



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA E CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA INTEGRADA
ENDODONTIA

Dionatan Gomes

Eficácia Sinérgica de Vancomicina e Hidróxido de Cálcio
no Controle de Biofilmes de *Enterococcus faecalis*

Curitiba
2024



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA E CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA INTEGRADA
ENDODONTIA

Dionatan Gomes

Eficácia Sinérgica de Vancomicina e Hidróxido de Cálcio
no Controle de Biofilmes de *Enterococcus faecalis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Clínica Odontológica Integrada (Endodontia).

Orientador: Prof. Dr. Everdan Carneiro

Coorientador: Prof. Dr. Felipe Tuon

Curitiba

2024

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Luci Eduarda Wielganczuk – CRB 9/1118

G633e
2024
Gomes, Dionatan
Eficácia sinérgica de Vancomicina e hidróxido de cálcio no controle de biofilmes de *enterococcus faecalis* / Dionatan Gomes ; orientador: Everdan Carneiro ; coorientador: Felipe Tuon. – 2024.
47 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2024
Bibliografia: f. 42-47

1. Odontologia. 2. Vancomicina. 3. Doenças da gengiva. 4. Enterococcus faecalis. 5. Biofilmes. 6. Tratamento do canal radicular. 7. Hidróxido de cálcio. 8. Sinérgismo farmacológico. I. Carneiro, Everdan. II. Tuon, Felipe. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

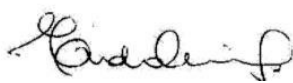
CDD. 20. ed. – 617.6

TERMO DE APROVAÇÃO

DIONATAN GOMES

EFICÁCIA SINÉRGICA DE VANCOMICINA E HIDRÓXIDO DE CÁLCIO NO CONTROLE DE BIOFILMES DE *ENTEROCOCCUS* *FAECALIS*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de **Mestre em Odontologia**, Área de Concentração em **Clínica Odontológica Integrada - Endodontia**.



Orientador(a): Prof. Dr. Everdan Carneiro
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR



Prof. Dr. Ulisses Xavier da Silva Neto
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR



Prof. Dr. João Armando Brancher
Programa de Pós-graduação em Odontologia, UP

CURITIBA, 27 DE SETEMBRO DE 2024.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todas as pessoas que, de diversas formas, contribuíram para a realização desta dissertação. Em primeiro lugar, agradeço aos meus orientadores pelo apoio contínuo e valiosas contribuições ao longo de todo o processo. Suas orientações foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Agradeço também aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Odontologia da PUCPR, que sempre estiveram dispostos a oferecer suporte e compartilhar seus conhecimentos. A convivência acadêmica e as discussões nas aulas foram essenciais para o desenvolvimento deste estudo.

Aos meus colegas de curso e amigos, que compartilharam comigo esta jornada acadêmica, agradeço pelo apoio, pelas trocas de experiências e pelo incentivo constante. A colaboração e a amizade de vocês foram fundamentais para superar os desafios e tornar essa caminhada mais leve e prazerosa.

Gostaria de agradecer especialmente à minha família, por seu amor incondicional, paciência e encorajamento ao longo de todos esses anos de estudo. Sem o apoio de vocês, essa conquista não teria sido possível. Em particular, dedico um agradecimento especial aos meus pais, por sempre acreditarem em mim e me incentivarem a buscar meus sonhos.

Aos participantes desta pesquisa, que gentilmente dedicaram seu tempo e compartilharam suas experiências, deixo meu mais sincero agradecimento. Suas contribuições foram vitais para a realização deste estudo. Por fim, agradeço a todas as instituições e órgãos de fomento que proporcionaram os recursos necessários para a realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

Resumo	7
Introdução	8
Material e Métodos.....	10
Resultados	16
Discussão.....	20
Conclusão	23
Referências	24
English version	29
Abstract.....	30
Introduction	30
Methods.....	33
Results	38
Discussion	43
Conclusion.....	45
References	46

Resumo

Introdução: Infecções endodônticas, especialmente as envolvendo *Enterococcus faecalis*, representam desafios nos tratamentos de canal radicular. Este estudo investigou os efeitos sinérgicos da combinação de hidróxido de cálcio (CaOH₂) e vancomicina em biofilmes focando na estabilidade desses agentes em ambiente altamente alcalino e seus efeitos inibitórios no crescimento bacteriano. **Objetivo:** avaliar os possíveis efeitos sinérgicos do CaOH₂ e da vancomicina em biofilmes de *Enterococcus faecalis*. **Métodos:** A estabilidade da vancomicina foi testada em pH de 1 a 13. Os efeitos inibitórios do CaOH₂ e da vancomicina, isolados e combinados, foram avaliados através de difusão antimicrobiana, concentração mínima inibitória, concentração mínima bactericida e análises de curva de morte. Testes de viabilidade, como concentração mínima de erradicação de biofilme, concentração mínima de inibição de biofilme, ensaio LIVE/DEAD, MTT e cristal violeta foram realizados. **Resultados:** A vancomicina demonstrou estabilidade em pH 9 e inibiu o crescimento bacteriano. CaOH₂ e vancomicina, isoladamente e em combinação, inibiram efetivamente o biofilme de *E. faecalis*. A combinação mostrou efeitos sinérgicos, melhorando a erradicação do biofilme em comparação ao CaOH₂ isolado. Testes de viabilidade confirmaram a superior eficácia da combinação, com reduções significativas na atividade bacteriana e produção de biofilme. **Conclusão:** A combinação de CaOH₂ e vancomicina mostrou efeitos sinérgicos promissores contra biofilmes de *E. faecalis*, sugerindo seu potencial como estratégia terapêutica eficaz em tratamentos endodônticos.

<i>Palavras-chave:</i> Infecções Endodônticas, <i>Enterococcus faecalis</i>, Hidróxido de Cálcio, Vancomicina, Biofilmes, Tratamento de Canal Radicular, Sinergismo Farmacológico.

Introdução

A periodontite apical é uma condição inflamatória crônica resultante da invasão bacteriana da polpa dentária e do sistema de canais radiculares, levando à destruição dos tecidos periapicais (1) (2). Estudos mostram que infecções endodônticas são frequentemente associadas a uma microbiota complexa, onde *Enterococcus faecalis* (EF) e *Porphyromonas gingivalis* são prevalentes, particularmente em casos de retratamentos, tais infecções estão associadas a sintomas clínicos como dor, sensibilidade à percussão e lesões periapicais (3).

O tratamento endodôntico reduz microrganismos dos canais radiculares infectados, mas não o suficiente para alcançar antisepsia completa quando infecções periapicais são mantidas. A presença bacteriana é geralmente associada, sendo EF o microrganismo mais comumente relatado em lesões persistentes (4) (5) (6). A eliminação eficaz das bactérias e a prevenção da recontaminação do sistema de canais radiculares são os fundamentos da terapia endodôntica (7). Mesmo quando os procedimentos de limpeza quimio-mecânicos mais rigorosos são seguidos, as bactérias podem persistir em casos de necrose pulpar e lesões periapicais. (8) (9). Para resolver essa questão, a aplicação complementar de agentes antimicrobianos intracanaís entre as sessões de terapia endodôntica foi proposta para reduzir significativamente os microrganismos (10) (11).

A substância intracanal mais descrita na literatura para esse fim é o hidróxido de cálcio (HC). Esse curativo é caracterizado por ser um pó branco, alcalino (pH 12,8), pouco solúvel em água (solubilidade 1,2 g L⁻¹ de água, a 25°), obtido pela calcinação do carbonato de cálcio até se transformar em óxido de cálcio, que, ao se hidratar, resulta em hidróxido de cálcio (12). Com base no peso molecular da substância, o percentual de íons hidroxila e íons cálcio encontrados corresponde a 45,89% e 54,11%, respectivamente (13). A atividade antimicrobiana do HC) está relacionada à sua capacidade de inibição enzimática e alterações na parede celular bacteriana. Outra ação importante é a atividade anti-exsudativa e biológica, responsável pela ativação da enzima tecidual fosfatase alcalina, que induz a formação de tecido ósseo mineralizado e, assim, contribui para o processo de reparo (14).

Na terapia endodôntica, as bactérias podem sobreviver após a aplicação de medicação intracanal por várias razões. Os microrganismos podem ser intrinsecamente resistentes à medicação intracanal ou podem ser viáveis em variações anatômicas do sistema de canais radiculares que são inacessíveis à preparação biomecânica do canal. Além disso, os efeitos da dentina, detritos orgânicos e fluidos teciduais podem tamponar o pH do Ca(OH)_2 , afetando suas propriedades (15) (16). Também é questionável se veículos viscosos ou oleosos são clinicamente benéficos, pois não permitem alta dissociação e consequente liberação de íons hidroxila, que são responsáveis pelos principais efeitos biológicos do (HC) (17). Para compensar algumas dessas deficiências, a associação do curativo de (HC) com outros antimicrobianos tem sido utilizadas (18).

Vários medicamentos foram sugeridos pela literatura para melhorar a capacidade antisséptica e físico-química do (HC) devendo ter ação terapêutica complementar, atuando sem inativar suas ações biológicas e antimicrobianas e, se possível, otimizando-as (19). Entre as associações mais comuns com estão o iodofórmio, o para-clorofenol canforado, a clorexidina, fitoterápicos e anti-inflamatórios não esteroides (20) (21) (22) (23).

As opções antimicrobianas para (EF) são limitadas, como ampicilina, vancomicina, daptomicina e tigeciclina. Entre essas opções, a vancomicina (V) é um antibiótico que pode ser usado topicamente, pois é amplamente utilizado em ortopedia combinado com metilmetacrilato (24). Além disso, a resistência em (EF) é incomum (25) (26) (27). É um medicamento atraente para tratamento adjuvante em endodontia. A (V) é um medicamento termoestável, capaz de manter sua atividade por várias semanas, sendo tolerável em níveis de pH acima do fisiológico (28). Considerando as características da (V) e as vantagens do (HC), a combinação desses dois produtos pode ser interessante no tratamento endodôntico (22).

A (V) é um antibiótico da classe dos glicopeptídeos tricíclicos, conhecido por sua forte atividade bactericida em microrganismos Gram-positivos. Devido à sua característica solúvel em água, pode ser sugerido em associações em pasta (29) (30). Tem um modo de ação único, inibindo a segunda etapa da síntese da parede celular de bactérias suscetíveis. Há evidências de que a droga altera a permeabilidade da membrana celular e inibe seletivamente a síntese de ácido ribonucleico (31) [25-26]. (32)

A formulação de uma pasta de (HC) associada à (V) pode representar uma possibilidade terapêutica intracanal em dentes com necrose pulpar e infectados por *E. faecalis*, sendo a hipótese nula deste estudo é a de o pH do meio não alterará a atividade da (V), bem como não será citotóxico e manterá o potencial antimicrobiano contra (EF).

Material e Métodos

Neste estudo, a cepa padrão de EF (ATCC® 29212™) foi utilizada em todos os experimentos. O TSA (agar de soja tripticase) foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. Uma indução de biofilme dentário foi realizada em fatias de dentes caninos (seções de 2 mm de espessura).

Análise de pH

Os testes de pH foram conduzidos para avaliar a estabilidade da (V) em diversos gradientes ácido-base, variando de pH 1 a 13. O ácido clorídrico (HCl) foi empregado para esses testes, com uma concentração calculada para atingir pH=1. Diluições progressivas de HCl possibilitaram a transição para pH 7. Posteriormente, soluções com pH crescente, variando de 8 a 13, foram geradas através da adição de hidróxido de sódio (NaOH). Os valores de pH foram verificados utilizando um medidor de pH automatizado (Digimed, D20, São Paulo, SP, Brazil). Após a determinação do pH, (V) na concentração de 20 mg/L foi introduzida. Após uma hora de incubação, a solução foi submetida à quantificação de vancomicina por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), conforme detalhado anteriormente (28). O objetivo deste experimento foi avaliar a estabilidade da (V) em um ambiente alcalino antes de sua combinação com (HC).

Análise de Inibição do Crescimento Bacteriano utilizando o Método de Difusão em Disco

Uma solução com uma concentração de 0,5 na escala de turbidez de McFarland de *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212™ foi inoculada em uma placa de TSA. Posteriormente, uma pasta condicionante de (HC) na concentração de 20 mg + 100 µL de propilenoglicol, juntamente com (V) (1 e 32 mg/L) em discos de papel filtro, e uma combinação de pasta de (HC) com (V) em seções criadas utilizando um punção de aço inoxidável (Golgran, São Paulo, Brasil), foram

aplicadas. A placa inoculada foi então incubada por 24 horas a 36°C. Neste ensaio, a formação e a dimensão da zona de inibição do crescimento bacteriano associada aos agentes antimicrobianos foram avaliadas. Este teste é considerado um método de triagem para avaliar a capacidade dos agentes testados de inibir o crescimento bacteriano.

Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Esta representa uma análise qualitativa da concentração mínima necessária para que (V) e (HC) inibam a multiplicação das células bacterianas. A determinação da CIM para (HC) e (V) envolveu concentrações variando de 0,25 mg/L a 512 mg/L, em diluições progressivas, dispostas em uma placa de 96 poços com fundo em U (Corning, Nova Iorque, EUA). Posteriormente, 5 µL de uma solução contendo *E. faecalis* ATCC® 29212™ na concentração de 10⁶ ufc/mL foram adicionados a cada poço. Após 24 horas de incubação a 36°C, a placa foi visualmente avaliada, e a CIM foi definida como a menor concentração que não apresentou crescimento bacteriano.

Avaliação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Esta é uma análise quantitativa para avaliar a concentração bactericida mínima. A CBM foi conduzida na mesma placa mencionada anteriormente, com triplicação de 100 µL de cada poço de todas as soluções com concentrações acima da CIM. Placas de TSA com alça de Drigalski foram usadas. A CBM foi determinada como a concentração antimicrobiana sem crescimento celular, conforme descrito anteriormente (33).

Curva de Morte por Tempo (TKC)

O objetivo deste teste é avaliar o efeito sinérgico de dois medicamentos, permitindo a avaliação da sinergia entre os medicamentos. A TKC envolveu a inoculação de 3×10^7 ufc/mL de *E. faecalis* ATCC® 29212™ em 10 mL de caldo Mueller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Alíquotas de 100 µL foram retiradas no tempo 0 e após incubação de 1, 4, 8 e 24 horas. Essas alíquotas foram

triplicadas em placas de TSA e incubadas por 24 horas a 36°C para contagem de colônias. As curvas de morte por tempo foram construídas plotando a contagem média de colônias contra o tempo. Os resultados foram interpretados após 24 horas de incubação. O teste foi conduzido em triplicata.

Determinação da Concentração Mínima de Erradicação de Biofilme (MBEC)

Este teste determina a concentração de antibiótico capaz de erradicar biofilme pré-formado. Biofilmes foram produzidos em uma placa de 96 poços com fundo em U (Corning, Nova Iorque, EUA) utilizando uma solução de caldo de soja tripticase (TSB) com concentração de $1,5 \times 10^6$ ufc/mL de (EF) ATCC® 29212™. Após 24 horas de incubação a 36°C, a solução de TSB foi aspirada, lavada duas vezes com solução tampão fosfato pH 7.2 (PBS - solução salina tamponada com fosfato), e os agentes antimicrobianos foram adicionados em concentrações crescentes a partir da CBM previamente definida. Após 24 horas a 36°C, as soluções antimicrobianas foram aspiradas e 200 µL de PBS (pH 7.2) foram adicionados a cada poço. A placa foi submetida a sonicação em banho ultrassônico por 15 minutos a 37°C e 40 kHz (Sanders Medical, Santa Rita do Sapucaí, Minas Gerais, Brasil) para desagregar células da matriz do biofilme. Diluições seriadas com solução salina estéril foram realizadas, e a suspensão foi semeada em placas de TSA. As placas foram incubadas por 24 horas a 36°C. As colônias foram contadas, e os resultados foram calculados em ufc/mL, onde MBEC é a concentração mínima em mg/L de cada combinação antimicrobiana capaz de reduzir células do biofilme em 2 log/mL (34). Os testes foram conduzidos em octuplicata.

Determinação da Concentração Mínima de Inibição de Biofilme (MBIC)

Este teste determina a concentração do antibiótico capaz de inibir o desenvolvimento de células planctônicas a partir do biofilme. O teste é conduzido conforme descrito para MBEC, mas com uma coleta de 100 µL do caldo antes da lavagem do biofilme. As concentrações de vancomicina e hidróxido de cálcio foram progressivas (1-2048 mg/L) e (0,5 - 1024 mg/mL), respectivamente. Após 24 horas de exposição ao antibiótico, 100 µL do caldo foi semeado em placas de TSA e espalhado utilizando uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas por 24

horas a 36°C. As colônias foram contadas, e os resultados foram calculados em ufc/mL, onde MBIC é a concentração mínima em mg/L de cada combinação antimicrobiana capaz de reduzir células do biofilme em $2^{\log}$ /mL (34). Os testes foram conduzidos em triplicata.

Teste de Viabilidade Vivo-Morto (L/D)

O teste L/D é utilizado para avaliar a viabilidade do biofilme por fluorescência. Uma amostra de cada grupo (hidróxido de cálcio, vancomicina, hidróxido de cálcio com vancomicina) foi colocada em placas estéreis de 24 poços com uma lamínula de vidro arredondada de 13 mm de diâmetro (Sarstedt, Newton, NC, EUA) no fundo de cada poço. Simultaneamente, o protocolo de produção de biofilme de (EF) ATCC® 29212™ foi realizado. Após o período de incubação, o TSB e os espécimes foram liberados, e as lamínulas com biofilme foram coradas com o kit FilmTracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability (Molecular Probes, Life Technologies Ltd., Paisley, Reino Unido) para determinar a viabilidade das células bacterianas dentro do biofilme e a ação do antibiótico após o tratamento. O controle positivo foi realizado sem antibióticos, enquanto o controle negativo foi realizado sem antibióticos, com uma etapa de lavagem com etanol. Todas as lamínulas dos grupos foram imediatamente examinadas sob um microscópio de fluorescência (Zeiss Scope. A1; Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Todas as amostras foram coradas e tratadas seguindo o protocolo do kit, utilizando excitação/emissão de 480/500 nm para SYTO® 9 e 490/635 nm para iodeto de propídio (24). Todos os testes foram conduzidos em triplicata.

Análise de Viabilidade Celular do Biofilme por MTT

A análise da atividade mitocondrial das células foi realizada utilizando o método de redução do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo (MTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Este método quantifica a conversão do MTT solúvel em água em formazan insolúvel. O formazan roxo-azulado é solubilizado e sua concentração é então determinada por densidade óptica em um espectrofotômetro a 570 nm utilizando um leitor de microplacas FluoStar OPTIMA (BMG LABTECH, Ortenberg, Alemanha). Alíquotas de 200 µL de solução

contaminada com (EF) ATCC® 29212™ (concentração final de 10^4 ufc/mL) foram adicionadas a cada poço de uma placa de 96 poços (Corning, Nova Iorque, EUA), com 5 grupos: controle positivo (solução contaminada sem adição de antibióticos), solução contaminada com adição de hidróxido de cálcio, solução contaminada com adição de vancomicina, solução contaminada com adição de hidróxido de cálcio e vancomicina, e controle negativo (caldo TSB sem contaminante). Após 24 horas de incubação a 36°C, os poços foram lavados com solução salina duas vezes para remover células bacterianas não aderentes, seguido da adição de 200 µL de MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) na concentração de 0,5 mg/mL. A placa foi mantida a 36°C por 2 horas. Após esse período, os poços foram lavados com PBS, seguido da adição de 200 µL de isopropanol. Esta solução de cada poço foi aspirada e transferida para uma nova placa de poliestireno de 96 poços (Corning, Nova Iorque, EUA) para análise em um espectrofotômetro com filtro de 570 nm FluoStar OPTIMA (BMG LABTECH, Ortenberg, Alemanha (22)). Todos os testes foram conduzidos em octuplicata.

Análise da Capacidade de Formação de Biofilme por Cristal Violeta

Uma avaliação da capacidade de produção de biofilme de (EF) ATCC® 29212™ foi conduzida em microplacas de poliestireno de 96 poços (Corning, Nova Iorque, EUA) através da avaliação da absorbância por coloração com cristal violeta (cloreto de hexametilpararosanilina). Uma solução com concentração de 0,5 na escala de turbidez de McFarland foi diluída em caldo de soja tripticase (TSB), e 200 µL desta suspensão (concentração final de 10^4 ufc/mL) foram adicionados a cada poço. Os grupos incluíram: controle positivo sem adição de antibióticos, solução contaminada com adição de hidróxido de cálcio, solução contaminada com adição de vancomicina, solução contaminada com adição de hidróxido de cálcio e vancomicina, e controle negativo, caldo TSB sem contaminante. Após 24 horas de incubação a 36°C, os poços foram cuidadosamente lavados com solução salina duas vezes para remover células bacterianas não aderentes, e os biofilmes foram fixados por contato com 200 µL de metanol por 15 minutos. O metanol foi removido e as microplacas foram secas ao ar. Após a secagem, 200 µL de cristal violeta (1% v/v) foram adicionados a cada poço e incubados a 36°C por 5 minutos. Após o tempo designado, os poços foram cuidadosamente lavados duas vezes com água

ultrapura estéril, seguido da adição de 200 µL de ácido acético (33% v/v) para dissolver a coloração. A absorbância foi avaliada utilizando um leitor de microplacas FluoStar OPTIMA (BMG LABTECH, Ortenberg, Alemanha) com DO a 570 nm (33). Todos os testes foram conduzidos em octuplicata.

Biofilme em Dentes

Para uma simulação de biofilme dentário, dentes caninos foram obtidos e cortados em seções de 2 mm de espessura. Após o corte, os dentes foram esterilizados por autoclave. A indução de biofilme foi realizada em placas de cultura celular de 24 poços. Os dentes foram imersos em 1 mL de caldo Muller Hinton catiônico ajustado contendo 10^7 ufc/mL de (EF) ATCC® 29212™ por 24 horas. Subsequentemente, os modelos foram lavados duas vezes em PBS 7.2 por 5 minutos e colocados em uma nova placa com 1 mL de solução baseando-se na CIM de (V) (1 mg/L), (HC) (0,5 mg/mL) e os dois produtos combinados. Um grupo de controle com solução salina foi incluído. Os testes foram conduzidos em sextuplicata. Após 24 horas de exposição, os moldes dentários foram submetidos a uma lavagem dupla com PBS 7.2 por 5 minutos e então sonicados por 15 minutos em 1 mL de solução salina e semeados para quantificação em ufc/mL.

Análise Estatística

Variáveis contínuas foram comparadas pelo teste t de Student e expressas em número absoluto ou percentagens. As variáveis categóricas foram analisadas pelo teste do qui-quadrado ou Fisher e expressas como números absolutos ou percentagens. A diferença estatística foi considerada quando $p < 0,05$. O SPSS v23 foi utilizado para análise estatística (IBM, Armonk NY). Para a quantificação da área no teste LIVE/DEAD, foi utilizado o software ImageJ. A análise do ImageJ foi conduzida para avaliar as imagens de fluorescência obtidas do ensaio de viabilidade de biofilme LIVE/DEAD. Este software facilita a determinação de áreas específicas relacionadas a células bacterianas viáveis e não viáveis dentro do biofilme. As imagens foram importadas para o software ImageJ e regiões de interesse (ROIs) correspondentes às áreas do biofilme foram definidas. O software

calculou as áreas de células viáveis (verde) e não viáveis (vermelho) separadamente. As medições foram expressas em termos de área de pixels.

Resultados

O passo inicial na consideração da exploração da combinação (HC) e (V) foi a avaliação de sua estabilidade em um ambiente altamente alcalino (pH 12 a 13). O (HC), na sua concentração máxima estável, mantém um pH de 12,8. A avaliação da estabilidade indicou que a (V) manteve sua concentração mais efetivamente a pH 9, semelhante à concentração do controle. A Figura 1 ilustra uma queda acentuada em pH ácido e uma curva mais suave em pH básico. A porcentagem de perda não excedeu 50%, sugerindo compensação com aumento da concentração de vancomicina.

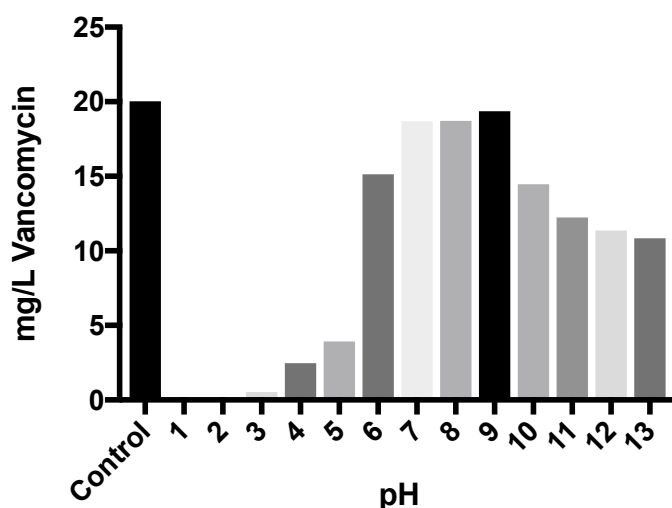


Figura 1 - Avaliação da estabilidade da vancomicina em diferentes níveis de pH.

Os testes de difusão antimicrobiana demonstraram que tanto a (V) (1 mg/L ou 32 mg/L) quanto o (HC) (200 mg/mL), isoladamente ou combinados, exibiram a capacidade de inibir o crescimento bacteriano, incentivando investigações adicionais (Figura 2). Os testes de microdiluição em caldo revelaram a concentração inibitória mínima (CIM) da (V) de 1 mg/L, enquanto o (HC) apresentou uma CIM de 0,5 mg/mL. Os resultados foram confirmados através de macrodiluição em caldo, empregando uma técnica semelhante com um volume de 5 mL de caldo para minimizar erros. A concentração bactericida mínima (CBM)

realizada juntamente com a CIM indicou uma concentração de (HC) de 4 mg/mL (8x CIM) e de (V) a 32 mg/L (32x CIM).

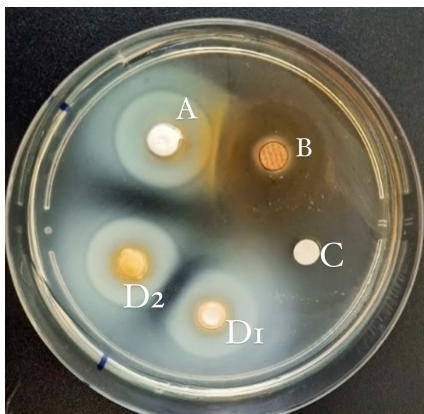


Figura 2 - testes de difusão antimicrobiana A (hidróxido de cálcio 200mg/ml); B (vancomicina 1mg/L); C (Vancomicina 32mg/L); D1(hidróxido de cálcio 200mg/ml + vancomicina 1mg/L); D2 hidróxido de cálcio 200mg/ml + vancomicina 32mg/L)

Usando a concentração inibitória mínima, foi realizada uma curva de morte ao longo do tempo para avaliar a interação entre a (V) e o (HC) e explorar possíveis efeitos sinérgicos, aditivos ou antagônicos. Em comparação com o controle e utilizando a concentração da CIM, a (V) exibiu uma redução de $2^{-\log}$ (100x), enquanto o (HC) mostrou uma redução $>5^{-\log}$ (100.000x), com nenhum crescimento bacteriano dentro de 24 horas. A combinação foi difícil de avaliar devido à rápida atividade bactericida do (HC). No entanto, a (V) não demonstrou efeito antagônico quando combinada com (HC) contra (EF) (Figura 3).

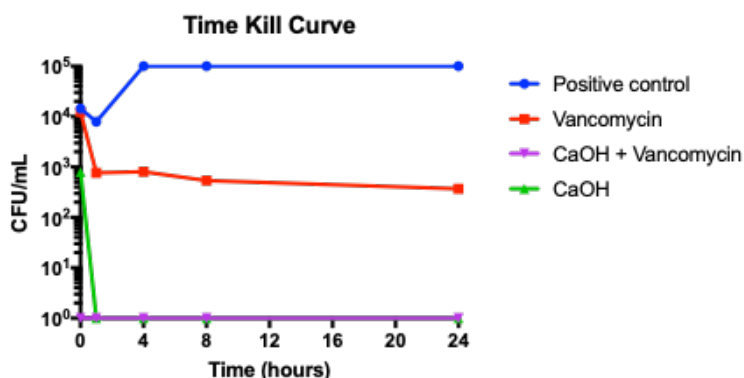


Figura 3 Time-kill curve de vancomicina, hidróxido de cálcio e da combinação de hidróxido de cálcio com vancomicina sobre *E. faecalis*

Os testes MBIC indicaram uma MBIC para a (V) de 512 mg/L e uma MBIC para o (HC) de 2 mg/mL. Testes de combinação não foram realizados, pois um teste do tipo Checker Board seria necessário. Testes de viabilidade, incluindo MBEC, MTT, cristal violeta e LIVE/DEAD, foram realizados. Na avaliação

quantitativa do biofilme, a (V) não mostrou atividade isolada, com crescimento bacteriano mantido em todas as concentrações de 0,5 a 128 mg/L. O (HC) sozinho ou combinado com (V) a 1 mg/L, resultou na erradicação completa do biofilme. A análise da produção de biofilme revelou que a combinação de (V) e (HC) alcançou uma redução maior do que o (HC) isoladamente ($p < 0,05$). Nos testes de atividade celular, a combinação de (V) com (HC) superou a (V) isolada e diferiu do grupo controle ($p < 0,05$). No entanto, nenhuma diferença foi observada ao adicionar (V) ao (HC) (Figura 4).

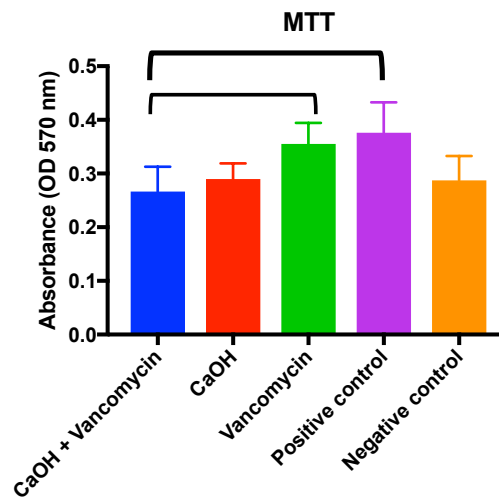


Figura 4 - teste de MTT em Biofilme de *E. faecalis*.

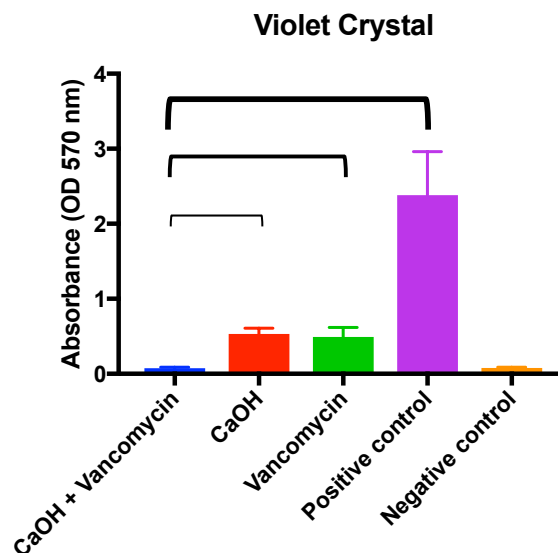


Figura 5 - Teste de Cristal Violeta em Biofilme de *E. faecalis*.

A viabilidade do biofilme exposto a (V) e (HC) foi testada usando o método de fluorescência LIVE/DEAD. A Figura 6 mostra um biofilme misto para a (V), com uma porcentagem semelhante de células vivas e mortas. No grupo de (HC), áreas de células vivas são visíveis, e na combinação de (HC) e (V), apenas células mortas são identificadas ($p < 0,05$) (Figura 6).

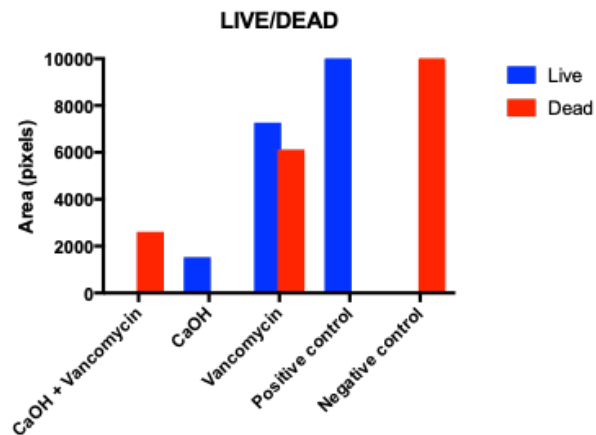


Figura 6- Resposta do biofilme aos tratamentos com vancomicina e hidróxido de cálcio.

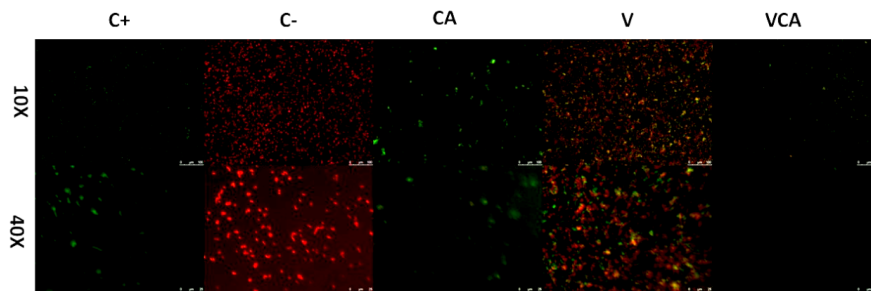


Figura 7- Análise de viabilidade de biofilme de *E. faecalis* com ImageJ®: quantificação das áreas de células viáveis (verde) e não viáveis (vermelho).

No modelo de biofilme em dente humano, todos os tratamentos foram superiores ao controle positivo ($p < 0,05$). A combinação de (HC) e (V) demonstrou uma resposta superior no tratamento do biofilme de (EF) (Figura 8).

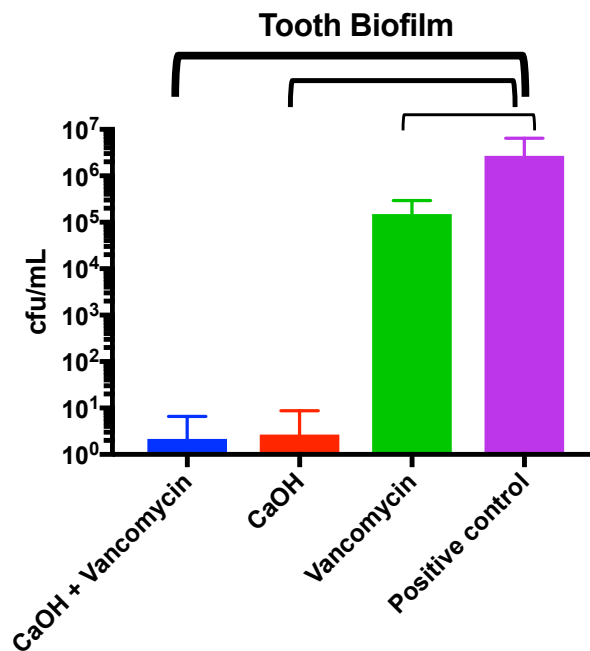


Figura 8 – Formação de biofilme de *Enterococcus Faecalis* em dente humano.

Discussão

A pasta de (HC) é útil como medicamento intracanal não apenas para a eliminação e redução de microrganismos (35), mas também para a confirmação da ausência de sinais iniciais de cicatrização ou sintomas antes do preenchimento do canal radicular (36). (EF) tem sido comumente utilizado em modelos de biofilme endodôntico devido à sua associação com falhas no tratamento endodôntico. Momenijavid et al. 2022 (37) sugeriram que o Ca_2^+ , como parte do (HC) não destrói o biofilme de EF mas participa do fortalecimento da estrutura levando ao aumento da densidade, alteração da morfologia e mudanças nas propriedades físico-químicas. A partir dessa perspectiva, a (V) poderia potencializar o efeito antibacteriano da pasta de (HC) contra o biofilme de (EF). Neste estudo, a hipótese testada foi confirmada experimentalmente; observou-se que a (V) associada ao (HC) não foi citotóxica, apresentou atividade antimicrobiana e não foi alterada pela variação de pH.

O objetivo do presente estudo foi investigar os potenciais efeitos sinérgicos da combinação de (HC) e (V) contra o biofilme de (EF). A avaliação inicial concentrou-se na estabilidade desses agentes em um ambiente altamente alcalino com pH variando de 12 a 13. O (HC), um conhecido agente alcalino comumente

utilizado em tratamentos endodônticos, exibiu um pH estável de 12,8 em sua concentração máxima. Essa estabilidade é crucial para manter a eficácia terapêutica em condições alcalinas. As avaliações de estabilidade revelaram que a (V), um antibiótico com papel crítico no combate a infecções bacterianas, manteve sua concentração mais efetivamente a pH 9, um achado análogo à concentração do controle. A queda observada na estabilidade em níveis ácidos de pH e a curva mais gradual em pH básico indicaram um comportamento dependente de pH. Notavelmente, a porcentagem de perda não ultrapassou 50%, sugerindo um possível ajuste compensatório da concentração de vancomicina para mitigar o impacto do pH ácido (38) (39). A (V) é pouco solúvel a pH neutro, mas é ionizável (40). Além disso, a pasta de (HC) proporciona alcalinização das superfícies internas das raízes e neutraliza produtos ácidos do processo inflamatório, facilitando a reparação e a atividade antimicrobiana (40), o que pode representar uma vantagem para a associação com a (V).

Os testes de difusão antimicrobiana demonstraram os efeitos inibitórios individuais e combinados de (V) e (HC) sobre o crescimento bacteriano. A capacidade desses agentes de inibir a proliferação bacteriana fornece uma base para investigações adicionais sobre sua eficácia combinada. Os testes de microdiluição em caldo forneceram insights quantitativos sobre as concentrações inibitórias de (V) e (HC), com a (V) exibindo uma concentração inibitória mínima (CIM) de 1 mg/L e o (HC) a 0,5 mg/mL. A confirmação através de macrodiluição em caldo e a determinação da concentração bactericida mínima (CBM) juntamente com a concentração inibitória mínima (CIM) apoiaram ainda mais esses achados. O (HC) demonstrou uma concentração de 4 mg/mL (8x CIM) para CBM, enquanto a (V) mostrou 32 mg/L (32x CIM), enfatizando sua eficácia contra o crescimento bacteriano. Por outro lado, o pH de (HC) nos testes de difusão antimicrobiana permanece alto, ao contrário de quando utilizado em outros modelos, como o modelo de dente infectado, onde o pH do (HC) geralmente é mais baixo devido ao efeito tampão da dentina radicular (41), o que pode apresentar resultados diferentes contra as bactérias.

A curva de morte ao longo do tempo, baseada na concentração inibitória mínima, forneceu insights sobre a interação dinâmica entre (V) e (HC). A substancial redução na viabilidade bacteriana observada com a (V) (redução de $2^{-\log}$ ou 100x) e o hidróxido de cálcio ($>5^{-\log}$ ou 100.000x) destacou seus potentes

efeitos bactericidas. A dificuldade em avaliar a eficácia combinada foi atribuída à rápida atividade bactericida do (HC), impedindo uma avaliação abrangente dos potenciais efeitos sinérgicos. No entanto, a ausência de um efeito antagônico quando a (V) foi combinada com (HC) contra (EF) indicou uma interação compatível entre esses agentes (42). O modo de ação do (HC) e da (V) torna-os muito promissores para o desenvolvimento de novos revestimentos antimicrobianos intracanais e para a futura eliminação do biofilme de (EF).

Os testes MBIC sublinharam a eficácia individual de (V) e (HC), com valores de MBIC de 512 mg/L e 2 mg/mL, respectivamente. Embora um teste de combinação não tenha sido conduzido, pois seria necessário um teste do tipo checkerboard, a eficácia individual desses agentes foi ainda mais validada através de testes de viabilidade, incluindo MBEC, MTT, cristal violeta e LIVE/DEAD. Notavelmente, a (V) apresentou atividade limitada na avaliação quantitativa de biofilme, com crescimento bacteriano observado em concentrações de 0,5 a 128 mg/L. Em contraste, o (HC), sozinho ou em combinação com (V) (1 mg/L), demonstrou erradicação completa do biofilme.

A análise da produção de biofilme revelou que a combinação alcançou uma redução mais significativa do que o (HC) isoladamente, destacando um potencial efeito sinérgico. Os testes de atividade celular enfatizaram ainda mais a superioridade da combinação sobre a (V) isolada, diferenciando-se significativamente do grupo controle. Esses achados ressaltam a maior eficácia da combinação em mitigar a atividade bacteriana e a produção de biofilme (30). Além disso, o uso de medicações intracanais visa eliminar microrganismos residuais da preparação quimiomecânica (43). Agentes antimicrobianos não conseguem penetrar biofilmes sem a ação físico-mecânica, especialmente quando os biofilmes têm grandes quantidades de matriz extracelular organizada (44).

A avaliação da viabilidade do biofilme através do método de fluorescência LIVE/DEAD forneceu uma representação visual da resposta à vancomicina e ao hidróxido de cálcio. Enquanto a vancomicina exibiu um biofilme misto com uma porcentagem comparável de células vivas e mortas, a combinação de hidróxido de cálcio e vancomicina predominantemente mostrou células mortas. Esta avaliação baseada em fluorescência reforçou o potencial da combinação para induzir a erradicação do biofilme. Neste estudo, as medicações intracanais estavam em contato direto com as bactérias. As pastas de (HC) mostram capacidade

antimicrobiana limitada em biofilmes (45). No modelo de biofilme em dente humano, todos os tratamentos, incluindo a combinação de hidróxido de cálcio e vancomicina, superaram o controle positivo, indicando eficácia superior no tratamento do biofilme de EF. Uma limitação observada no estudo é que a avaliação se concentrou em apenas uma cepa bacteriana, a execução dos testes com biofilmes polimicrobianos pode alterar os resultados encontrados. Estudos adicionais, incluindo investigações in vivo e clínicas, são necessários para validar esses achados e explorar o potencial de tradução desta terapia combinada.

Conclusão

Em conclusão, a combinação de (HC) e (V) demonstrou efeitos sinérgicos promissores contra o biofilme de (EF). A estabilidade desses agentes em um ambiente altamente alcalino, juntamente com seus efeitos inibitórios individuais e combinados sobre o crescimento bacteriano, destaca o potencial dessa combinação como uma estratégia terapêutica eficaz em tratamentos endodônticos.

Referências

1. Cao, L., et al. Interaction between apical periodontitis and systemic disease (Review). *International Journal of Molecular Medicine*. 2023, p. 52(1). DOI: 10.3892/ijmm.2023.5263.
2. Marcio, Francisco, Pereira., Jefferson, David, Melo, de, Matos., Ana, Claudia, do, Nascimento., Daher, Antonio, Queiroz. Endo-periodontal lesion: an endodontic approach in a series of clinical cases. *International journal of health sciences*. 2024. DOI: <https://doi.org/10.22533/at.ed.1594422403055>.
3. Barbosa-Ribeiro, M., et al. Microbiological analysis of endodontically treated teeth with apical periodontitis before and after endodontic retreatment. *Clinical Oral Investigations*. 2021, pp. 25(4), 2017-2027. DOI: 10.1007/s00784-020-03510-2.
4. Siqueira JF, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod* ; 34. 2008 , pp. 1291–1301. DOI: 10.1016/j.joen.2008.07.028.
5. Borzini, L., Condò, R., De Dominicis, P., Casaglia, A., & Cerroni, L. Root Canal Irrigation: Chemical Agents and Plant Extracts Against *Enterococcus faecalis*. . *Open Dent J*. 2016, pp. 10, 692-703. DOI: 10.2174/1874210601610010692.
6. Gaeta, C., Marruganti, C., Ali, I. A. A., Fabbro, A., Pinzauti, D., Santoro, F., Neelakantan, P., Pozzi, G., & Grandini, S. The presence of *Enterococcus faecalis* in saliva as a risk factor for endodontic infection. *Front Cell Infect Microbio*. 2023, p. 13. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1061645.
7. Narayanan LL, Vaishnavi C. Endodontic Microbiology. *J Conserv Dent*; 39. 2010, pp. 249–281. DOI: 10.4103/0972-0707.73386.
8. PNR, Nair. On the causes of persistent apical periodontitis: A review. *Int Endod J*. 2006, pp. 39:249–281. DOI: 10.1111/j.1365-2591.2006.01099.x.
9. Sundqvist, G. Ecology of the root canal flora. *J Endod*. 1992, pp. 18:427–430. DOI: 10.1016/S0099-2399(06)80842-3.
10. Abouelenien SS, Ibrahim SM, Shaker OG, Ahmed GM. Evaluation of postoperative pain in infected root canals after using double antibiotic paste versus calcium hydroxide as intra-canal medication: A randomized controlled trial. *F1000Research*. 2018, p. 7:1768. DOI: 10.12688/f1000research.16820.1.

11. Arruda MEF, Neves MAS, Diogenes A, Mdala I, Guilherme BPS, Siqueira JF, et al. Infection control in teeth with apical periodontitis using a triple antibiotic solution or calcium hydroxide with chlorhexidine: A Randomized Clinical Trial. *J Endod*. 2018, pp. 44:1474–1479. DOI: 10.1016/j.joen.2018.07.001.
12. Estrela C, et al. Mechanism of the action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J*. 1995, pp. 6(2):85-90. ISSN 0103-6440.
13. Estrela, C et al. Chemical analysis of the liberation of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide pastes in the presence of connective tissue of the dog. Part I. *Braz Dent J*. 1996, pp. 7(1):41-46. PMID: 9206353.
14. Estrela C, et al. Effect of vehicle on antimicrobial properties of calcium hydroxide. *Braz Dent J*. 1999, pp. 10:63-72. PMID: 10863391.
15. Haapasalo M, Qian W, Portenier I, Waltimo T. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. *J Endod*. 2007, pp. 33:917–925. DOI: 10.1016/j.joen.2007.04.008.
16. Portenier I, Haapasalo H, Rye A, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. Inactivation of root canal medicaments by dentine, hydroxylapatite and bovine serum albumin. *Int Endod J*. 2001, pp. 34:184–188. DOI: 10.1046/j.1365-2591.2001.00366.x.
17. Siqueira JF, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J*. 1999, pp. 32:361–369. DOI: 10.1046/j.1365-2591.1999.00275.x.
18. Ordinola-Zapata R, Noblett WC, Perez-Ron A, Ye Z, Vera J. Present status and future directions of intracanal medicaments. *Int Endod J*. 2022, pp. 55(Suppl. 3):613–636. DOI: 10.1111/iej.13731.
19. Estrela C, et al. Control of microorganisms in vitro by calcium hydroxide pastes. *Int Endod J*. 2001, pp. 34:341-345. DOI: 10.1046/j.1365-2591.2001.00368.x.
20. Dutta NK, et al. Potential management of resistant microbial infections with a novel non-antibiotic: the anti-inflammatory drug diclofenac sodium. *Int J Antimicrob Agents*. 2007, pp. 30:242-49. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2007.04.018.
21. Salem-Milani A, et al. Antibacterial Effect of Diclofenac Sodium on *Enterococcus faecalis*. *Jdt*. 2013, pp. 10(1):16-22. PMCID: PMC3666061.

22. Krüger HC, et al. Antimicrobial action, cytotoxicity, calcium ion release, and pH variation of a calcium hydroxide-based paste associated with Myracrodruon urundeuva Allemão extract. *Aust Endod J.* 2022, pp. 48(1):170-178. DOI: 10.1111/aej.12557.
23. Benedict, Paul, C., Leinzinge, r., Namitha, Nandakumar., Harish, K., A., P., Aarthi, Jayakumar., Anbarasi, K. Antimicrobial Therapeutic Strategies For Enterococcus faecalis In Dental Infections - Past, Present and Future. *Anti-infective agents.* 2023, p. 2. DOI: 10.2174/2211352521666230120100928.
24. Pedroni MA, et al. Different concentrations of vancomycin with gentamicin loaded PMMA to inhibit biofilm formation of Staphylococcus aureus and their implications. *J Orthop Sci.* 2022, pp. 14:S0949-2658. DOI: 10.1016/j.jos.2022.11.022.
25. Telles JP, et al. Daptomycin to bone and joint infections and prosthesis joint infections: a systematic review. *Braz J Infect Dis.* 2019, pp. 23(3):191-196. DOI: 10.1016/j.bjid.2019.05.006.
26. Tuon FF, et al. Antimicrobial Treatment of Staphylococcus aureus Biofilms. *Antibiotics.* 2023, p. 12(1):87. DOI: 10.3390/antibiotics12010087.
27. Tuon, F. F., Penteado-Filho, S. R., Camilotti, J., van der Heijden, I. M., & Costa, S. F. Outbreak of vancomycin-resistant Enterococcus in a renal transplant unit. *Braz J Infect Dis.* 2011, pp. 15(4):403-5. PMID: 21861018.
28. Kraft L, Ribeiro VST, Wollmann LCFN, Suss PH, Tuon FF. Determination of antibiotics and detergent residues in decellularized tissue- engineered heart valves using LC-MS/MS. *Cell Tissue Bank.* 2023, pp. 21(4):573- 584. DOI: 10.1007/s10561-020-09856-x.
29. WEI P, et al. Vancomycin- and strontium-loaded microspheres with multifunctional activities against bacteria, in angiogenesis, and in osteogenesis for enhancing infected bone regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces.* . 2019, p. 11:30596–30609. DOI: 10.1021/acsami.9b10219.
30. GARDNER, D.E. et al. Treatment of pulps of monkeys with vancomycin and calcium hydroxide. *J Dent Res.* 1971, pp. 50:1271-1277. DOI: 10.1177/00220345710500053001.
31. Watanakunakorn, C. Mode of action and in-vitro activity of vancomycin. *J Antimicrob Chemother.* 1984, pp. 14:7-18. DOI: 10.1093/jac/14.suppl_d.7.

32. Zhou XJ, et al. Mesoporous Silica Nanoparticles/Gelatin Porous Composite Scaffolds with Localized and Sustained Release of Vancomycin for Treatment of Infected Bone Defects. . *J Mater Chem B*. 2018, p. 6:740–752. DOI:10.1039/C7TB01246B.
33. Chaiben, V., Yamada, C. H., Telles, J. P., de Andrade, A. P., Arend, L. N. V. S., Ribeiro, V. S. T., Dantas, L. R., Suss, P. H., & Tuon, F. F. A carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak associated with a polymyxin shortage during the the COVID pandemic: an in vitro and biofilm analysis of synergy between meropenem, gentamicin and sulbactam. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2022, pp. 77(6), 1676–1684. DOI: 10.1093/jac/dkac102.
34. Kraft, L., Ribeiro, V. S. T., Gonçalves, G. A., Suss, P. H., & Tuon, F. F. Comparison of amphotericin B lipid complex, deoxycholate amphotericin B, fluconazole, and anidulafungin activity against *Candida albicans* biofilm isolated from breakthrough breakthrough candidemia. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*. 2023, pp. 41(10), 596–603. DOI: 10.1016/j.eimce.2022.07.009.
35. Huping GB, Orstavik D, Sigurdsson A, Trope M. Huping GB, Orstavik D, Sigurdsson A, Trope M. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. *J Endod*. 2000, pp. 26:751–755. DOI: 10.1097/00004770-200012000-00022.
36. Chong BS, Pitt Ford TR. The role of intracanal medication in root canal treatment. *Int Endod J*. 1992, pp. 25:97–106. DOI: 10.1111/j.1365-2591.1992.tb00743.x.
37. Momenijavid M, Salimizand H, Korani A, et al. Effect of calcium hydroxide on morphology and physicochemical properties of *Enterococcus faecalis* biofilm. *Sci Rep*. 2022, p. 12:7595. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11780-x> .
38. Abdelsamad NO, Esawy MA, Mahmoud ZE, et al. Evaluation of different bacterial honey isolates as probiotics and their efficient roles in cholesterol reduction. . *World J Microbiol Biotechnol* . 2022, p. 38(6):106. DOI: 10.1007/s11274-022-03259-8.
39. El-Din MKS, Ibrahim F, El-Deen AK, Shimizu K. Stability-indicating spectrofluorimetric method with enhanced sensitivity for determination of vancomycin hydrochloride in pharmaceuticals and spiked human plasma:

Application to degradation kinetics. *World J Microbiol Biotechnol.* 2018, pp. 26(2):834-841. DOI: 10.1016/j.jfda.2017.06.005.

40. Maciej Stawny M, Nadolna M, Jelinska A,. In vitro compatibility studies of vancomycin with ready-to-use parenteral nutrition admixtures for safer clinical practice. *Clin Nutr.* 2020, pp. 39(8):2539-2546. DOI: 10.1016/j.clnu.2019.11.014.

41. Chai WL, Hamimah H, Cheng SC, Sallam AA, Abdullah M. Susceptibility of *Enterococcus faecalis* biofilm to antibiotics and calcium hydroxide. *J Oral Sci.* 2007, pp. 49(2):161-6. DOI: 10.2334/josnurd.49.161.

42. Dahlén G, Samuelsson W, Molander A, Reit C,. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. . *Oral Microbiol Immunol.* 2000, pp. 15(5):309-12. DOI: 10.1034/j.1399-302x.2000.150507.x.

43. Sandoe JAT, Wysome J, West AP, Heritage J, Wilcox AH. Measurement of ampicillin, vancomycin, linezolid and gentamicin activity against enterococcal biofilms. . *J Antimicrob Chemother.* 2006, pp. 57(4):767-70. DOI: 10.1093/jac/dkl013.

44. Pedrinha VF, Cuellar MRC, Espedilla EGV, et al. Impact of irrigation protocols with some chelators and mechanical agitation on intratubular decontamination. *Braz Oral Res.* . 2021, p. 35:e127. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2021.vol35.0127>.

45. Pereira TC, Vasconcelos LRSM, Graeff MSZ, et al. Intratubular decontamination ability and physicochemical properties of calcium hydroxide pastes. *Clin Oral Investig.* . 2019, pp. 23:1253–1262. DOI: 10.1007/s00784-018-2549-0.

ENGLISH VERSION

SYNERGISTIC EFFICACY OF VANCOMYCIN AND CALCIUM
HYDROXIDE IN THE CONTROL OF ENTEROCOCCUS FAECALIS
BIOFILMS

Dionatan Gomes¹, Leticia Ramos Dantas², Felipe Francisco Tuon², Everdan
Carneiro^{1*}

¹Departament of Endodontics, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil.

²Laboratory of Emerging Infectious Diseases, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, 80215-901, Brazil

* Corresponding author

E-mail: everdan.carneiro@pucpr.br

Abstract

Introduction: Endodontic infections, particularly those involving *Enterococcus faecalis*, pose challenges in root canal treatments. This study aimed to investigate the synergistic effects of combining calcium hydroxide (CaOH₂) and vancomycin against *E. faecalis* biofilm, addressing the stability of these agents in an extreme alkaline environment and their inhibitory effects on bacterial growth. **Objective:** Evaluate the potential synergistic effects of CaOH₂ and vancomycin against *E. faecalis* biofilm. **Methods:** The stability of vancomycin was assessed across different pH levels (1 to 13), and the inhibitory effects of CaOH₂ and vancomycin, alone and in combination, were examined through antimicrobial diffusion, minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), and time-kill curve analyses. Viability tests, including minimum biofilm eradication concentration (MBEC), minimum biofilm inhibition concentration (MBIC), LIVE/DEAD assay, MTT, and crystal violet, were performed. A human tooth biofilm model was also utilized for clinical relevance. **Results:** Vancomycin demonstrated stability at pH 9 and exhibited inhibitory effects on bacterial growth. CaOH₂ and vancomycin, individually and in combination, effectively inhibited *E. faecalis* biofilm. The combination showed synergistic effects, with enhanced biofilm eradication compared to CaOH₂ alone. Viability tests supported the superior efficacy of the combination, with significant reductions in bacterial activity and biofilm production. **Conclusion:** The combination of CaOH₂ and vancomycin demonstrated promising synergistic effects against *E. faecalis* biofilm, suggesting its potential as an effective therapeutic strategy in endodontic treatments. **Clinical Relevance:** This synergistic effect suggests a potential new therapeutic strategy to improve root canal treatment outcomes.

Keywords: Endodontic Infections, *Enterococcus faecalis*, Calcium Hydroxide, Vancomycin, Biofilms, Root Canal Therapy, Drug Synergism

Introduction

Apical periodontitis is a chronic inflammatory condition resulting from bacterial invasion of the dental pulp and root canal system, leading to the destruction of periapical tissues [1-2]. Studies show that endodontic infections are often associated with a complex microbiota, where *Enterococcus faecalis* (EF) and *Porphyromonas gingivalis* are prevalent, particularly in retreatment cases. Such infections are associated with clinical symptoms such as pain, sensitivity to percussion, and periapical lesions [3].

Endodontic treatment reduces microorganisms from infected root canals but not enough to achieve complete antisepsis when periapical infections are maintained. Bacterial presence is usually associated, with *E. faecalis* (EF) being the most reported microorganism in persistent lesions [4-6]. The effective elimination of bacteria and prevention of recontamination of the root canal system are the foundations of endodontic therapy [7]. Even when the most rigorous chemo-mechanical cleaning procedures are followed, bacteria may persist in cases of pulp necrosis and periapical lesions [8-9]. To address this issue, the complementary application of intracanal antimicrobial agents between endodontic therapy sessions has been proposed to significantly reduce microorganisms [10-11].

The most described intracanal substance in the literature for this purpose is calcium hydroxide (CH). This dressing is characterized by being a white, alkaline powder (pH 12.8), slightly soluble in water (solubility of 1.2 g L⁻¹ of water at 25°C), obtained by calcination of calcium carbonate until it transforms into calcium oxide, which, when hydrated, results in calcium hydroxide [12]. Based on the molecular weight of the substance, the percentage of hydroxyl ions and calcium ions found corresponds to 45.89% and 54.11%, respectively [13]. The antimicrobial activity of (CH) is related to its capacity for enzymatic inhibition and alterations in the bacterial cell wall. Another important action is its anti-exudative and biological activity, responsible for activating the tissue enzyme alkaline phosphatase, which induces the formation of mineralized bone tissue and thus contributes to the repair process [14].

In endodontic therapy, bacteria may survive after intracanal medication for several reasons. Microorganisms may be intrinsically resistant to intracanal medication or may remain viable in anatomical variations of the root canal system

that are inaccessible to biomechanical canal preparation. Furthermore, the effects of dentin, organic debris, and tissue fluids may buffer the pH of (CH) affecting its properties [15-16]. It is also questionable whether viscous or oily vehicles are clinically beneficial, as they do not allow high dissociation and the consequent release of hydroxyl ions, which are responsible for the main biological effects of CH [17]. To compensate for some of these deficiencies, the combination of CH with other antimicrobials has been used [18].

Several drugs have been suggested in the literature to improve the antiseptic and physicochemical capacity of (CH), and they should have complementary therapeutic actions, working without inactivating its biological and antimicrobial effects and, if possible, optimizing them [19]. Among the most common combinations are iodoform, camphorated para-chlorophenol, chlorhexidine, herbal medicines, and non-steroidal anti-inflammatory drugs [20-23].

Antimicrobial options for (EF) are limited, such as ampicillin, vancomycin, daptomycin, and tigecycline. Among these options, vancomycin (V) is an antibiotic that can be used topically, as it is widely used in orthopedics combined with methyl methacrylate [24]. Furthermore, resistance in (EF) is uncommon [25-27]. It is an attractive drug for adjuvant treatment in endodontics. (V) is a thermostable drug, capable of maintaining its activity for several weeks and being tolerable at pH levels above physiological [28]. Considering the characteristics of (V) and the advantages of (CH), the combination of these two products may be interesting in endodontic treatment [22].

Vancomycin is an antibiotic from the tricyclic glycopeptide class, known for its strong bactericidal activity against Gram-positive microorganisms. Due to its water-soluble characteristic, it can be suggested in paste combinations [29-30]. It has a unique mode of action, inhibiting the second stage of cell wall synthesis in susceptible bacteria. There is evidence that the drug alters cell membrane permeability and selectively inhibits ribonucleic acid synthesis [31-32].

The formulation of a (CH) paste associated with (V) may represent a therapeutic intracanal possibility in teeth with pulp necrosis and infected with (EF). The null hypothesis of this study is that the medium's pH will not alter vancomycin activity, nor will it be cytotoxic, while maintaining antimicrobial potential against EF.

Methods

In this study, the standard (EF) strain (ATCC 29212TM) was used in all experiments. Tryptic soy agar (TSA) was prepared according to manufacturer instructions. A tooth biofilm induction was performed in canine teeth slices (2 mm thick sections).

pH Analysis

A pH testing was conducted to assess the stability of vancomycin across diverse acid-base gradients, ranging from pH 1 to 13. Hydrochloric acid (HCl) was employed for these tests, with a calculated concentration to achieve pH=1. Progressive dilutions of HCl facilitated the transition to pH 7. Subsequently, solutions with increasing pH, ranging from 8 to 13, were generated through the addition of sodium hydroxide (NaOH). The pH values were verified using an automated pH meter (Digimed, D20, São Paulo, SP, Brazil). Following pH determination, vancomycin at a concentration of 20 mg/L was introduced. After a one-hour incubation, the solution underwent vancomycin quantification through high-performance liquid chromatography (HPLC), as previously detailed [28]. The objective of this experiment was to evaluate the stability of vancomycin in an alkaline environment prior to its combination with calcium hydroxide.

Bacterial Growth Inhibition Analysis using the Disk Diffusion Method

A solution with a concentration of 0.5 McFarland turbidity scale of *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM was inoculated into a TSA plate. Subsequently, a conditioning paste of (HC) at a concentration of 20 mg + 100 µL of propylene glycol, along with (V) (1 and 32 mg/L) on filter paper disks, and a combination of (CH) paste with (V) in sections created using a stainless-steel punch (Golgran, São Paulo, Brazil), were applied. The inoculated plate was then incubated for 24 hours at 36°C. In this assay, the formation and dimension of the bacterial growth inhibition zone associated with the antimicrobial agents were assessed. This test is considered a screening method to evaluate the ability of the tested agents to inhibit bacterial growth.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Evaluation

This represents a qualitative analysis of the minimum concentration required for vancomycin and calcium hydroxide to inhibit bacterial cell multiplication. MIC determination for (CH) and (V) involved varying concentrations ranging from 0.25 mg/L to 512 mg/L, in progressive dilutions, arranged in a 96-well U-bottomed plate (Corning, New York, USA). Subsequently, 5 μ L of a solution containing *E. faecalis* ATCC 29212 TM at a concentration of 10^6 cfu/mL was added to each well. After a 24-hour incubation at 36°C, the plate was visually evaluated, and MIC was defined as the lowest concentration that showed no bacterial growth.

Minimum Bactericidal Concentration (MBC) Assessment

This is a quantitative analysis to assess the minimum bactericidal concentration. MBC was conducted on the same plate mentioned earlier, with triplicate plating of 100 μ L from each well of all solutions with concentrations above the MIC. TSA plates with Drigalski loop were used. MBC was determined as the antimicrobial concentration with no cell growth, as previously described [33].

Time Kill Curve (TKC)

The objective of this test is to evaluate the synergistic effect of two drugs, allowing the assessment of synergy between the drugs. TKC involved inoculating 3×10^7 cfu/mL of (EF) in 10 mL of Mueller-Hinton broth (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom). Aliquots of 100 μ L were taken at time 0 and after incubation at 1, 4, 8, and 24 hours. These aliquots were triplicate plated on TSA agar plates and incubated for 24 hours at 36°C for colony counting. Time kill curves were constructed by plotting average colony counts against time. Results were interpreted after 24 hours of incubation. The test was conducted in triplicate.

Minimum Biofilm Eradication Concentration (MBEC)

This test determines the antibiotic concentration capable of eradicating pre-formed biofilm. Biofilms were produced in a 96-well U-bottomed plate (Corning, New York, USA) using a Tryptic Soy Broth (TSB) solution with a concentration of

1.5 x 10⁶ cfu/mL of (EF) After 24 hours of incubation at 36°C, the TSB solution was aspirated, washed twice with pH 7.2 buffered solution (PBS - phosphate buffered saline), and antimicrobial agents were added at increasing concentrations from the previously defined MBC. After 24 hours at 36°C, the antimicrobial solutions were aspirated, and 200 µL of PBS (pH 7.2) was added to each well. The plate underwent sonication in an ultrasonic bath for 15 minutes at 37°C and 40 kHz (Sanders Medical, Santa Rita do Sapucaí, Minas Gerais, Brazil) to disrupt biofilm matrix cells. Serial dilutions with sterile saline solution were performed, and the suspension was plated on (TSA). The plates were incubated for 24 hours at 36°C. Colonies were counted, and results were calculated as cfu/mL, where MBEC is the minimum concentration in mg/L of each antimicrobial combination capable of reducing biofilm cells by 2^{log}/mL [34]. The tests were conducted in octuplicate.

Minimum Biofilm Inhibition Concentration (MBIC)

This test determines the concentration of the antibiotic capable of inhibiting the development of planktonic cells from the biofilm. The test is conducted as described for MBEC, but with a collection of 100 µL of broth before biofilm washing. Vancomycin and calcium hydroxide concentrations were progressive (1-2048 mg/L) and (0.5 - 1024 mg/mL), respectively. After 24 hours of antibiotic exposure, 100 µL of broth was plated on (TSA) plates and spread using a Drigalski loop. The plates were incubated for 24 hours at 36°C. Colonies were counted, and results were calculated as cfu/mL, where MBIC is the minimum concentration in mg/L of each antimicrobial combination capable of reducing biofilm cells by 2log/mL [34]. The tests were conducted in triplicate.

Live-Dead Assay (L/D)

The L/D test is used to assess biofilm viability by fluorescence. A sample from each group (calcium hydroxide, vancomycin, calcium hydroxide with vancomycin) was placed in sterile 24-well plates with a pre-rounded glass coverslip of 13 mm diameter (Sarstedt, Newton, NC, USA) at the bottom of each well. Simultaneously, the (EF) biofilm production protocol was performed. After the incubation period, TSB and specimens were released, and coverslips with biofilm

were stained with the FilmTracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability kit (Molecular Probes, Life Technologies Ltd., Paisley, UK) to determine the viability of bacterial cells within the biofilm and the antibiotic action after treatment. The positive control was performed without antibiotics, while the negative control was performed without antibiotics, with an ethanol washing step. All coverslips from the groups were immediately examined under a fluorescence microscope (Zeiss Scope. A1; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). All samples were stained and treated following the kit protocol, using excitation/emission of 480/500 nm for SYTO® 9 and 490/635 nm for propidium iodide [24]. All tests were conducted in triplicate.

Cell Viability Analysis of Biofilm by MTT

Analysis of mitochondrial activity of cells was performed using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) reduction method. This method quantifies the conversion of water-soluble MTT into insoluble formazan. The purple-blue formazan is solubilized, and its concentration is then determined by optical density in a spectrophotometer at 570 nm using a FluoStar OPTIMA microplate reader (BMG LABTECH, Ortenberg, Germany). Aliquots of 200 µL of (EF) contaminated solution (final concentration of 10^4 cfu/mL) were added to each well of a 96-well plate (Corning, New York, USA), with 5 groups: positive control (contaminated solution without the addition of antibiotics), contaminated solution with added calcium hydroxide, contaminated solution with added vancomycin, contaminated solution with added calcium hydroxide and vancomycin, and negative control (TSB broth without contaminant). After 24 hours of incubation at 36°C, the wells were washed with saline solution twice to remove non-adherent bacterial cells, followed by the addition of 200 µL of MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at a concentration of 0.5 mg/mL. The plate was kept at 36°C for 2 hours. After this period, the wells were washed with PBS, followed by the addition of 200 µL of isopropanol. This solution from each well was aspirated and transferred to a new 96-well polystyrene plate (Corning, New York, USA) for analysis in a spectrophotometer with a 570 nm filter FluoStar OPTIMA (BMG LABTECH, Ortenberg, Germany [22]. All tests were conducted in octuplicate.

Biofilm Formation Capacity Analysis by Crystal Violet

An assessment of (EF) biofilm production capacity was conducted in 96-well polystyrene microplates (Corning, New York, USA) by evaluating absorbance through crystal violet staining (hexamethylpararosaniline chloride). A solution with a concentration of 0.5 McFarland from the turbidity scale was diluted in Tryptic Soy Broth (TSB), and 200 μ L of this suspension (final concentration of 10^4 cfu/mL) was added to each well. The groups included: positive control without the addition of antibiotics, contaminated solution with added calcium hydroxide, contaminated solution with added vancomycin, contaminated solution with added calcium hydroxide and vancomycin, and negative control, TSB broth without contaminant. After 24 hours of incubation at 36°C, the wells were carefully washed with saline solution twice to remove non-adherent bacterial cells, and biofilms were fixed by contact with 200 μ L of methanol for 15 minutes. Methanol was removed, and microplates were air-dried. After drying, 200 μ L of Crystal Violet (1% v/v) was added to each well and incubated at 36°C for 5 minutes. After the designated time, the wells were carefully washed twice with sterile ultrapure water, followed by the addition of 200 μ L of acetic acid (33% v/v) to dissolve the coloration. Absorbance was assessed using a FluoStar OPTIMA microplate reader (BMG LABTECH, Ortenberg, Germany) with OD at 570 nm [33]. All tests were conducted in octuplicate.

Biofilm on Teeth

For a tooth biofilm simulation, canine teeth were obtained and cut into 2 mm thick sections. After cutting, the teeth were sterilized by autoclaving. Biofilm induction was performed in 24-well cell culture plates. The teeth were immersed in 1 mL of adjusted cationic Muller Hinton broth containing 10^7 CFU/mL (EF) for 24 hours. Subsequently, the models were washed twice in PBS 7.2 for 5 minutes and placed in a new plate with 1 mL of vancomycin solution (1mg/L), calcium hydroxide (0.5 mg/mL), and the two products combined. A control group with saline solution was included. Tests were conducted in sextuplicate. After 24 hours of exposure, the tooth molds were subjected to double washing with PBS 7.2 for 5 minutes and then sonicated for 15 minutes in 1 mL of saline solution and plated for quantification in cfu/mL.

Statistical analysis

Continuous variables were compared by student t test and expressed in absolute number or percentages. The categorical variables were analyzed by chi-square or Fisher test and expressed as absolute numbers or percentages. Statistical difference was considered when $p < 0.05$. SPSS v23 was used for statistical analysis (IBM, Armonk NY). For the quantification of area in the LIVE/DEAD test, ImageJ software was employed. The ImageJ analysis was conducted to assess the fluorescence images obtained from the LIVE/DEAD Biofilm Viability assay. This software facilitates the determination of specific areas related to viable and non-viable bacterial cells within the biofilm. Images were imported into the ImageJ software and regions of interest (ROIs) corresponding to the biofilm areas were defined. The software calculated the areas of viable (green) and non-viable (red) cells separately. Measurements were expressed in terms of pixel area.

Results

The initial step in considering the exploration of the (CH) and (V) combination was assessing their stability in an extreme alkaline environment (pH 12 to 13). (CH) at its stable maximum concentration, maintains a pH of 12.8. Stability evaluation indicated that (V) retained its concentration most effectively at pH 9, similar to the control concentration. Fig.1 illustrates a sharp decline at acidic pH and a gentler curve at basic pH. The loss percentage did not exceed 50%, suggesting compensation with increased vancomycin concentration.

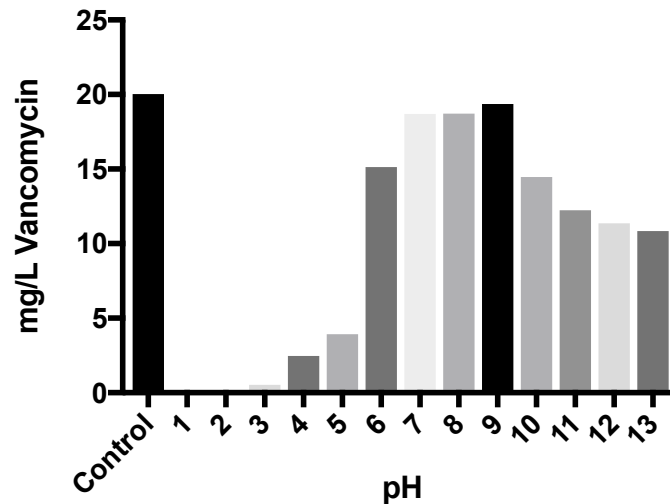


Fig. 1: evaluation of vancomycin stability at different pH levels

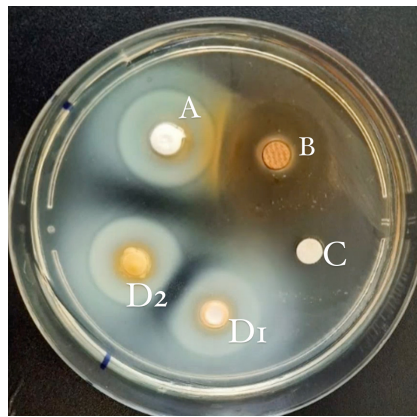


Fig. 2 - antimicrobial diffusion tests A (calcium hydroxide 200mg/ml); B (vancomycin 1mg/L); C (Vancomycin 32mg/L); D1 (calcium hydroxide 200mg/ml + vancomycin 1mg/L); D2 calcium hydroxide 200mg/ml + vancomycin 32mg/L)

Antimicrobial diffusion tests demonstrated that both (V) (1 mg/L or 32 mg/L) and (CH) (200 mg/mL), whether isolated or combined, exhibited the ability to inhibit bacterial growth, encouraging further investigations (Fig. 2). Broth microdilution tests revealed (V) is inhibitory concentration to be 1 mg/L, while (CH) exhibited a minimum inhibitory concentration of 0.5 mg/mL. Results were confirmed through broth macrodilution, employing a similar technique with a 5 mL broth volume to minimize errors. Minimum bactericidal concentration (MBC) conducted alongside MIC indicated a calcium hydroxide concentration of 4 mg/mL (8x MIC) and vancomycin at 32 mg/L (32x MIC).

Using the minimum inhibitory concentration, a time-kill curve was conducted to assess the interaction between (V) and (CH) and explore potential synergistic, additive, or antagonistic effects. Compared to the control and using MIC

concentration, (V) exhibited a $2^{-\log}$ reduction (100x), while (CH) showed a $>5^{-\log}$ reduction (100,000x), with no bacterial growth within 24 hours. The combination was challenging to evaluate due to the rapid bactericidal activity of (CH). However (V) demonstrated no antagonistic effect when combined with (CH) (Fig. 3).

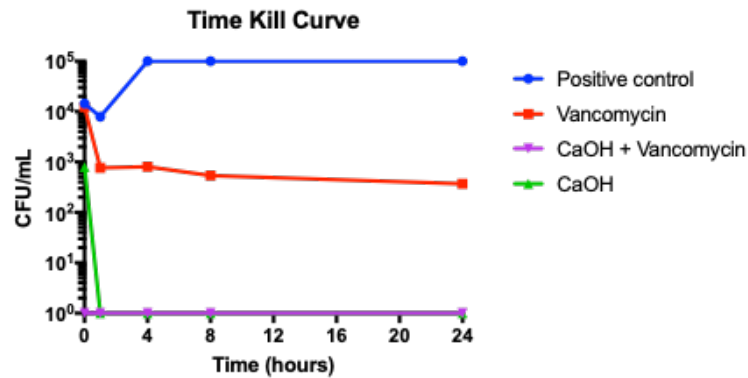


Fig. 3- time-kill curve of vancomycin, calcium hydroxide and the combination of calcium hydroxide and vancomycin on *E. faecalis*

MBIC tests indicated a (V) MBIC of 512 mg/L and a (CH) MBIC of 2 mg/mL. Combination tests were not conducted, as a checkerboard-type test would be required. Viability tests, including MBEC, MTT, crystal violet, and LIVE/DEAD tests, were performed. In quantitative biofilm assessment, (V) showed no isolated activity, with bacterial growth maintained at all concentrations from 0.5 to 128 mg/L. (CH), alone or combined with (V) at 1 mg/L, resulted in complete biofilm eradication. Biofilm production analysis revealed the combination of (CH) and (V) achieved a greater reduction than (CH) alone ($p < 0.05$). In cellular activity testing, the combination of (V) with (CH) outperformed vancomycin alone and differed from the control group ($p < 0.05$). However, no difference was observed in adding (Fig. 4 and Fig. 5).

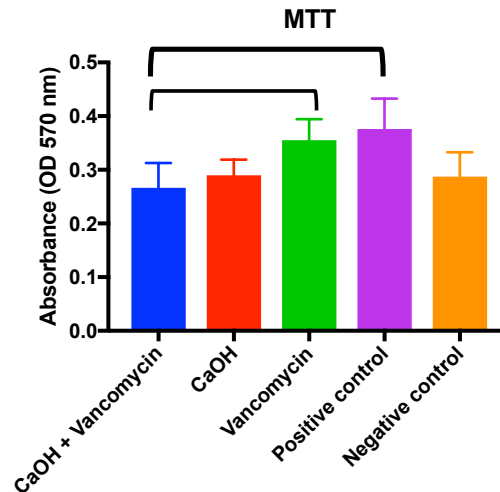


Fig. 4 - MTT test on *E. faecalis* Biofilm

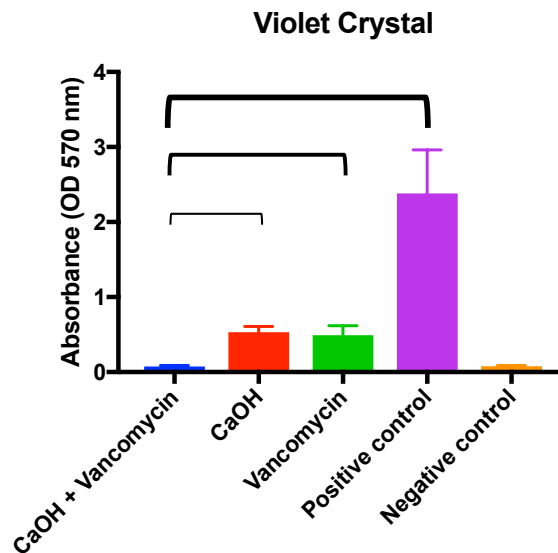


Fig. 5 - Violet Crystal Test on *E. faecalis* Biofilm

Viability of the biofilm exposed to (V) and (CH) was tested using the LIVE/DEAD fluorescence method. Fig. 6 shows a mixed biofilm for (V), with a similar percentage of live and dead cells. In the (CH) group, live cell areas are visible, and in (CH) and (V) combination, only dead cells are identified (Fig.7) ($p < 0.05$).

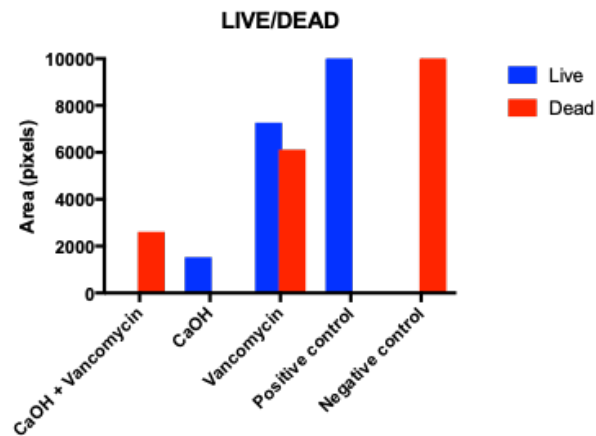


Fig. 6 - biofilm response to vancomycin and calcium hydroxide treatments

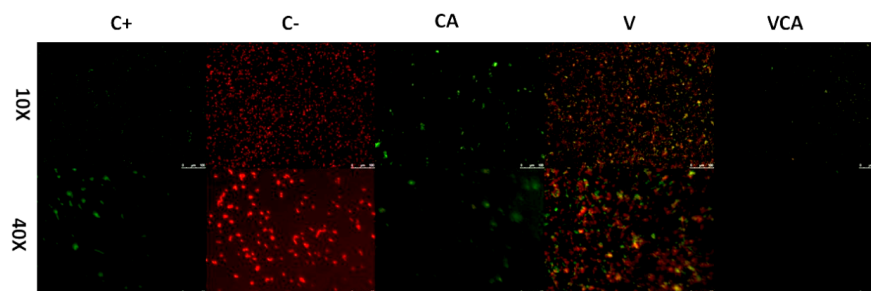


Fig. 7 - viability analysis of *E. faecalis* biofilm with ImageJ®: quantification of areas of viable (green) and non-viable (red) cells.

In the human tooth biofilm model, all treatments were superior to the positive control ($p < 0.05$). The combination of (CH) and (V) demonstrated a superior response in treating biofilm (Figure 8).

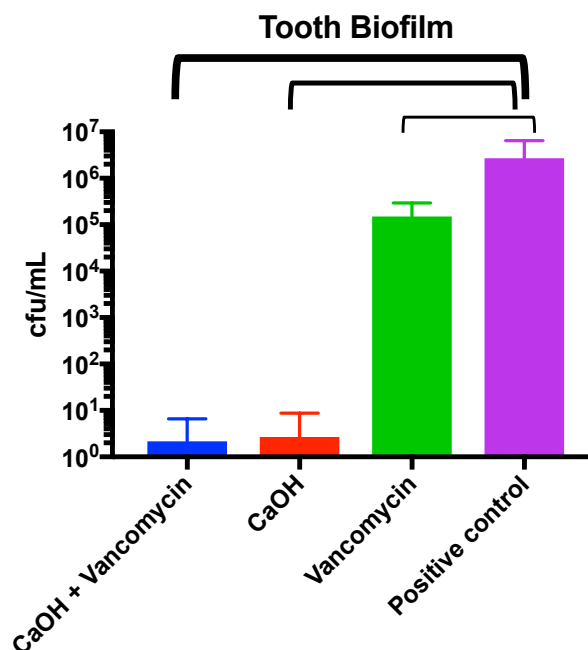


Fig. 8 - formation of *Enterococcus Faecalis* biofilm on human teeth

Discussion

The calcium hydroxide paste is useful as an intracanal medication not only for the elimination and reduction of microorganisms [35], but also to confirm the absence of initial signs of healing or symptoms before root canal filling [36]. (EF) has been commonly used in endodontic biofilm models due to its association with endodontic treatment failures. Authors suggested that Ca^{2+} , as part of the CH, does not destroy the (EF) biofilm but rather participates in strengthening its structure, making the biofilm denser. From this perspective, (V) could potentiate the antibacterial effect of (CH) paste against the (EF) biofilm [37]. In this study, the tested hypothesis was experimentally confirmed; it was observed that (V) combined with (CH) was not cytotoxic, exhibited antimicrobial activity, and was not altered by pH variation.

The aim of the present study was to investigate the potential synergistic effects of the combination of (CH) and (V) against (EF) biofilm. The initial evaluation focused on the stability of these agents in a highly alkaline environment with a pH range of 12 to 13. (CH) a well-known alkaline agent commonly used in endodontic treatments, exhibited a stable pH of 12.8 at its maximum concentration. This stability is crucial to maintaining therapeutic efficacy under alkaline conditions. Stability assessments revealed that (V), an antibiotic with a critical role in combating bacterial infections, retained its concentration more effectively at pH 9, a finding comparable to the control concentration. The observed decrease in stability at acidic pH levels and the more gradual curve at basic pH indicated a pH-dependent behavior. Notably, the percentage of loss did not exceed 50%, suggesting a potential compensatory adjustment in (V) concentration to mitigate the impact of acidic pH [38-39]. (V) is poorly soluble at neutral pH but is ionizable [40]. Additionally, the (CH) paste provides alkalinization of the internal surfaces of the roots and neutralizes acidic products from the inflammatory process, facilitating repair and antimicrobial activity [40], which may represent an advantage for its association with V.

The antimicrobial diffusion tests demonstrated the individual and combined inhibitory effects of (V) and (CH) on bacterial growth. The ability of these agents to inhibit bacterial proliferation provides a basis for further investigations into their combined efficacy. Broth microdilution tests provided quantitative insights into the

inhibitory concentrations of (V) and (CH), with (V) showing a minimum inhibitory concentration (MIC) of 1 mg/L and CH at 0.5 mg/mL. Confirmation through broth macrodilution and determination of the minimum bactericidal concentration (MBC), along with the minimum inhibitory concentration (MIC), further supported these findings. (CH) demonstrated a concentration of 4 mg/mL (8x MIC) for MBC, while V showed 32 mg/L (32x MIC), emphasizing its efficacy against bacterial growth. On the other hand, the pH of (CH) in antimicrobial diffusion tests remains high, unlike when used in other models, such as the infected tooth model, where the pH of CH is generally lower due to the buffering effect of root dentin [41] which may present different results against bacteria.

The time-kill curve, based on the minimum inhibitory concentration, provided insights into the dynamic interaction between (V) and (CH). The substantial reduction in bacterial viability observed with V (2-log or 100x reduction) and (CH) (>5 -log or 100,000x reduction) highlighted their potent bactericidal effects. The difficulty in evaluating the combined efficacy was attributed to the rapid bactericidal activity of (CH), preventing a comprehensive assessment of potential synergistic effects. However, the absence of an antagonistic effect when (V) was combined with (CH) against (EF) indicated a compatible interaction between these agents (42). The mode of action of (CH) and (V) makes them very promising for the development of new intracanal antimicrobial coatings and for the future elimination of (EF) biofilm.

The minimum biofilm inhibitory concentration (MBIC) tests underscored the individual efficacy of (V) and (CH) with MBIC values of 512 mg/L and 2 mg/mL, respectively. Although a combination test was not conducted, as a checkerboard test would be necessary, the individual efficacy of these agents was further validated through viability assays, including MBEC, MTT, crystal violet, and LIVE/DEAD assays. Notably, (V) showed limited activity in quantitative biofilm assessment, with bacterial growth observed at concentrations ranging from 0.5 to 128 mg/L. In contrast, (CH), either alone or in combination with (V) (1 mg/L), demonstrated complete biofilm eradication.

Biofilm production analysis revealed that the combination achieved a more significant reduction than (CH) alone, highlighting a potential synergistic effect. Cell activity tests further emphasized the superiority of the combination over (V) alone, showing a significant differentiation from the control group. These findings

underscore the enhanced efficacy of the combination in mitigating bacterial activity and biofilm production (30). Furthermore, the use of intracanal medications aims to eliminate residual microorganisms from chemomechanical preparation (43). Antimicrobial agents are unable to penetrate biofilms without physical-mechanical action, especially when biofilms have large amounts of organized extracellular matrix (44).

The assessment of biofilm viability through the LIVE/DEAD fluorescence method provided a visual representation of the response to (V) and (CH). While (V) displayed a mixed biofilm with a comparable percentage of live and dead cells, the combination of (CH) and (V) predominantly showed dead cells. This fluorescence-based assessment reinforced the potential of the combination to induce biofilm eradication. In this study, the intracanal medications were in direct contact with the bacteria. (CH) pastes show limited antimicrobial capacity in biofilms [45]. In the human tooth biofilm model, all treatments, including the combination of (CH) and (V), outperformed the positive control, indicating superior efficacy in treating (EF) biofilm. A limitation observed in the study is that the evaluation focused on only one bacterial strain, and conducting tests with polymicrobial biofilms may alter the results found. Additional studies, including in vivo and clinical investigations, are needed to validate these findings and explore the potential for translation of this combined therapy.

Conclusion

In conclusion, the combination of (CH) and (V) demonstrated promising synergistic effects against (EF) biofilm. The stability of these agents in a highly alkaline environment, along with their individual and combined inhibitory effects on bacterial growth, highlights the potential of this combination as an effective therapeutic strategy in endodontic treatments.

References

1. Cao, L., et al. Interaction between apical periodontitis and systemic disease (Review). *International Journal of Molecular Medicine*. 2023, p. 52(1). DOI: 10.3892/ijmm.2023.5263.
2. Marcio Francisco Pereira, Jefferson David Melo de Matos, Ana Claudia do Nascimento, Daher Antonio Queiroz. Endo-periodontal lesion: an endodontic approach in a series of clinical cases. *International journal of health sciences*. 2024. DOI: <https://doi.org/10.22533/at.ed.1594422403055>.
3. Barbosa-Ribeiro, M., et al. Microbiological analysis of endodontically treated teeth with apical periodontitis before and after endodontic retreatment. *Clinical Oral Investigations*. 2021, pp. 25(4), 2017-2027. DOI: 10.1007/s00784-020-03510-2.
4. Siqueira JF, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod* ; 34. 2008 , pp. 1291–1301. DOI: 10.1016/j.joen.2008.07.028.
5. Borzini, L., Condò, R., De Dominicis, P., Casaglia, A., & Cerroni, L. Root Canal Irrigation: Chemical Agents and Plant Extracts Against *Enterococcus faecalis*. *Open Dent J*. 2016, pp. 10, 692-703. DOI: 10.2174/1874210601610010692.
6. Gaeta, C., Marruganti, C., Ali, I. A. A., Fabbro, A., Pinzauti, D., Santoro, F., Neelakantan, P., Pozzi, G., & Grandini, S. The presence of *Enterococcus faecalis* in saliva as a risk factor for endodontic infection. *Front Cell Infect Microbio*. 2023, p. 13. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1061645.
7. Narayanan LL, Vaishnavi C. Endodontic Microbiology. *J Conserv Dent*; 39. 2010, pp. 249–281. DOI: 10.4103/0972-0707.73386.
8. PNR, Nair. On the causes of persistent apical periodontitis: A review. *Int Endod J*. 2006, pp. 39:249–281. DOI: 10.1111/j.1365-2591.2006.01099.x.
9. Sundqvist, G. Ecology of the root canal flora. *J Endod*. 1992, pp. 18:427–430. DOI: 10.1016/S0099-2399(06)80842-3.
10. Abouelenien SS, Ibrahim SM, Shaker OG, Ahmed GM. Evaluation of postoperative pain in infected root canals after using double antibiotic paste versus calcium hydroxide as intra-canal medication: A randomized controlled trial. *F1000Research*. 2018, p. 7:1768. DOI: 10.12688/f1000research.16820.1.

11. Arruda MEF, Neves MAS, Diogenes A, Mdala I, Guilherme BPS, Siqueira JF, et al. Infection control in teeth with apical periodontitis using a triple antibiotic solution or calcium hydroxide with chlorhexidine: A Randomized Clinical Trial. *J Endod*. 2018, pp. 44:1474–1479. DOI: 10.1016/j.joen.2018.07.001.
12. Estrela C, et al. Mechanism of the action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J*. 1995, pp. 6(2):85-90. ISSN 0103-6440.
13. Estrela, C et al. Chemical analysis of the liberation of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide pastes in the presence of connective tissue of the dog. Part I. *Braz Dent J*. 1996, pp. 7(1):41-46. PMID: 9206353.
14. Estrela C, et al. Effect of vehicle on antimicrobial properties of calcium hydroxide. *Braz Dent J*. 1999, pp. 10:63-72. PMID: 10863391.
15. Haapasalo M, Qian W, Portenier I, Waltimo T. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. *J Endod*. 2007, pp. 33:917–925. DOI: 10.1016/j.joen.2007.04.008.
16. Portenier I, Haapasalo H, Rye A, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. Inactivation of root canal medicaments by dentine, hydroxylapatite and bovine serum albumin. *Int Endod J*. 2001, pp. 34:184–188. DOI: 10.1046/j.1365-2591.2001.00366.x.
17. Siqueira JF, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J*. 1999, pp. 32:361–369. DOI: 10.1046/j.1365-2591.1999.00275.x.
18. Ordinola-Zapata R, Noblett WC, Perez-Ron A, Ye Z, Vera J. Present status and future directions of intracanal medicaments. *Int Endod J*. 2022, pp. 55(Suppl. 3):613–636. DOI: 10.1111/iej.13731.
19. Estrela C, et al. Control of microorganisms in vitro by calcium hydroxide pastes. *Int Endod J*. 2001, pp. 34:341-345. DOI: 10.1046/j.1365-2591.2001.00368.x.
20. Dutta NK, et al. Potential management of resistant microbial infections with a novel non-antibiotic: the anti-inflammatory drug diclofenac sodium. *Int J Antimicrob Agents*. 2007, pp. 30:242-49. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2007.04.018.
21. Salem-Milani A, et al. Antibacterial Effect of Diclofenac Sodium on *Enterococcus faecalis*. *Jdt*. 2013, pp. 10(1):16-22. PMCID: PMC3666061.

22. Krüger HC, et al. Antimicrobial action, cytotoxicity, calcium ion release, and pH variation of a calcium hydroxide-based paste associated with Myracrodruon urundeuva Allemão extract. *Aust Endod J.* 2022, pp. 48(1):170-178. DOI: 10.1111/aej.12557.
23. Benedict, Paul, C., Leinzinge, r., Namitha, Nandakumar., Harish, K., A., P., Aarthi, Jayakumar., Anbarasi, K. Antimicrobial Therapeutic Strategies For Enterococcus faecalis In Dental Infections - Past, Present and Future. *Anti-infective agents.* 2023, p. 2. DOI: 10.2174/2211352521666230120100928.
24. Pedroni MA, et al. Different concentrations of vancomycin with gentamicin loaded PMMA to inhibit biofilm formation of Staphylococcus aureus and their implications. *J Orthop Sci.* 2022, pp. 14:S0949-2658. DOI: 10.1016/j.jos.2022.11.022.
25. Telles JP, et al. Daptomycin to bone and joint infections and prosthesis joint infections: a systematic review. *Braz J Infect Dis.* 2019, pp. 23(3):191-196. DOI: 10.1016/j.bjid.2019.05.006.
26. Tuon FF, et al. Antimicrobial Treatment of Staphylococcus aureus Biofilms. *Antibiotics.* 2023, p. 12(1):87. DOI: 10.3390/antibiotics12010087.
27. Tuon, F. F., Penteado-Filho, S. R., Camilotti, J., van der Heijden, I. M., & Costa, S. F. Outbreak of vancomycin-resistant Enterococcus in a renal transplant unit. *Braz J Infect Dis.* 2011, pp. 15(4):403-5. PMID: 21861018.
28. Kraft L, Ribeiro VST, Wollmann LCFN, Suss PH, Tuon FF. Determination of antibiotics and detergent residues in decellularized tissue- engineered heart valves using LC-MS/MS. *Cell Tissue Bank.* 2023, pp. 21(4):573- 584. DOI: 10.1007/s10561-020-09856-x.
29. WEI P, et al. Vancomycin- and strontium-loaded microspheres with multifunctional activities against bacteria, in angiogenesis, and in osteogenesis for enhancing infected bone regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces.* . 2019, p. 11:30596–30609. DOI: 10.1021/acsami.9b10219.
30. GARDNER, D.E. et al. Treatment of pulps of monkeys with vancomycin and calcium hydroxide. *J Dent Res.* 1971, pp. 50:1271-1277. DOI: 10.1177/00220345710500053001.
31. Watanakunakorn, C. Mode of action and in-vitro activity of vancomycin. *J Antimicrob Chemother.* 1984, pp. 14:7-18. DOI: 10.1093/jac/14.suppl_d.7.

32. Zhou XJ, et al. Mesoporous Silica Nanoparticles/Gelatin Porous Composite Scaffolds with Localized and Sustained Release of Vancomycin for Treatment of Infected Bone Defects. . *J Mater Chem B*. 2018, p. 6:740–752. DOI:10.1039/C7TB01246B.
33. Chaiben, V., Yamada, C. H., Telles, J. P., de Andrade, A. P., Arend, L. N. V. S., Ribeiro, V. S. T., Dantas, L. R., Suss, P. H., & Tuon, F. F. A carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak associated with a polymyxin shortage during the the COVID pandemic: an in vitro and biofilm analysis of synergy between meropenem, gentamicin and sulbactam. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2022, pp. 77(6), 1676–1684. DOI: 10.1093/jac/dkac102.
34. Kraft, L., Ribeiro, V. S. T., Gonçalves, G. A., Suss, P. H., & Tuon, F. F. Comparison of amphotericin B lipid complex, deoxycholate amphotericin B, fluconazole, and anidulafungin activity against *Candida albicans* biofilm isolated from breakthrough breakthrough candidemia. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*. 2023, pp. 41(10), 596–603. DOI: 10.1016/j.eimce.2022.07.009.
35. Huping GB, Orstavik D, Sigurdsson A, Trope M. Huping GB, Orstavik D, Sigurdsson A, Trope M. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. *J Endod*. 2000, pp. 26:751–755. DOI: 10.1097/00004770-200012000-00022.
36. Chong BS, Pitt Ford TR. The role of intracanal medication in root canal treatment. *Int Endod J*. 1992, pp. 25:97–106. DOI: 10.1111/j.1365-2591.1992.tb00743.x.
37. Momenijavid M, Salimizand H, Korani A, et al. Effect of calcium hydroxide on morphology and physicochemical properties of *Enterococcus faecalis* biofilm. *Sci Rep*. 2022, p. 12:7595. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11780-x> .
38. Abdelsamad NO, Esawy MA, Mahmoud ZE, et al. Evaluation of different bacterial honey isolates as probiotics and their efficient roles in cholesterol reduction. . *World J Microbiol Biotechnol* . 2022, p. 38(6):106. DOI: 10.1007/s11274-022-03259-8.
39. El-Din MKS, Ibrahim F, El-Deen AK, Shimizu K. Stability-indicating spectrofluorimetric method with enhanced sensitivity for determination of vancomycin hydrochloride in pharmaceuticals and spiked human plasma:

Application to degradation kinetics. *World J Microbiol Biotechnol.* 2018, pp. 26(2):834-841. DOI: 10.1016/j.jfda.2017.06.005.

40. Maciej Stawny M, Nadolna M, Jelinska A,. In vitro compatibility studies of vancomycin with ready-to-use parenteral nutrition admixtures for safer clinical practice. *Clin Nutr.* 2020, pp. 39(8):2539-2546. DOI: 10.1016/j.clnu.2019.11.014.

41. Chai WL, Hamimah H, Cheng SC, Sallam AA, Abdullah M. Susceptibility of *Enterococcus faecalis* biofilm to antibiotics and calcium hydroxide. *J Oral Sci.* 2007, pp. 49(2):161-6. DOI: 10.2334/josnurd.49.161.

42. Dahlén G, Samuelsson W, Molander A, Reit C,. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. . *Oral Microbiol Immunol.* 2000, pp. 15(5):309-12. DOI: 10.1034/j.1399-302x.2000.150507.x.

43. Sandoe JAT, Wysome J, West AP, Heritage J, Wilcox AH. Measurement of ampicillin, vancomycin, linezolid and gentamicin activity against enterococcal biofilms. . *J Antimicrob Chemother.* 2006, pp. 57(4):767-70. DOI: 10.1093/jac/dkl013.

44. Pedrinha VF, Cuellar MRC, Espedilla EGV, et al. Impact of irrigation protocols with some chelators and mechanical agitation on intratubular decontamination. *Braz Oral Res.* . 2021, p. 35:e127. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2021.vol35.0127>.

45. Pereira TC, Vasconcelos LRSM, Graeff MSZ, et al. Intratubular decontamination ability and physicochemical properties of calcium hydroxide pastes. *Clin Oral Investig.* . 2019, pp. 23:1253–1262. DOI: 10.1007/s00784-018-2549-0.