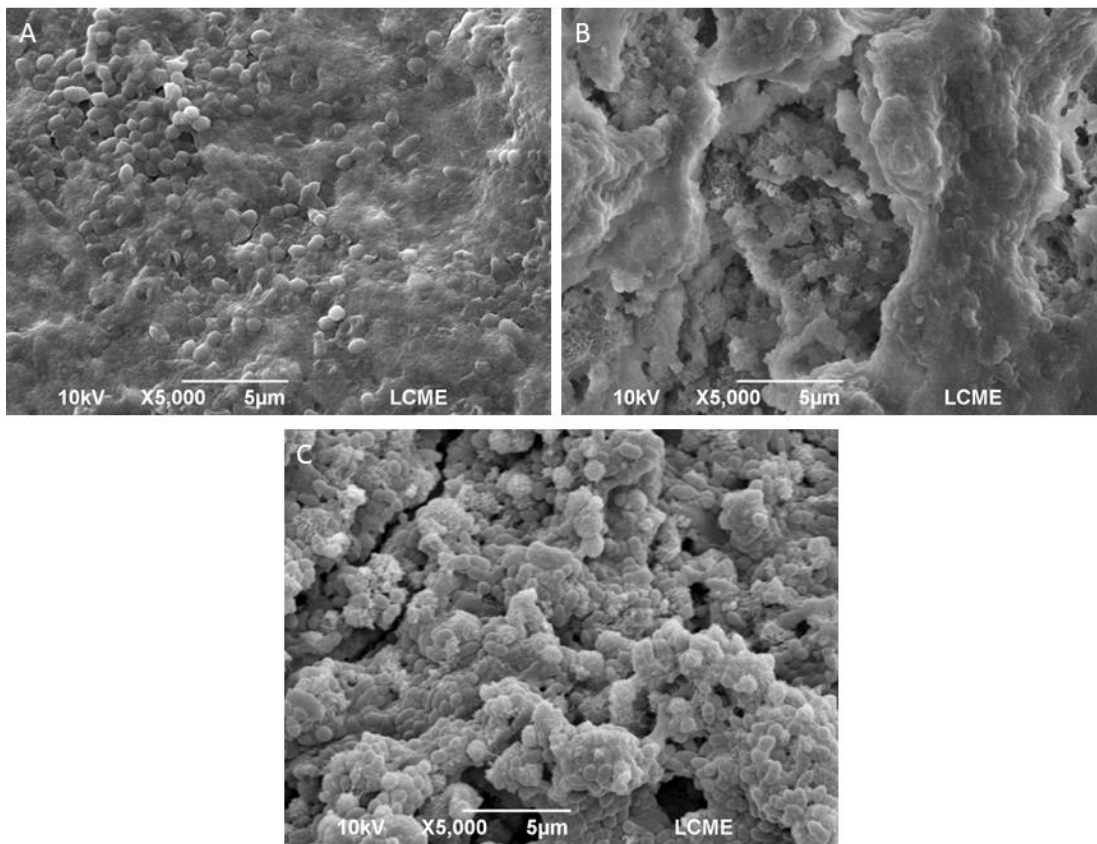


Figura 1. Microrganismos aderidos do grupo controle nos períodos de 24h (a), 7 dias (b) e 15 dias (c).



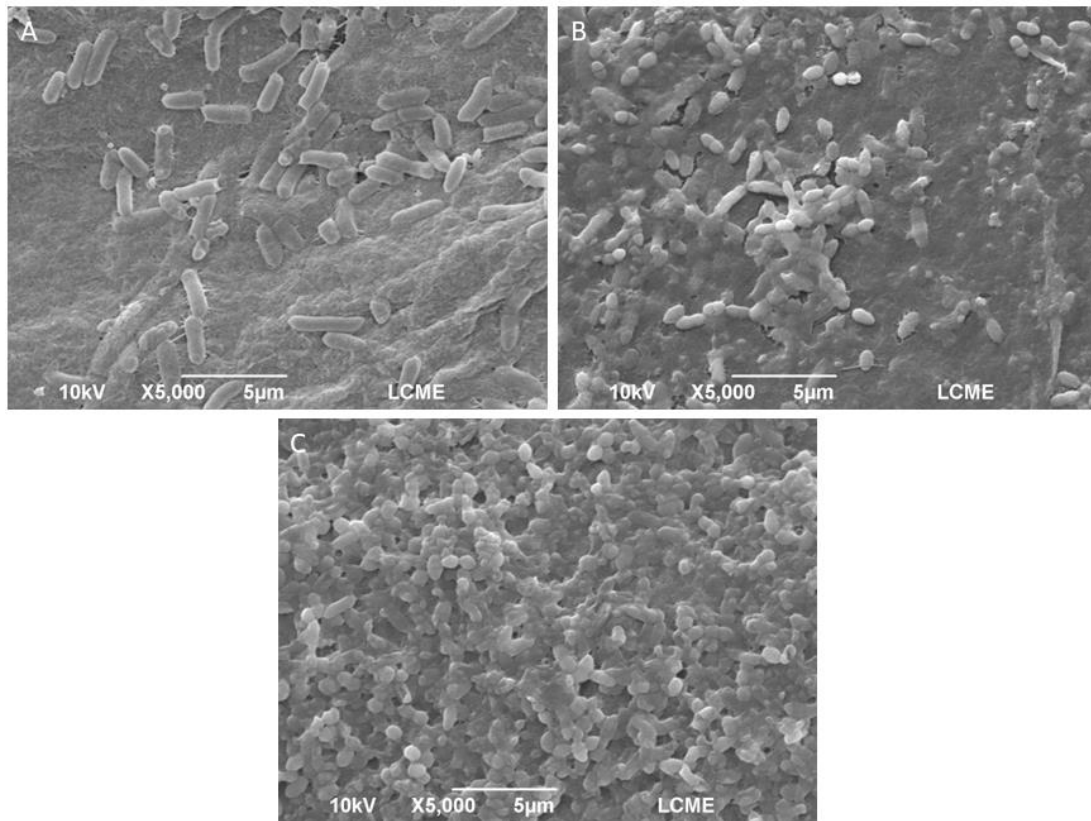


Figura 2. Microrganismos aderidos as membranas com clorexidina nos períodos de 24h (a), 7 dias (b) e 15 dias (c).



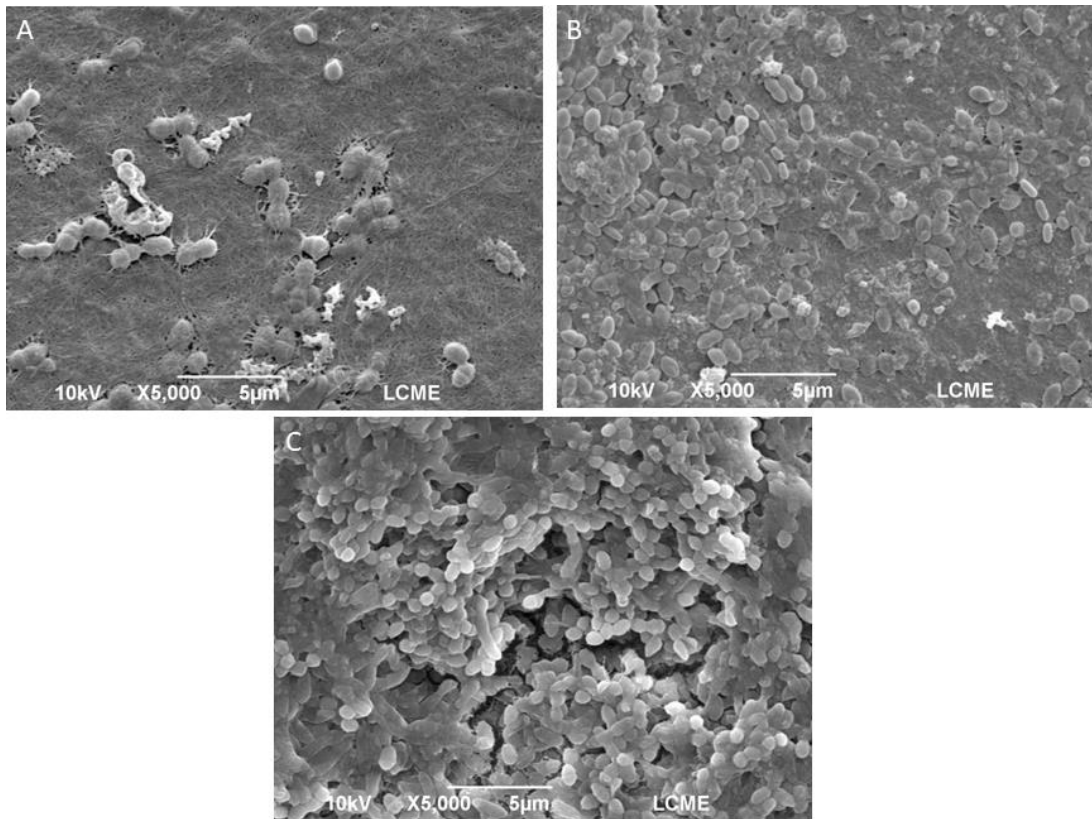


Figura 3. Microrganismos aderidos as membranas com clindamicina nos períodos de 24h (a), 7 dias (b) e 15 dias (c).



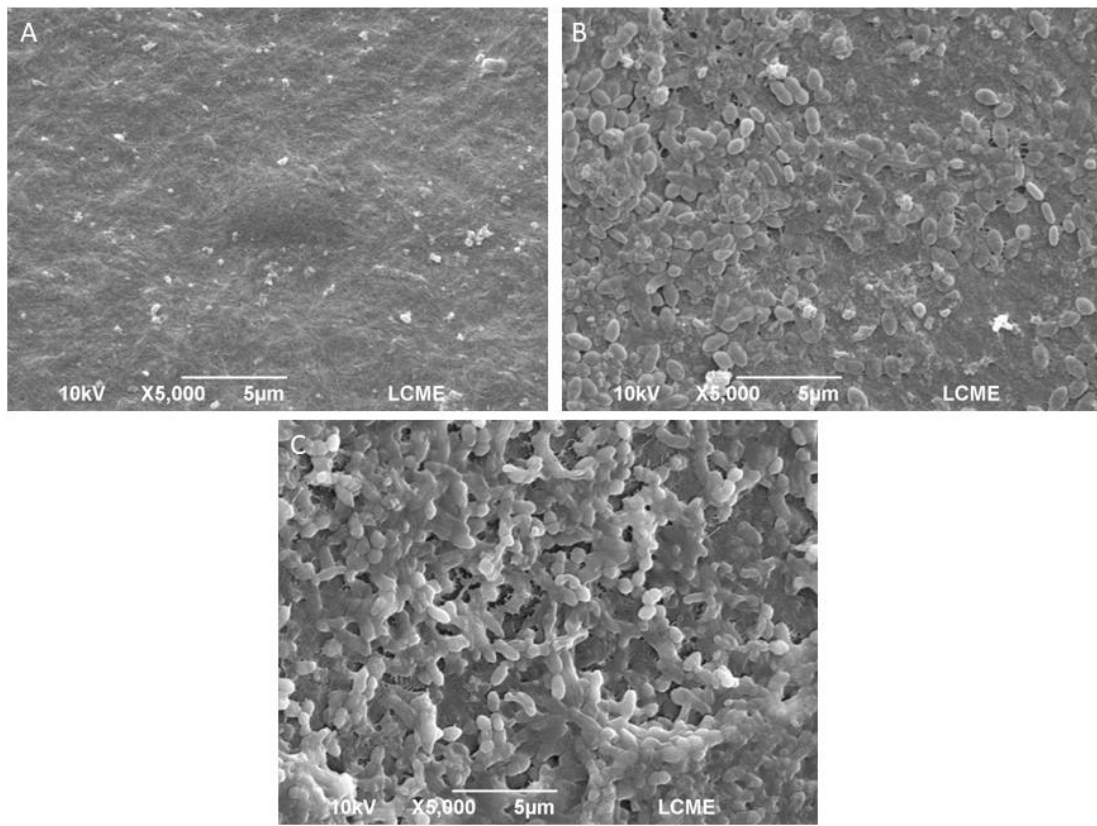


Figura 4. Microrganismos aderidos as membranas com amoxicilina nos períodos de 24h (a), 7 dias (b) e 15 dias (c).



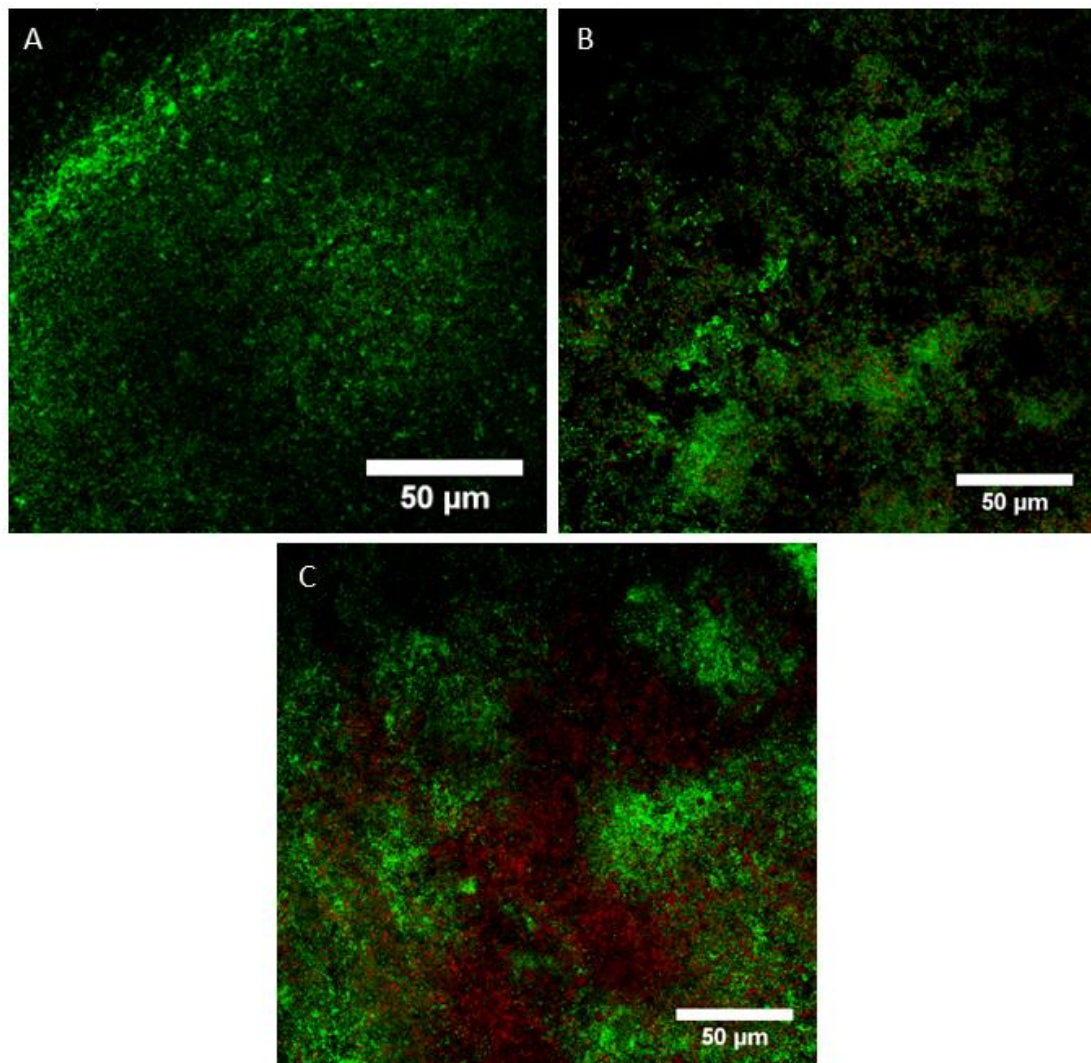


Figura 5. Microrganismos aderidos do grupo controle nos períodos de 24h (a), 7 dias (b) e 15 dias (c).



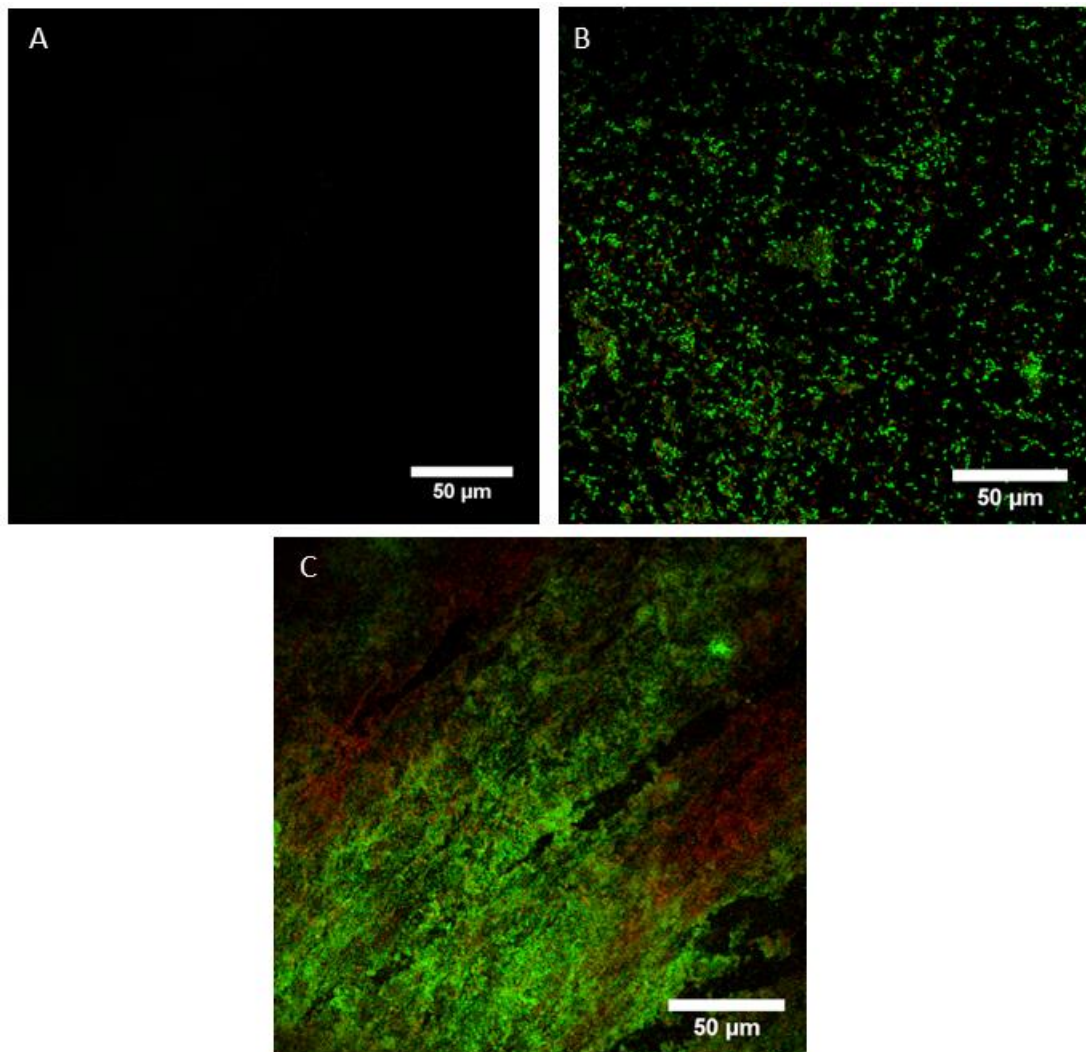


Figura 6. Microrganismos aderidos as membranas com clorexidina nos períodos de 24h (a), 7 dias (b) e 15 dias (c).



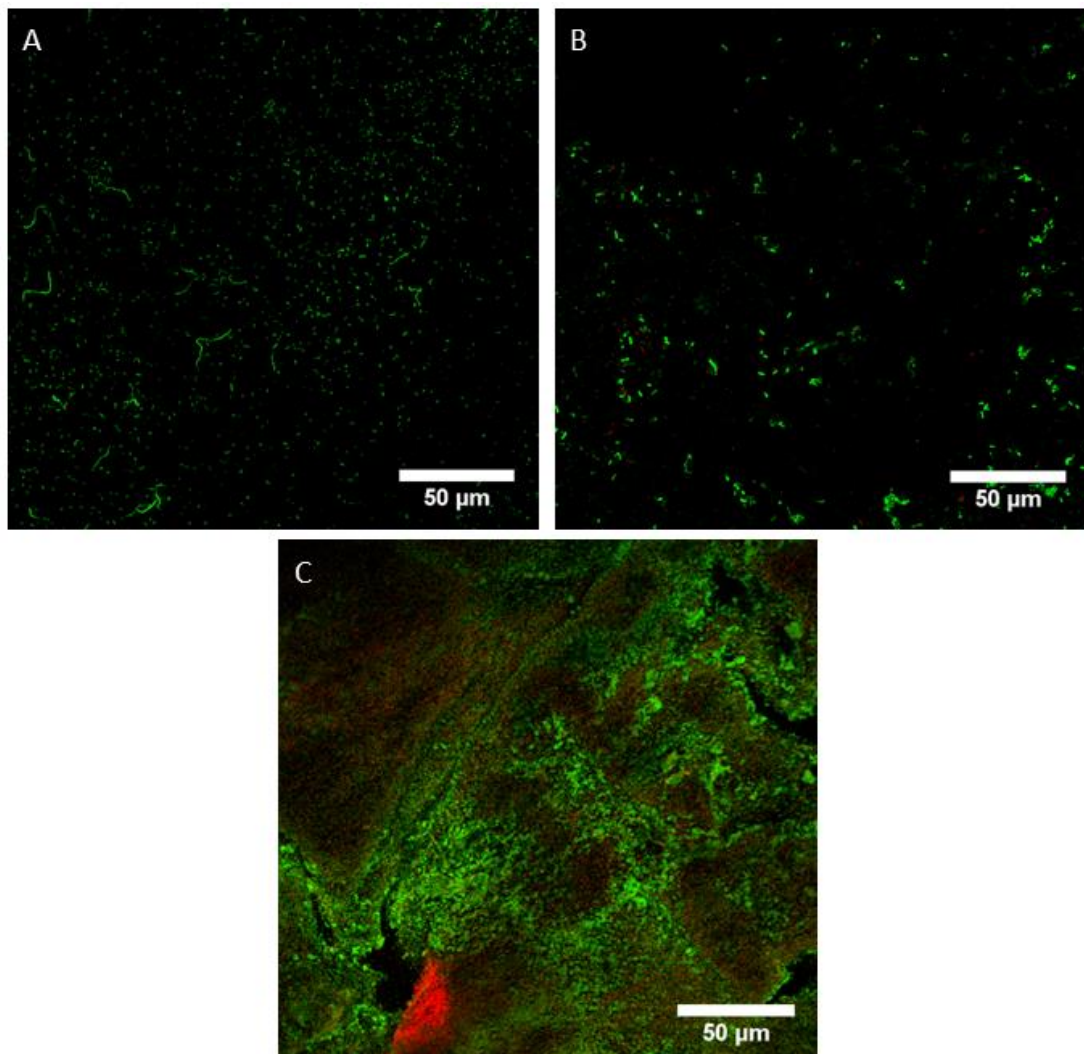


Figura 7. Microrganismos aderidos as membranas com clindamicina nos períodos de 24h (a), 7 dias (b) e 15 dias (c).



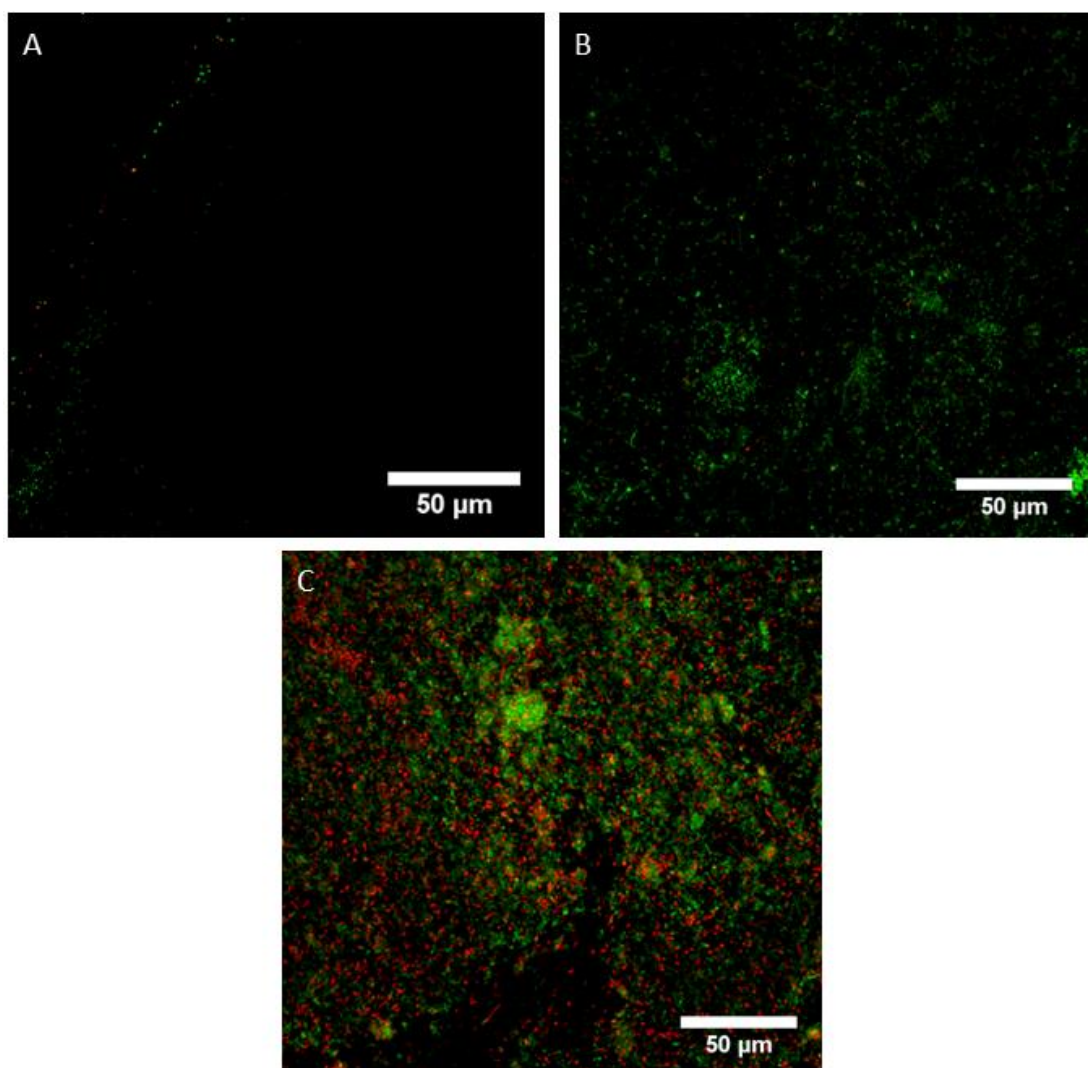


Figura 8. Microrganismos aderidos as membranas com amoxicilina nos períodos de 24h (a), 7 dias (b) e 15 dias (c).

Tabela 1. Valores médios (\log_{10}) e desvio padrão de UFCs/mL correspondente às bactérias aderidas às membranas incorporadas com diferentes antimicrobianos, nos períodos experimentais.

Grupo	Log UFCs/mL \pm DP		
	24 horas	7 dias	15 dias
Controle	$7,35 \pm 0,22$ ^{aA}	$8,08 \pm 0,04$ ^{abA}	$8,63 \pm 0,2$ ^{bA}
Clorexidina	$7,04 \pm 0,22$ ^{aA}	$8,08 \pm 0,03$ ^{bA}	$8,49 \pm 0,23$ ^{bA}
Clindamicina	$6,05 \pm 0,21$ ^{ab}	$7,85 \pm 0,04$ ^{bA}	$8,33 \pm 0,24$ ^{bA}



Amoxicilina	$4,04 \pm 0,18$ ^{aC}	$7,9 \pm 0,03$ ^{bA}	$8,41 \pm 0,25$ ^{bA}
-------------	-------------------------------	------------------------------	-------------------------------

Different lower-case letters in the same line and different capital letters in the same column indicated significant difference.

No período de 24h, BNC/AMOX inibiu a formação de biofilme na membrana, comparada aos demais grupos ($P < 0,05$). Contudo, os valores de UFC aumentaram ao longo do período experimental, sem diferença significativa comparada à BNC/C ($P > 0,05$). Por outro lado, BNC/CHX permitiu a formação densa de biofilme já em 24h, a qual aumentou progressivamente ao longo do período experimental, com valores de UFC semelhante ao controle ($P > 0,05$). BNC/CLI inibiu significativamente a formação de biofilme comparada à BNC/C apenas no período de 24h ($P < 0,05$); nos demais períodos, os valores de UFC foram semelhantes ($P > 0,05$).

No presente estudo, a atividade antibiofilme de *scaffolds* de BNC impregnados com clorexidina e antibióticos foi avaliada. BNC/AMOX apresentou efeito antibiofilme superior aos demais grupos. A amoxicilina é um antibiótico de amplo espectro (9), com propriedades antimicrobianas contra diversos microrganismos, dentre eles o *E. faecalis*, fortemente associado aos casos de insucesso endodôntico (10). Frequentemente, bactérias associadas aos abscessos endodônticos apresentam grande suscetibilidade a esse medicamento, quando administrado de maneira sistêmica (11).

Os *scaffolds* incorporados com clindamicina apresentaram menor adesão bacteriana no período de 24h, quando comparados às BNC/CHX e BNC/C. Contudo, com ação inferior à BNC/AMOX. A clindamicina possui eficácia antimicrobiana comprovada contra um amplo espectro de bactérias encontradas em infecções endodônticas (7). Um estudo prévio, que também incorporou clindamicina à BNC, demonstrou potencial de ação antimicrobiana similar em um período de 24 h (7), no entanto, quando este antimicrobiano foi incorporado a outros tipos de *scaffolds*, demonstrou uma ação dependente da espécie bacteriana (12). Apesar de serem capazes de inibir o crescimento de variadas espécies, *scaffolds* incorporados com clindamicina têm demonstrado maior ação contra *A. naeslundii*, microrganismo do tipo bastonete (12). Tal fato pode explicar os achados do presente estudo, no qual, nas primeiras 24h, foi observada uma predominância de microrganismos do tipo cocos.

No presente estudo, BNC/CHX apresentou resultados inferiores comparado aos demais grupos. A clorexidina tem sido recomendada tanto como solução irrigadora (12), como medicação intracanal, devido a sua atividade antimicrobiana (12). Trata-se de um agente antimicrobiano de amplo espectro, inclusive contra o *E. faecalis* (12). Sua eficácia, entretanto, é dependente da concentração (12), desse modo, a concentração de clorexidina utilizada nesse estudo (0,12mg/mL) pode ter sido inferior à necessária para que apresentasse o efeito bactericida esperado.

A concentração desejável das substâncias utilizadas na desinfecção de canais radiculares deve ser suficiente para que se obtenha ação bactericida (16). Contudo, em se tratando dos REPs, uma concentração compatível à sobrevivência das células-tronco deve ser, obrigatoriamente, respeitada (15).

A esperada ação antimicrobiana prolongada dos *scaffolds* não foi evidenciada, visto que um crescimento significativo do biofilme multiespécie foi observado em todos os grupos, nos períodos de 7 e 15 dias. É possível que este achado esteja relacionado à liberação do fármaco inversamente proporcional à concentração incorporada na nanofibra, liberando uma porcentagem de fármaco menor quanto maior a sua carga (8). Além disso, a cinética de liberação do fármaco pode ser alterada pela variação do pH do microambiente local, observando-se uma maior liberação em pH mais baixos. A diferença no peso molecular dos antibióticos também foi apontada por Bottino et al. (8), como uma razão plausível para explicar as diferenças em termos de liberação de fármaco.

CONCLUSÕES:

Com base no exposto, pode-se concluir que BNC/AMOX demonstrou atividade antibiofilme eficiente contra *E. faecalis*, *A. naeslundii* e *S. sanguinis* em 24h. Contudo, o sistema de liberação lenta de fármacos não foi eficiente, visto que ao longo do período experimental todas as membranas permitiram a formação do biofilme multiespécie.

REFERÊNCIAS:

1. American Association of Endodontic. Considerations for regenerative procedures [Internet]. Available at: <http://www.aae.org/clinical->



[resources/regenerative-endodontics/considerations-for-regenerative-procedures.aspx](#). 2015.

2. Matoug-Elwerfelli M, Nazzal H, Duggal M, El-Gendy R. What the future holds for regenerative endodontics: novel antimicrobials and regenerative strategies. *Eur Cell Mater* 2021.
3. Althumairy RI, Teixeira FB, Diogenes A. Effect of dentin conditioning with intracanal medicaments on survival of stem cells of apical papilla. *J Endod* 2014.
4. Galler KM, Buchalla W, Hiller KA, Federlin M, Eidt A, Schiefersteiner M, Schmalz G. Influence of root canal disinfectants on growth factor release from dentin. *J Endod*. 2015.
5. Sequeira DB, Oliveira AR, Seabra CM, Palma PJ, Ramos C, Figueiredo MH, et al. Regeneration of pulp-dentin complex using human stem cells of the apical papilla: in vivo interaction with two bioactive materials. *Clin Oral Investig*. 2021;25(9):5317-5329.
6. Cesca K. Sistema de liberação de fármaco desenvolvido em matriz de nanocelulose bacteriana para o tratamento da recidiva de câncer de mama. [Tese]. Florianópolis [SC]: Universidade Federal de Santa Catarina; 2016.
7. Kichler V, Teixeira LS, Prado MM, Colla G, Schuldt DPV, Coelho BS, et al. A novel antimicrobial-containing nanocellulose scaffold for regenerative endodontics. *Restor Dent Endod* 2021.
8. Bottino MC, Kamocki K, Yassen GH, Platt JA, Vail MM, Ehrlich Y, et al. Bioactive nanofibrous scaffolds for regenerative endodontics. *J Dent Res* 2013.
9. Dornelles Jr NB. Influência da adição de microesferas contendo amoxicilina nas propriedades físicas, químicas e biológicas de um cimento endodôntico experimental. [Tese]. Porto Alegre [RS]: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2016.
10. Di Santi BT, Ribeiro MB, Endo MS, Gomes BPF de A. Avaliação da suscetibilidade antimicrobiana de bactérias anaeróbias facultativas isoladas de canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico frente aos antibióticos de uso sistêmico. *Rev odontol UNESP [Internet]*, 2015.
11. Baumgartner JC, Xia T. Antibiotic susceptibility of bacteria associated with endodontic abscesses. *J Endod* 2003.
12. Thakur V, Kaur M, Jamwal P, Thakur B. 2% Chlorhexidine in root canal treatment: A review. 2020.



13. Ruksakiet K, Hanák L, Farkas N, Hegyi P, Sadaeng W, Czumbel LM, et al. Antimicrobial Efficacy of Chlorhexidine and Sodium Hypochlorite in Root Canal Disinfection: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *J Endod* 2020.
14. Madhukumar M, Geetha P, Nair KR, Unnikrishnan M. The Effects of Double Antibiotic Paste and Amoxicillin-clavulanate Paste Used in Endodontic Regeneration on Microhardness of Radicular Dentine: An In vitro Study. *J Pharm Bioallied Sci.* 2021.
15. Ruparel NB, Teixeira FB, Ferraz CC, Diogenes A. Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla. *J Endod* 2012.

FOMENTO

Bolsa Prociência.

