



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

LUCAS FARIA MORINI LOURENÇO

**Estudo de novas alternativas biológicas na eliminação de
microrganismos envolvidos nas infecções endodônticas**

ARAÇATUBA –SP

2016

LUCAS FARIA MORINI LOURENÇO

**Estudo de novas alternativas biológicas na eliminação de
microrganismos envolvidos nas infecções endodônticas**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientadora: Prof. Ass. Dra. Cristiane Duque

ARAÇATUBA – SP

2016

DEDICATÓRIA

Dedico a minha família, especialmente aos meus pais e meus avós que me deram condições e apoio para realização de um sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, meu guia e minha fonte de luz a qual por toda trajetória me abençoou.

Agradeço a meus pais, heróis, exemplo de luta e amor que me inspiram. Obrigado por me possibilitarem o desenvolvimento, me mostrarem horizontes e acreditarem no meu potencial.

Agradeço a meus familiares pela força, energia e motivação.

Agradeço a cada amigo, pelas risadas, apoio e pela companhia.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Tit. Wilson Roberto Poi e do vice-diretor Prof. Tit. João Eduardo Gomes Filho. Obrigado à FOA- UNESP pela competência na formação de profissionais, pela infraestrutura e atenção de cada profissional envolvido durante a trajetória do curso de Odontologia.

Agradeço a Atlético XXII de Maio, instituição a qual vivi grande parte de meu tempo, aprendi muito e construí laços de amizade.

Obrigado a todos do Diretório Acadêmico Prof. Carlos Aldrovandi, grupo incrível que me ensinou a cada dia mais o humanismo, a ética, os valores e a força da voz daqueles que tem um propósito.

Agradeço a Professora Cristiane Duque, exemplo de liderança, determinação e trabalho, pela orientação nesse trabalho, pela oportunidade de estagiar por dois anos sob sua supervisão.

Agradeço a amiga Karina Sampaio Caiaffa, pela dedicação, paciência, e pelos aprendizados, os quais me capacitaram para realização desse trabalho de conclusão de curso.

A vida é muito curta para ser pequena.

Benjamin Disraeli

Lourenço, L.F.M. **Estudo de novas alternativas biológicas na eliminação de microrganismos envolvidos nas infecções endodônticas**. 2016. 30f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

RESUMO

As infecções endodônticas ocorrem como resultado da invasão de microrganismos no sistema de canais radiculares podendo atingir os tecidos perirradiculares. O primeiro passo na terapia endodôntica consiste na eliminação dos microrganismos e na prevenção das reinfecções dos canais radiculares. Substâncias derivadas de plantas estão sendo incorporados em diversos produtos odontológicos, devido às suas propriedades antiinflamatórias, antibacterianas e antifúngicas, além de não promoverem resistência antibiótica e serem biocompatíveis em concentrações terapêuticas, criando novas perspectivas biológicas para o tratamento odontológico. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a ação antimicrobiana da silimarina sobre cultura planctônica e sobre biofilme de *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299). Foram realizados ensaios em cultura planctônica para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) da silimarina. Biofilmes de *E. faecalis* foram expostos a 5x e 10x CIM da silimarina (SIL) e controle de digluconato de clorexidina (CHX). Após exposição por 24h, as culturas foram plaqueadas em MH ágar e incubadas durante 24 horas para posterior contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) por mL. Os dados obtidos foram estaticamente analisados, considerando $p < 0,05$. Os resultados mostraram que a concentração de 1,25mg/mL de SIL foi considerada CIM pois reduziu 51,62% do crescimento de *E. faecalis*, entretanto, somente 5mg/mL de SIL foi suficiente para eliminar 100% de *E. faecalis* e considerada CBM. Nos ensaios de biofilme, SIL 10x CIM foi o agente que apresentou melhor efeito contra biofilme de *E. faecalis*, reduzindo em cinco casas logarítmicas o crescimento deste microrganismo. SIL 5x e CHX 10x apresentaram resultados semelhantes, reduzindo duas casas logarítmicas o crescimento de *E. faecalis*. CHX 5X não diferiu dos controles. Conclui-se que silimarina apresenta ação contra *E. faecalis*, em condições planctônicas e em biofilme, mostrando-se um agente biológico promissor para a eliminação de microrganismos envolvidos na infecção endodôntica.

Palavras-chaves: Biofilmes, Silimarina, *Enterococcus faecalis*, Teste de Sensibilidade Microbiana.

Lourenço, L.F.M. **Study of new biological alternatives for elimination of microorganisms involved in endodontic infections.**2016. 30f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

ABSTRACT

Endodontic infections occur because of the microorganisms invasion of the root canal system and can reach the periradicular tissues. The first step in endodontic therapy consisted on the elimination of microorganisms and prevention of reinfection of root canals. Herbal substances have been incorporated in various dental products, due to its anti-inflammatory, antibacterial and antifungal activities, besides no promote antibiotic resistance and be biocompatible at therapeutic concentrations, creating new biological perspectives for dental treatment. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial action of silymarin on planktonic culture and on biofilms of *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299). Planctonic assays were performed to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of silymarin. Biofilms of *E. faecalis* were exposed to 5X and 10X MIC silymarin (SIL) and the control chlorhexidine digluconate (CHX). After exposure for 24h, the cultures were plated on Mueller-Hinton agar and incubated for 24 hours to count the colony forming units (CFU) per ml. The data were statistically analyzed, considering $p < 0.05$. The results showed that the SIL at 1.25mg/mL was considered CIM because reduced 51.62% of *E. faecalis* growth, however, only SIL at 5mg/mL was sufficient to eliminate 100% of *E. faecalis* and considered CBM. In biofilm tests, SIL 10x MIC was the agent who showed the best effect against biofilms of *E. faecalis*, reducing five logarithmic houses of *E. faecalis* growth. SIL 5x and 10x CHX showed similar results, reducing two logarithmic houses of *E. faecalis* growth. CHX 5X did not differ from controls. Concludes that silymarin has action against *E. faecalis* in planktonic and biofilm conditions, showing a promising biological agent for the elimination of microorganisms involved in endodontic infections.

Keywords: Biofilms, Silymarin, *Enterococcus faecalis*, Microbial Tests.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. CIM e CBM (em mg/mL) de silimarina (SIL) e clorexidina (CHX) contra *E. faecalis* 20

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito da silimarina (SIL) e clorexidina (CHX) sobre biofilme de *E. faecalis*.
SIL – silimarina, CHX – clorexidina, CONT – controle, 5x CIM, 10x CIM 21

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC - American Type Culture Collection
BHI – Brain heart infusion
BHIA - Brain Heart Infusion Agar
BMP - Bone morphogenetic protein
CBM – concentração bactericida máxima
CHX – clorexidina
CIM – concentração inibitória mínima
CLSI - Clinical & Laboratory Standards Institute
CO₂ – dióxido de carbono
DNA- ácido desoxirribonucleico ml – mililitros
EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid
H₂O – água
HC – hidróxido de cálcio
MH – Mueller-Hinton
MTA – agregado de trióxido mineral
NaCl – cloreto de sódio
PCR - Polymerase Chain Reaction
PFGE - *Pulsed field gel electrophoresis*
RANKL - Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand
RAPD - *Random Amplification of Polymorphic DNA*
rRna – ácido ribossomal ribonucléico
RUNX2 - Runt-related transcription factor 2
SIL - silimarina
TNF- α - Fator-alfa de Necrose Tumora
UFC – unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	16
3	MATERIAIS E MÉTODOS	17
4	RESULTADOS	20
5	DISCUSSÃO	22
6	CONCLUSÃO	25
	REFERÊNCIAS	26

1 Introdução

As infecções endodônticas ocorrem como resultado da invasão de microrganismos no sistema de canais radiculares podendo atingir os tecidos perirradiculares. Assim o primeiro passo na terapia endodôntica consiste na eliminação dos microrganismos e na prevenção das reinfecções dos canais radiculares (NAIR, 2004). Os microrganismos e a seus fatores de virulência são os principais agentes para o surgimento de periodontites apicais pós-tratamento. Além de alguns deles serem resistentes ao preparo químico-mecânico ou também chamado de biomecânico, eles podem infiltrar a porção coronária do elemento dental através de selamentos coronários deficientes. Técnicas de biologia molecular e cultura microbiana confirmaram que *Enterococcus faecalis* é um dos microrganismos mais prevalentes encontrados no canal radicular após o tratamento endodôntico (PINHEIRO et al., 2003; ENDO et al., 2014).

Enterococcus são cocos Gram positivos que podem ser encontrados isolados ou em pares, ou mesmo em curtas correntes. São anaeróbios facultativos, que possuem a capacidade de crescerem na presença ou ausência de oxigênio (GILMORE, 2002; RÔÇAS et al., 2004). Eles podem metabolizar uma variedade de fontes de energia, como, hidratos de carbono, glicerol, lactato, malato, citrato, arginina, entre outros (GILMORE, 2002). *E. faecalis* foi associado com diferentes formas de doença perirradicular incluindo infecções endodônticas primárias ou persistentes. Entre as infecções primárias, *E. faecalis* foi encontrado mais frequentemente em lesões perirradiculares crônicas assintomáticas que com periodontites perirradiculares agudas ou abscessos perirradiculares agudos, de 4 a 40% dos casos destas infecções (Roças et al., 2004). A frequência de *E. faecalis* em lesões perirradiculares persistentes é muito maior, em torno de 9 vezes mais provável encontrar essa espécie que nos casos de infecções primárias. A prevalência de *E. faecalis* em lesões perirradiculares recorrentes é de 24 a 77% (HANCOCK et al., 2001; ROÇAS et al., 2004 GOMES et al., 2004).

Idealmente, para que uma medicação intracanal seja eficiente, ela deve promover a eliminação e impedir a proliferação de microrganismos remanescentes, atuar como barreira físico-química contra a infecção ou a reinfecção por microrganismos, reduzir a inflamação perirradicular, neutralizar produtos tóxicos, controlar a reabsorção dentinária inflamatória externa, além de estimular a reparação por tecido mineralizado (SIQUEIRA e LOPES, 1999).

Porém, estudos vêm mostrando a resistência de *E. faecalis* ao cimento de hidróxido de cálcio, principal medicação intracanal utilizada atualmente para tratamento endodôntico, tanto para casos de biopulpectomias quanto para necropulpectomias. Essa resistência pode ser explicada por sua capacidade de sobreviver em ambientes muito hostis, incluindo pH de extrema alcalinidade (em torno de 9) e as altas concentrações de sal, podendo resistir a sais biliares, detergentes, metais pesados, azida, etanol e até mesmo a dessecação (TENDOLKAR et al. 2003; GILMORE, 2002).

No interior de túbulos dentinários, foi demonstrado que *E. faecalis* é capaz de resistir ao hidróxido de cálcio por mais de 10 dias (HAAPASALO e ORSTAVIK 1987; ORSTAVIK e HAAPASALO, 1990). Essas espécies podem crescer em intervalo de 10 a 45°C e podem sobreviver a temperaturas de até 60°C durante 30 minutos (TENDOLKAR et al. 2003). Os mecanismos de resistência de *E. faecalis* resultam de mudanças fisiológicas ou estruturais na célula bacteriana, uma estratégia de sobrevivência ao ataque dos agentes antimicrobianos (ENDO et al., 2014). As principais espécies de *Enterococcus* adquiriram determinantes genéticos que conferem resistência a várias classes de antibióticos, como, eritromicina, clindamicina, cloranfenicol, tetraciclina e vancomicina (ENDO et al., 2014; GOMES et al., 2011). Eles também são capazes de compartilhar características de virulência entre as espécies, contribuindo ainda mais para sua sobrevivência e capacidade em causar doença (JETT et al., 1994). *E. faecalis* é capaz de formar biofilme 1000 vezes mais resistentes à fagocitose, à anticorpos e aos antimicrobianos usados atualmente (DISTEL et al., 2002).

Devido à resistência de *E. faecalis* às medicações intracanal, novas propostas de tratamento estão sendo estudadas. Substâncias naturais derivadas de plantas medicinais são fontes abundantes de compostos biologicamente ativos que poderiam ser base para o desenvolvimento de novos medicamentos. Em Odontologia, produtos derivados de plantas estão sendo incorporados em dentifrícios, enxaguatórios e materiais dentários, devido às suas propriedades antiinflamatórias, antibacterianas e antifúngicas, além de não promoverem resistência antibiótica e serem biocompatíveis em concentrações terapêuticas, criando novas perspectivas biológicas para o tratamento odontológico (HOTWANI et al., 2014; VERONICA et al., 2015). Estudos têm demonstrado a eficácia antimicrobiana e antiinflamatória de extratos de plantas isolados e/ou

combinados contra patógenos da cárie dentária e doença periodontal (CHANDRA SHEKAR et al., 2015).

Fitoquímicos são moléculas promissoras que estão sendo estudadas na prevenção e tratamento de doenças orais, pois atuam tanto na eliminação dos patógenos quanto no controle da resposta inflamatória do organismo (PALASKA et al., 2013). Flavonoides são exemplos desses fitoquímicos, compostos fenólicos encontrados em células vegetais. São detectados nas frutas, sementes, nozes, caules e flores, bem como nos derivados das plantas, como chás, vinho, própolis e mel e representam um constituinte comum da dieta humana (CUSHNIE e LAMB, 2005). Os flavonoides apresentam estrutura química comum, sendo constituídos por dois anéis aromáticos (A e B) unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado de anel C. De acordo com as variações no anel C, os flavonoides são divididos em seis classes principais: flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonoides e antocianidinas. Substituições dos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonoides (CUSHNIE e LAMB, 2005). Diversas são as propriedades clínicas dos flavonoides já relatadas na literatura, entre elas, atividade antioxidante, inibição enzimática, atividade antiinflamatória, atividade vascular, estrogênica, anti-tumor e atividade antimicrobiana. Assim, não é surpresa que o interesse pela pesquisa com essas substâncias tem crescido na área biomédica (HARBORNE e WILLIAMS, 2000).

O termo “fitoestrógenos” inclui principalmente dois grupos de compostos, os isoflavonoides e os lignanos, que estão presentes em quantidade significativa na dieta humana (LAMPE et al., 2003). Apesar de terem sido identificados originalmente por sua fraca atividade estrogênica, os isoflavonoides têm uma variedade de atividades biológicas, modulando fatores de risco para doenças crônicas, como as cardiovasculares e ósseas (NESTEL et al., 1997; POTTER et al., 1998). Isoflavonoides são encontrados em várias leguminosas, como soja, lentilhas, feijões, entretanto, os grãos de soja são os alimentos que apresentam consideráveis quantidades de isoflavonoides. Alguns deles apresentam potencial como terapias de quimioprevenção contra problemas associados com a menopausa, em particular a osteoporose, também com doenças cardiovasculares e tumores (MCCUE e SHETTY, 2015).

Os óleos de sementes (linhaça, soja), cereais integrais (trigo, aveia, centeio), entre outros, são ricos em lignanos (LAMPE et al., 2003). A forma

flavonolignano é composta de uma parte flavonoide e uma parte lignano. Uma fonte rica de flavonolignanos é a silimarina, um extrato do caldo do “leite” das sementes de *Silybum marianum*. A silimarina é um flavonoide polifenólico constituída por uma mistura de três principais isômeros estruturais: silibinina, isosilibina e silicristina (VALENZUELA e GARRIDO, 1994; SKOTTOVÁ et al., 2004). O mecanismo de ação da silimarina ainda está por ser definida e provavelmente é multifatorial (Saller et al. 2008). A silimarina também exerce importante ação antiinflamatória *in vivo*, sendo utilizada no tratamento clínico de doenças hepáticas inflamatórias e alcoólicas (Johnson et al., 2003; Falasca et al., 2008). A silibinina é o componente mais ativo da silimarina (*Silybum marianum*) que possui efeitos antiinflamatórios, citoprotetores, antifibróticos e anticarcinogênicos. Também apresenta potencial em inibir a formação de osteoclastos pela atenuação das cascatas associadas à RANKL e TNF- α . (YING et al. (2013) também mostrou que silibinina aumenta a diferenciação osteoblástica pela indução da expressão de BMPs e ativação das vias RUNX2 e BMP. Quanto à atividade antimicrobiana, silibinina apresentou excelente efeito contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis* (ÖZÇELİK et al., 2011).

2 Objetivos

A proposta do trabalho é analisar a ação antimicrobiana da silimarina sobre cultura planctônica e sobre biofilme de *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299), principal microrganismo envolvido em casos de reinfecção do sistema de canais radiculares.

3 Materiais e métodos

3.1 Preparo dos agentes antimicrobianos

A silimarina avaliada no estudo foi manipulada a partir do extrato das sementes de Cardo-mariano ou *Silybum marianum* (80% de Silimarina e demais excipientes – celulose, celulose vegetal da cápsula, estearato de magnésio, amido de milho sem açúcar) pela Farmácia de manipulação Farma Fórmula, Araçatuba, São Paulo, Brasil. Esta foi dissolvida em uma concentração inicial de 10 mg em álcool etílico (P.A – ACS - Dinâmica®) a 50% em água deionizada estéril e estocadas em microtubos em temperatura de 4°C. A solução de digluconato de clorexidina (CHX 20% em H₂O), utilizada como controle no presente estudo, foi dissolvida em água deionizada estéril para uma concentração de 20 mg/mL. Todas as soluções foram filtradas com filtros acoplados à seringa de membranas de 0,2 µm (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil).

3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

3.2.1. Cepas bacterianas e as condições de crescimento

A atividade antimicrobiana da silimarina foi avaliada contra a cepa padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299), gentilmente cedida pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ - Rio de Janeiro, Brasil). A pureza da cepa foi confirmada pelo método de Gram. Suspensões microbianas foram preparadas a partir de culturas previamente cultivadas em Brain Heart Infusion Agar - BHIA (Disco Laboratories), e incubadas a 37°C durante 24 h em atmosfera de 5% de CO₂ (Incubadora, HF212-UV). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e em três dias independentes.

3.2.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM)

A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) foram obtidos pelo método de microdiluição em caldo usando placas de microtitulação de 96 poços, com base nos critérios da CLSI M7-A9 (2012) para bactérias e modificadas por MOR et al. (1994). Após a reativação, *E. faecalis* foi cultivado em caldo de BHI a 37°C durante 24 h em 5% de CO₂. A cultura microbiana foi cultivada até atingir a densidade óptica corresponde a fase mediana logarítmica (midlog) – OD = 0,5 (Abs 550nm) estabelecidas previamente para o microrganismo e este foi diluído 1000x em caldo Mueller

Hinton (MH) 2x concentrado. A concentração final da suspensão de bactéria no interior dos poços foi de aproximadamente $1-5 \times 10^5$ UFC/ml. Digluconato de clorexidina (CHX) foi utilizado como controle positivo e as culturas sem o agente antimicrobiano como controles negativos. A silimarina foi diluída em série (concentrações de 5000 a $0,24 \mu\text{g/mL}$) em água deionizada esterilizada, de forma a obter suas concentrações de forma decrescente. $50 \mu\text{L}$ das suspensões microbianas foram inoculadas em $50 \mu\text{l}$ da diluição seriada da silimarina em cada um dos poços. As microplacas foram incubadas a 37°C durante 24 horas. Em seguida, $15 \mu\text{L}$ de resazurina (R7017 Sigma-Aldrich) a 0,01% foram aplicados em cada poço e incubados durante 4h para determinar a viabilidade celular. Após a incubação, o último poço azul (CIM) e, pelo menos, três poços anteriores foram diluídas em série e plaqueadas em MH agar para a determinação do CBM. As bactérias viáveis foram contadas para determinar o número de unidades formadoras de colônia/mL (UFC/mL).

3.2.3. Formação de biofilme em microplacas de poliestireno

Os ensaios foram conduzidos com biofilmes de *E. faecalis* e os agentes antimicrobianos (silimarina e CHX) foram aplicados nas concentrações de 5x ou 10x de sua CIM. Esses ensaios foram realizados de acordo com BUDZYŃSKA et al. (2011) com algumas modificações. Em microplacas de poliestireno estéril de 96 poços de fundo em U, $20 \mu\text{l}$ da suspensão de *E. faecalis* (aproximadamente $1-5 \times 10^8$ UFC/ml) foram inoculados em cada um dos poços contendo $180 \mu\text{l}$ de BHI caldo suplementado com 1% de glicose. As placas foram incubadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO_2 . Após 24 horas, os meios de culturas foram removidos e os poços foram lavados com solução salina estéril (NaCl a 0,9%) para subsequente adição dos $20 \mu\text{l}$ do agente antimicrobiano (silimarina/controles) e $180 \mu\text{l}$ de BHI glicose a 1%. As microplacas foram incubadas novamente nas mesmas condições durante 24 horas. Todos os poços foram plaqueados em BHI ágar e as placas incubadas durante 24 horas para posterior contagem das UFC/ml. A clorexidina (5 ou 10x CIM) foram usadas como controles positivos, bem como biofilme em água ou em etanol 50% sem agentes antimicrobianos para avaliar a viabilidade dos microrganismos testados sem fornecer nutrientes ou agentes tóxicos para eles.

3.3. Análise estatística

Os dados de contagem bacteriana (UFC) foram convertidos em log₁₀ para posterior análise estatística dos dados. Após verificação da homocedasticidade dos dados pelo teste de Levene, os valores de log UFC da atividade sobre biofilme de *E. faecalis* foram submetidos aos testes de ANOVA/Tukey, considerando $p < 0,05$. As análises foram realizadas no programa estatístico SPSS versão 17.0.

4 Resultados

4.1. Determinação da CIM e CBM

A tabela 1 mostra os resultados obtidos de CIM e CBM para a silimarina e clorexidina contra *E. faecalis*. Os resultados mostraram que a concentração de 1,25mg/mL de silimarina foi considerada CIM pois reduziu 51,62% do crescimento de *E. faecalis*, entretanto, somente 5mg/mL foi suficiente para eliminar 100% de *E. faecalis* e considerada CBM. A clorexidina teve efeito bactericida em concentração bem inferior a da silimarina (0,01 mg/mL), como esperado para controle positivo do experimento.

Tabela 1. CIM e CBM (em mg/mL) de silimarina (SIL) e clorexidina (CHX) contra *E. faecalis*

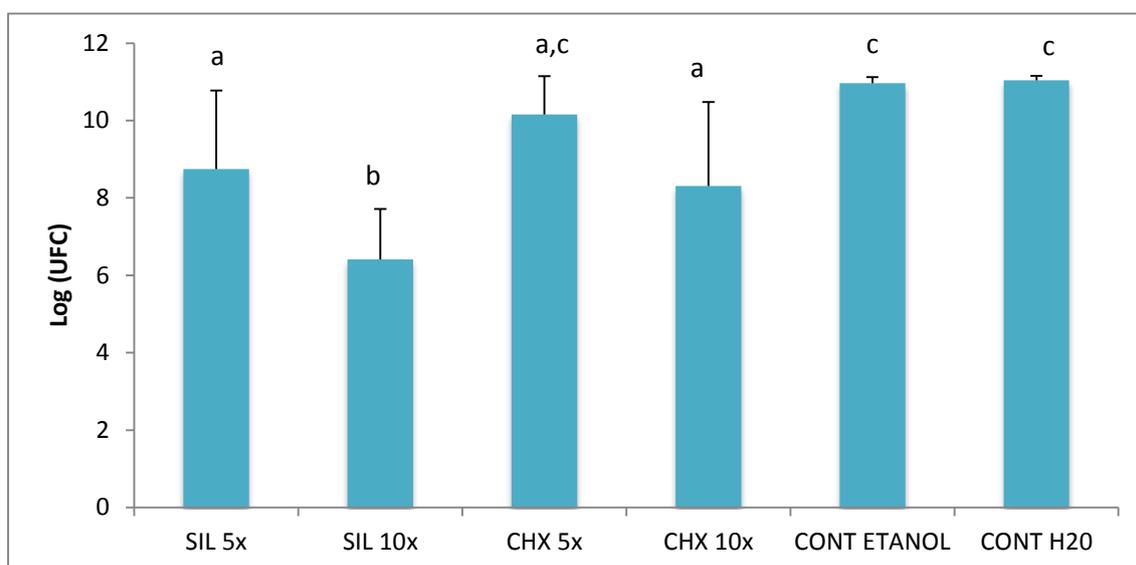
	CIM	CBM
	% redução bacteriana* Média (Desvio Padrão)	% redução bacteriana Média (Desvio Padrão)
SIL	1,25	5
	51,62 (1,33)	100
CHX	0,005	0,01
	78,46 (3,73)	100

* Calculada a partir do controle – meio de cultura sem antimicrobianos – 100% de crescimento Fórmula: $100 - (\text{valor log UFC do antimicrobiano} * 100) / \text{valor log UFC do controle sem antimicrobiano}$.

4.2. Atividade contra biofilme de *E. faecalis*

A figura 1 mostra os valores de contagem bacteriana em log (UFC) após aplicação de silimarina (SIL) ou clorexidina (CHX) na concentração de 5x ou 10x da CIM. Os resultados mostraram que SIL na concentração de 10x CIM foi o agente que apresentou melhor efeito contra biofilme de *E. faecalis*, reduzindo em cinco casas logarítmicas o crescimento deste microrganismo. SIL 5x e CHX 10x apresentaram resultados semelhantes, reduzindo duas casas logarítmicas o

crescimento de *E. faecalis*. CHX 5X não diferiu dos controles – meio de cultura contendo ou não etanol a 50% (diluyente da silimarina).



	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
SIL 5x	8,747688503	2,024759258
SIL 10x	6,407042685	1,304254497
CHX 5x	10,15785436	0,987872964
CHX 10x	8,307895198	2,16957408
CONT ETANOL	10,96670099	0,156092533
CONT H2O	11,04246717	0,114477948

Figura 1. Efeito da silimarina (SIL) e clorexidina (CHX) sobre biofilme de *E. faecalis*. SIL – silimarina, CHX – clorexidina, CONT – controle, 5x CIM, 10x CIM.

^a Letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, de acordo com ANOVA/Tukey, $p < 0,05$.

5 Discussão

As plantas sintetizam uma mistura de compostos químicos com ampla ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas com a intenção de se proteger da infecção microbiana (LEWIS, 2001). A silimarina é uma mistura de isômeros de flavonolignanos: silibina (ou silibinina), isosilibina, dehidrosilibina, silicristina, silidianina e dois flavonoides, taxifolina e quercetina. Essa mistura é extraída principalmente das sementes secas da planta *Silybum marianum* ou conhecida como cardo de leite (*milk thistle*), encontrada nos EUA, Europa e África do Sul. Estudos prévios tem mostrado que a silimarina ou seus componentes isolados apresentam ação contra diversas espécies bacterianas (JUNG & LEE, 2008; KANG et al., 2011; EVREN & YURTCU, 2015) e fúngicas (LEE et al., 2011). No presente estudo, a silimarina a 1,25mg/mL inibiu 51,62% (CIM) e a 5mg/mL inibiu 100% (CBM) do crescimento de *E. faecalis*, em condições planctônicas. Evren & Yurtcu (2015) determinaram a CIM e CBM de silimarina (Sigma S0292) sobre bactérias Gram-positivas como: *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. epidermidis* ATCC 35984, *S. aureus* ATCC 29213, MRSA ATCC 43300 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e bactérias Gram - negativas como *K.pneumonia* ATCC 700603, *P. aeruginosa* ATCC 27853, e *E. coli* ATCC 25922. Os valores de CIM variaram de 60 a >241µg/mL. As bactérias Gram-positivas foram inibidas em concentrações entre 60 e 120 µg/mL e os valores de CBM foram maiores que 241 µg/mL. Neste estudo, *E. faecalis* teve seu crescimento inibido por 120 µg/mL de silimarina. Comparando-se com o estudo de Lahlah et al. (2012), extratos butanólicos ou de clorofórmio de *Silybum marianum* apresentaram CIM para *Staphylococcus albus* que variaram de 7 a 10mg/mL e CBM de 28 a 41 mg/mL. Essas diferenças nas concentrações de CIM e CBM dos estudos são inerentes ao método usado para determinação da atividade antimicrobiana e também do tipo/fonte ou dose dos extratos dos agentes antimicrobianos (LEE et al., 2011; KANG et al., 2011; LAHLAH et al., 2012; EVREN & YURTCU, 2015).

No presente estudo, a ação contra biofilme de *E. faecalis* também foi testada. Os resultados mostraram que silimarina na concentração de 10x CIM foi o agente que apresentou melhor efeito contra biofilme de *E. faecalis*, reduzindo em cinco casas logarítmicas o crescimento deste microrganismo. Silimarina 5x reduziu duas casas logarítmicas o crescimento de *E. faecalis*. Evren & Yurtcu

(2015) observaram que a viabilidade celular em biofilmes de *S. epidermidis* ATCC 35984 foi reduzida pela silimarina de maneira dose-dependente. Assim, houve redução de 13, 46 e 99% do biofilme com 0,03, 0,5 e 1 mmol/L (aproximadamente 0,5 mg/mL) de silimarina. Segundo esses autores, este é o primeiro estudo que avalia a ação antibiofilme da silimarina, dificultando assim comparação dos resultados obtidos. Os biofilmes são comunidades de microrganismos que se acumulam em uma matriz polimérica extracelular. A habilidade de alguns microrganismos em formar biofilme contribui para a resistência antibiótica e falhas no tratamento (HALL et al., 2014). A combinação de agentes antimicrobianos vem sendo estudada para promover o uso efetivo de antibióticos, aumentando sua atividade, sem causar resistência microbiana e reduzindo a toxicidade (JUNG & LEE, 2008). Assim, diversos autores estão propondo a associação da silimarina ou de seus componentes principais, como a silibinina, com antibióticos, a fim de verificarem possíveis sinergismos entre esses agentes antimicrobianos e reduzir a concentração de uso de ambos os agentes. De Oliveira et al. (2015) observaram que a combinação de silimarina reduziu os valores de CIM para aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina) contra *Escherichia coli* e *S. aureus* e ambas silimarina e silibinina reduziram a CIM de ciprofloxacina contra *Pseudomonas aeruginosa*. Kang et al. (2011) também observaram efeitos sinérgicos entre silibinina e oxacilina ou ampicilina contra isolados de *S. aureus* metilicina resistentes. Para bactérias cariogênicas (*S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. gordonii*, entre outros) e periodontopatogênicas (*A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. intermedia* e *P. gingivalis*) a combinação de silibinina reduziu os valores de CIM para ampicilina e gentamicina em 4 a 8x (LEE et al., 2012).

Pouco ainda é conhecido sobre o mecanismos de ação da silimarina contra bactérias. Acredita-se que compostos fenólicos podem formar complexos com proteínas solúveis que se aderem na parede celular bacteriana (TSUCHIYA et al, 1996). Além disso, estudos tem mostrado que flavonoides tem mostrado efeito inibitório sobre a atividade da enzima DNA topoisomerase, que desempenha papel importante na replicação e enovelamento do DNA, formando complexos que alteram a capacidade de ligação da enzima (WANG et al., 2010). Paralelamente, flavonoides também parecem alterar a permeabilidade da membrana celular, favorecendo a entrada dos antibióticos (BURT, 2004).

A silibinina isolada têm mostrado valores mais reduzidos de CIM e CBM quando comparados a silimarina, confirmando seu papel como princípio ativo da silimarina. Valores de CIM50 e CIM90 para bactérias cariogênicas variaram de 0,025 e 0,2 µg/mL e de 0,1 a 0,8 µg/mL, respectivamente, enquanto que para periodontopatógenos esses valores foram 0,1–0,4 µg/mL and 0,4–3,2 µg/mL, respectivamente (LEE et al., 2012). Quanto à atividade antimicrobiana, silibinina apresentou excelente efeito contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis* (ÖZÇELİK et al., 2011). Assim, novos estudos com o princípio ativo da silimarina e com possíveis combinações deste princípio com antibióticos ou outros agentes antimicrobianos são necessários a fim de se continuar a busca por terapias biológicas que possam auxiliar na eliminação de patógenos orais resistentes.

6 Conclusão

Conclui-se que silimarina apresenta ação contra *E. faecalis*, em condições planctônicas e em biofilme, mostrando-se um agente biológico promissor para a eliminação de microrganismos envolvidos na infecção endodôntica.

REFERÊNCIAS

1. BUDZYŃSKA, A.; WIECKOWSKA-SZAKIEL, M.; SADOWSKA, B.; KALEMBA, D.; RÓZALSKA, B. Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their major components. **Pol J Microbiol**, v. 6, n. 01, p. 35-41, 2011.
2. BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **Int J Food Microbiol**, v. 94, n. 3, p. 223–253, 2004.
3. CHANDRA SHEKAR, B.R.; NAGARAJAPPA, R.; SUMA, S.; THAKUR, R. Herbal extracts in oral health care. A review of the current scenario and its future needs. **Pharmacogn Rev**, v. 9, n. 18, p. 87-92, Review, 2015.
4. CLSI - Clinical and Laboratory Standard Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 9th ed., Wayne, PA, **CLSI document**, M7-A9, 2012.
5. CUSHNIE, T.P.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **Int J Antimicrob Agents**, v. 26, n. 5, p. 343-356, Review, 2005.
6. DE OLIVEIRA, D.R.; TINTINO, S.R.; BRAGA, M.F.; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M.L.; COUTINHO, H.D.; DE MENEZES, I.R.; FACHINETTO, R. In vitro antimicrobial and modulatory activity of the natural products silymarin and silibinin. **Biomed Res Int**, p. 2927-2997, 2015.
7. DISTEL, J.W.; HATTON, J.F.; GILLESPIE M.J. Biofilm formation in medicated root canals. **J Endod**, v. 28, p.689 –693, 2002.
8. ENDO, M.S.; SIGNORETTI F.G.C.; KITAYAMA, V.S.; MARINHO, A.C.S.; MARTINHO, F.C.; GOMES, B.P.F.A. Culture and molecular detection of *Enterococcus faecalis* from patients with failure endodontic treatment and antimicrobial susceptibility of clinical isolates. **Braz Dent Sci**, v. 17, p. 83–91, 2014.
9. EVREN, E.; YURTCU, E. In vitro effects on biofilm viability and antibacterial and antiadherent activities of silymarin. **Folia Microbiol (Praha)**, v.60, n.4, p.351-6, 2015.
10. FALASCA, K.; UCIFERRI, C.; MANCINO, P.; VITACOLONNA, E.; DE TULLIO, D.; PIZZIGALLO, E.; CONTI, P.; VECCHIET, J. Treatment with silybin-vitamin E-phospholipid complex in patients with hepatitis C infection. **J Med Virol**, v. 11, p.1900-1906, 2008

11. GILMORE, M.S. The *Enterococci*: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. **Washington: ASM Press**, 2002.
12. GOMES, B.P.; JACINTO, R.C.; MONTAGNER, F.; SOUSA, E.L.; FERRAZ, C.C. Analysis of the antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria isolated from endodontic infections in Brazil during a period of nine years. **J Endod**, v. 37, p. 1058–1062, 2011.
13. GOMES, B.P.F.A.; PINHEIRO, E.T.; GADE-NETO, C.R.; et al. Microbiological examination of infected dental root canals. **Oral Microbiol Immunol**, v. 19, p.71-76, 2004.
14. HAAPASALO. M.; ORSTAVIK, D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. **J Dent Res**, v.66, p.1375–1379, 1987.
15. HALL, M.R.; MCGILLICUDDY, E.; KAPLAN, L.J. Biofilm: basic principles, pathophysiology, and implications for clinicians. **Surg Infect (Larchmt)**, v.15, n.1, p.1–7, 2014.
16. HANCOCK, H.H.; SIGURDSSON, A.; TROPE, M.; MOISEWITSCH, J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.91, p.579-586, 2001.
17. HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n.6, p. 481-504, 2000.
18. HOTWANI, K.; BALIGA, S.; SHARMA, K. Phytodentistry: use of medicinal plants. **J Complement Integr Med**. v. 11, n. 4, p. 233-251, 2014.
19. JETT, B.D.; HUYCKE, M.M.; GILMORE, M.S. Virulence of *Enterococci*. **Clin Microbiol**, v. 7, p.462–478, 1994.
20. JOHNSON, V.J.; HE, Q.; OSUCHOWSKI, M.F.; SHARMA, R.P. Physiological responses of a natural antioxidant flavonoid mixture, silymarin, in Balb/c mice: Silymarin inhibits Tlymphocyte function at low doses but stimulates inflammatory processes at high doses. **Planta Med**, v. 69, p. 44-49, 2003.
21. JUNG, H.J.; LEE, D.G. Synergistic antibacterial effect between silybin and N,N' dicyclohexylcarbodiimide in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **J Microbiol**, v.46, n.4, p.462-7, 2008.

22. KANG, H.K.; KIM, H.Y.; CHA, J.D. Synergistic effects between silibinin and antibiotics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens. **Biotechnol J**, v.6, n.11, p.1397-408, 2011.
23. LAMPE, J.W. Isoflavonoid and lignin phytoestrogens as dietary biomarkers. **J Nutr**, v.133, n.3, p. 956S-964S, 2003.
24. LEE, Y.S.; JANG, K.A.; CHA, J.D. Synergistic antibacterial effect between silibinin and antibiotics in oral bacteria. **J Biomed Biotechnol**, 618081, 2012.
25. LEWIS, K. In search of natural substrates and inhibitors of MDR pumps. **J Mol Microbiol Biotechnol**, v.3, p.247-254, 2001.
26. MCCUE, P.; SHETTY, K. Health benefits of soy isoflavonoids and strategies for enhancement: a review. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 44, n. 5, p. 361-367, 2004.
27. MOR, A.; HANI, K.; NICOLAS, P.J. The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms. **J Biol Chem**, v. 269, p. 31635–31641, 1994.
28. NAIR, P.N. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 1, n. 15, p.348-381, 2004.
29. NESTEL, P. J.; YAMASHITA, T.; SASAHARA, T.; POMEROY, S.; DART, A.; KOMESAROFF, P.; OWEN, A.; ABBEY, M. Soy isoflavones improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal and perimenopausal women. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 17, p. 3392–3398, 1997.
30. ORSTAVIK, D.; HAAPASALO, M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. **Endod Dent Traumatol**, v.6, p.142–149, 1990.
31. OZÇELİK, B.; KARTAL, M.; ORHAN, I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. **Pharm Biol**, v.49, n. 4, p. 396-402, 2010.
32. PALASKA, I.; PAPATHANASIOU, E.; THEOHARIDES, T.C. Use of polyphenols in periodontal inflammation. **Eur J Pharmacol**, v.720, p. 77–83, 2013.

33. PINHEIRO, E.T.; GOMES, B.P.; FERRAZ, C.C.; TEIXEIRA, F.B.; ZAIA, A.A.; SOUZA FILHO, F.J. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. **Oral Microbiol Immunol**, v.18, p. 100–103, 2003.
34. POTTER, S.M.; BAUM, J.A.; TENG, H.; STILLMAN, R.J.; SHAY, N.F.; ERDMAN, J.W.Jr. Soy protein and isoflavones: Their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. **Am J Clin Nutr**, v. 68, n. 6, p. 1375S– 1379S, 1998.
35. RÔÇAS, I.N.; SIQUEIRA, J.F.; SANTOS, K.R.N. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. **J Endod**, v. 30, p. 315–320, 2004.
36. SALLER, R.; BRIGNOLI, R.; MELZER, J.; MEIER, R. An updated systematic review with meta-analysis for the clinical evidence of silymarin. **Forsch Komplementmed**, v. 15, n. 1, p. 9-20, 2008.
37. SIQUEIRA, J.F.Jr.; RÔÇAS, I.N. Diversity of endodontic microbiota revisited. **J Dent Res**, v. 88, n. 11, p. 969-981, 2009.
38. SIQUEIRA, J.F.; LOPES, H.P. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. **Int Endod J**, v. 32, n.5, p.361-369, 1999.
39. SKOTTOVÁ, N.; KAZDOVÁ, L.; OLIYARNYK, O.; VECERA, R.; SOBOLOVÁ, L.; ULRICHOVÁ, J. Phenolics-rich extracts from *Silybum marianum* and *Prunella vulgaris* reduce a high-sucrose diet induced oxidative stress in hereditary hypertriglyceridemic rats. **Pharmacol Res**, v. 50, n.2, p.123-130, 2004.
40. TENDOLKAR, P.M.; BAGHDAYAN, A.S.; SHANKAR, N. Pathogenic *Enterococci*: new developments in the 21st century. **Cell Mol Life Sci**, v. 60, p. 2622–2636, 2003.
41. TSUCHIYA, H.; SATO, M.; MIYAZAKI, T. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Ethnopharmacol**, v.50, n.1, p. 27–34, 1996.
42. VALENZUELA, A.; GARRIDO, A. Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural isomer silibinin. **Bio Res**, v. 27, n.2, p. 105-112, 1994.

43. VERONICA, L.; SAVIUC, C.M.; CHIFIRIUC, M.C. Periodontitis and Periodontal Disease - innovative strategies for reversing the chronic infectious and inflammatory condition by natural products. **Curr Pharm Des**, 2015.
44. WANG, Q.; WANG, H.; XIE, M. Antibacterial mechanism of soybean isoflavone on *Staphylococcus aureus*. **Arch Microbiol**, v. 192, n.11, p. 893–898, 2010.
45. YING, X.; SUN, L.; CHEN, X.; XU, H.; GUO, X.; CHEN, H.; HONG, J.; CHENG, S.; PENG, L. Silibinin promotes osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells via bone morphogenetic protein signaling. **Eur J Pharmacol**, v. 721, n. 1-3, p. 225-230, 2013.