

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

RAMIRO MARTINS QUINTANA

EFEITO DE INIBIDORES TECIDUAIS E ENDOTOXINA SOBRE A ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA DE SOLUÇÕES IRRIGADORAS

Porto Alegre

2014

RAMIRO MARTINS QUINTANA

EFEITO DE INIBIDORES TECIDUAIS E ENDOTOXINA SOBRE A ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA DE SOLUÇÕES IRRIGADORAS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Odontologia da Faculdade de
Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de
Cirurgião-Dentista.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Maria Poli Kopper
Móra

Porto Alegre

2014

CIP - Catalogação na Publicação

Martins Quintana, Ramiro
EFEITO DE INIBIDORES TECIDUAIS E ENDOTOXINA SOBRE
A ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE SOLUÇÕES IRRIGADORAS /
Ramiro Martins Quintana. -- 2014.
27 f.

Orientadora: Patrícia Maria Poli Kopper Móra.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade
de Odontologia, Curso de Odontologia, Porto Alegre,
BR-RS, 2014.

1. Endodontia. 2. Soluções irrigadoras. 3.
Enterococcus faecalis. I. Poli Kopper Móra, Patrícia
Maria, orient. II. Título.

RESUMO

QUINTANA, R. M. **Efeito de inibidores teciduais e endotoxina sobre a atividade antimicrobiana de soluções irrigadoras.** 2014. 27 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

O presente estudo *in vitro* avaliou o possível efeito inibitório da dentina humana pulverizada (DH), albumina sérica bovina (ALB) e de endotoxina (LPS) na ação antimicrobiana de soluções de hipoclorito de sódio (NaOCl), gel de clorexidina 2% (CHX), MTAD[®], e QMiX. frente ao *E. faecalis* (ATCC 29212), nos períodos de 2 min, 30 min e 6 horas. O efeito dos inibidores sobre a ação antimicrobiana das soluções foi avaliado pelo método do contato direto em meio líquido. Após o período de contato determinado, foram utilizados neutralizadores específicos para cada solução. Uma alíquota e respectivas diluições de cada conjunto foram plaqueadas para a determinação do número de unidades formadoras de colônia. Os dados foram tabulados e realizou-se a análise estatística (Kruskal-Wallis e teste de Dunn, $\alpha=5\%$). Nos períodos experimentais listados, na ausência dos inibidores, todas os irrigantes eliminaram o *E. faecalis*. Em 2min, na presença da ALB, apenas o NaOCl 5% eliminou o *E. faecalis*. Em contato com a DH, todas as soluções, com exceção do MTAD, eliminaram o *E. faecalis*. O LPS não alterou o efeito antimicrobiano das soluções. Em 30min e 6h, todas as soluções eliminaram o *E. faecalis*, mesmo na presença de DH, ALB ou LPS. Conclui-se que, após 2 minutos de contato com o *E. faecalis*, a ALB inibe ação antimicrobiana das soluções testadas, com exceção do NaOCl 5%. Em 2 minutos a DH inibiu a ação do MTAD. Nos demais períodos experimentais a ALB, a DH e o LPS não influenciaram a ação dos irrigantes.

Palavras-chave: Efeito antimicrobiano. *Enterococcus faecalis*. Soluções irrigadoras.

ABSTRACT

QUINTANA, R. M. **Efeito de inibidores teciduais e endotoxina sobre a atividade antimicrobiana de soluções irrigadoras.** 2014. 27 f. Final Paper (Graduation in Dentistry) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

The present *in vitro* study evaluated the possible inhibitory effect of human dentin powder (DH), bovine serum albumin (ALB) and endotoxin (LPS) in the antimicrobial activity of sodium hypochlorite (NaOCl), 2% chlorhexidine gel (CHX), MTAD[®] and QMiX against *E. faecalis* (ATCC 29212), in periods of 2 min, 30 min and 6 hours. The effect of inhibitors on the antimicrobial activity of the solutions was evaluated by direct contact in liquid medium method. After the specified period of contact, were used for each specific neutralizing solution. An aliquot and their dilutions of each set were plated to determine the number of colony forming units. The data were plotted and carried out the statistical analysis (Kruskal-Wallis test and Dunn, $\alpha = 5\%$). In all experimental periods, in the absence of inhibitors, all irrigators eliminated *E. faecalis*. 2min in the presence of the ALB, only 5% NaOCl eliminated *E. faecalis*. Contact the DH, all solutions with the exception of MTAD, eliminated *E. faecalis*. LPS did not alter the antimicrobial effect of the solutions in 30min and 6h, all solutions eliminated *E. faecalis*, even in the presence of DH, ALB or LPS. We conclude that, after 2 minutes of contact with *E. faecalis*, ALB inhibits the antimicrobial action of the tested solutions, with the exception of 5% NaOCl. In two minutes the DH inhibited the action of MTAD. In the other experimental periods ALB, DH and LPS did not influence the action of irrigators.

Keywords: Antimicrobial effect. *Enterococcus faecalis*. Irrigating solutions.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - (a) Frasco contendo lipopolissacarídeo de *Echerichia coli*, (b) frasco contendo Albumina sérica bovina, (c) Moedor elétrico, utilizado para moer dentina humana, e frasco contendo dentina em pó 12
- Figura 2 - (a) Tubo plástico do tipo Falcon contendo *Enterococcus faecalis* em BHI caldo para o inóculo; (b) Tubo plástico do tipo Falcon contendo o inóculo de *Enterococcus faecallis* 13
- Figura 3 - Exemplo de diluição seriada, contendo os dois primeiros tubos plásticos do tipo eppendorf com lecitina + tween 80 e os dois últimos com água destilada estéril feitas em triplicata 14
- Figura 4 - (a) Representação gráfica da placa de petri com diluições. (b) Exemplo de placa de petri com o crescimento bacteriano nas 4 diluições 15

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mediana, valores mínimo e máximo para o número de UFC ($\times 10^5/\text{mL}$) de <i>E. faecalis</i> quando expostos às substâncias químicas auxiliares, com ou sem inibidores, em diferentes períodos de tempo (2 minutos, 30 minutos ou 6 horas)	17
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	07
2	OBJETIVOS	10
2.1	OBJETIVO GERAL.....	10
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
3	MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1	QUESTÕES ÉTICAS	11
3.2	DELINEAMENTO	11
4	RESULTADOS	16
5	DISCUSSÃO	18
6	CONCLUSÕES	21
	REFERÊNCIAS	22
	ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DA COMPESQ	25
	ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DA CEP/UFRGS	26

1 INTRODUÇÃO

Já está bem estabelecido na literatura que microrganismos são os principais agentes etiológicos das patologias pulpares e periapicais (1). Por esta razão, o tratamento endodôntico visa remover as bactérias do canal radicular, por meio do preparo químico-mecânico, e vedar o espaço do canal para evitar uma futura recontaminação (2). A instrumentação é essencial para a remoção de estrutura dental infectada, mas pode ter sua ação prejudicada pela morfologia complexa do sistema de canais radiculares, isto é, canais laterais e acessórios, deltas apicais, etc. Por esta razão, também é necessário o emprego de meios químicos para auxiliar na desinfecção do sistema de canais radiculares (3).

Apesar dos melhores esforços para a descontaminação do sistema de canais radiculares, a persistência de bactérias e/ou a reinfecção via infiltração coronária são as causas mais comuns de falha do tratamento endodôntico (4). *Enterococcus faecalis* é uma bactéria anaeróbia facultativa Gram-positiva, a qual está presente em 24-74% das infecções endodônticas persistentes e assintomáticas (5). Algumas das razões que contribuem para a resiliência do *E. faecalis* são: sua capacidade de sobreviver a longos períodos de privação nutricional, sua excelente capacidade de invadir os túbulos dentinários, além de se ligar à dentina e ao colágeno (5, 6). Em uma tentativa de melhorar a taxa de sucesso do tratamento de canal, é importante direcionar as pesquisas para possíveis bactérias responsáveis pelos fracassos endodônticos.

Idealmente, as soluções irrigadoras devem ser substâncias químicas com ação antimicrobiana, lubrificante, não tóxica, minimamente destrutiva para a estrutura dental, além de proporcionar a dissolução de materiais orgânicos e inorgânicos, e ser relativamente conveniente e fácil de usar (7). O hipoclorito de sódio (NaOCl) é a solução irrigadora mais comumente utilizada no preparo do canal radicular. Em relação ao seu mecanismo de ação, o cloro afeta uma vasta gama de microrganismos, incluindo vírus e fungos, enquanto o oxigênio mata bactérias anaeróbias prevalentes em patologias endodônticas. Devido ao efeito proteolítico do cloro livre do NaOCl, este é também um poderoso solvente do tecido pulpar necrótico e de restos orgânicos (8).

O gluconato de clorexidina tem sido sugerido como irrigante intracanal, devido ao seu efeito antimicrobiano, substantividade e ação prolongada através da ligação à hidroxiapatita (9).

Como passo final, após o emprego do NaOCl ou do gluconato de clorexidina, o EDTA a 17% é recomendado para remover a *smear layer* e abrir os túbulos dentinários para proporcionar uma superfície limpa para a obturação do canal radicular (10). Como alternativa ao EDTA, irrigantes que contenham substâncias quelantes em sua composição têm sido desenvolvidos ao longo dos anos (11-14). O BioPure MTAD (*Dentsply Tulsa Dental Specialties*, Tulsa, OK, EUA) foi lançado comercialmente em 2003 (12), sendo composto por doxicilina, ácido cítrico e um detergente. Seu uso tem sido preconizado após irrigação com NaOCl a 1,3% (15) e vem demonstrando eficácia sobre diferentes cepas de *E. faecalis* (16).

Outro produto desta natureza, mais recentemente lançado nos EUA, chama-se QMiX (*Dentsply Tulsa Dental Specialties*, Tulsa, OK, EUA). De acordo com o fabricante, este irrigante contém uma mistura de gluconato de clorexidina a 2%, EDTA, e um surfactante, capaz de remover *smear layer* e *smear plugs*, enquanto desinfeta ao mesmo tempo. Ele foi concebido para ser utilizado como irrigante final durante 60 a 90 segundos em vez do EDTA, no entanto provoca menos desmineralização dentinária do que o primeiro (17). Assim como no BioPure MTAD, a presença de um detergente reduz a tensão superficial e aumenta a molhabilidade das soluções para permitir penetração nas irregularidades do canal (18). É preconizado que a composição exclusiva do QMiX conseguiu superar descobertas anteriores de formações de precipitado devido à interação entre CHX e EDTA e entre NaOCl e CHX, que são potencialmente cancerígenas (19,20).

Estudos *in vitro* têm mostrado que dentina e materiais orgânicos presentes no interior dos canais radiculares podem afetar a ação antibacteriana de soluções irrigadoras e medicamentos intracanal (21-27). O efeito tampão da dentina pode explicar a inibição de produtos básicos, como medicações à base de hidróxido de cálcio e NaOCl (24).

A albumina é a principal proteína do soro humano e bovino, representando o maior componente do exsudato inflamatório (29). O exsudato proveniente dos tecidos periapicais pode penetrar nos canais radiculares, via forame apical, em casos de infecções purulentas (30). Já foi demonstrado que a presença de albumina pode inibir ou retardar a ação de soluções irrigadoras (23,25,26). Por fim, o

lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano é outro potencial inibidor, encontrado na parede celular de bactérias Gram-negativas, o qual pode formar complexos eletrostáticos com algumas substâncias desinfetantes e, conseqüentemente, prejudicar seu efeito (26).

Portanto, o principal objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia *in vitro* de novas soluções irrigadoras, BioPure MTAD e QMiX, sobre *E. faecalis* e a inibição potencial por pó de dentina humana, albumina sérica bovina e LPS. A hipótese nula indica que não há diferença significativa entre BioPure MTAD, QMiX, NaOCl (0,5%, 1%, 2,5% e 5%), clorexidina gel a 2%, e água apirogênica estéril em eliminar bactérias planctônicas, na presença ou ausência dos inibidores teciduais e endotoxina supracitados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de inibidores teciduais e LPS na atividade antimicrobiana de substâncias químicas auxiliares empregadas no preparo químico mecânico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Comparar a capacidade do BioPure MTAD, QMiX, gluconato de clorexidina gel a 2% e hipoclorito de sódio 0,5%, 1%, 2,5% e 5% em eliminar o *E. faecalis* na forma planctônica nos períodos de 2 minutos, 30 minutos e 6 horas;
- b) avaliar o efeito inibidor do pó de dentina humana na atividade antimicrobiana das substâncias químicas auxiliares nos períodos de 2 minutos, 30 minutos e 6 horas;
- c) avaliar o efeito inibidor do albumina sérica bovina na atividade antimicrobiana das substâncias químicas auxiliares nos períodos de 2 minutos, 30 minutos e 6 horas;
- d) avaliar o efeito inibidor do LPS na atividade antimicrobiana das substâncias químicas auxiliares nos períodos de 2 minutos, 30 minutos e 6 horas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo foi avaliado e aprovado pela comissão de pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFRGS (Anexo 1) e pelo Comitê de Ética da mesma universidade (Anexo 2).

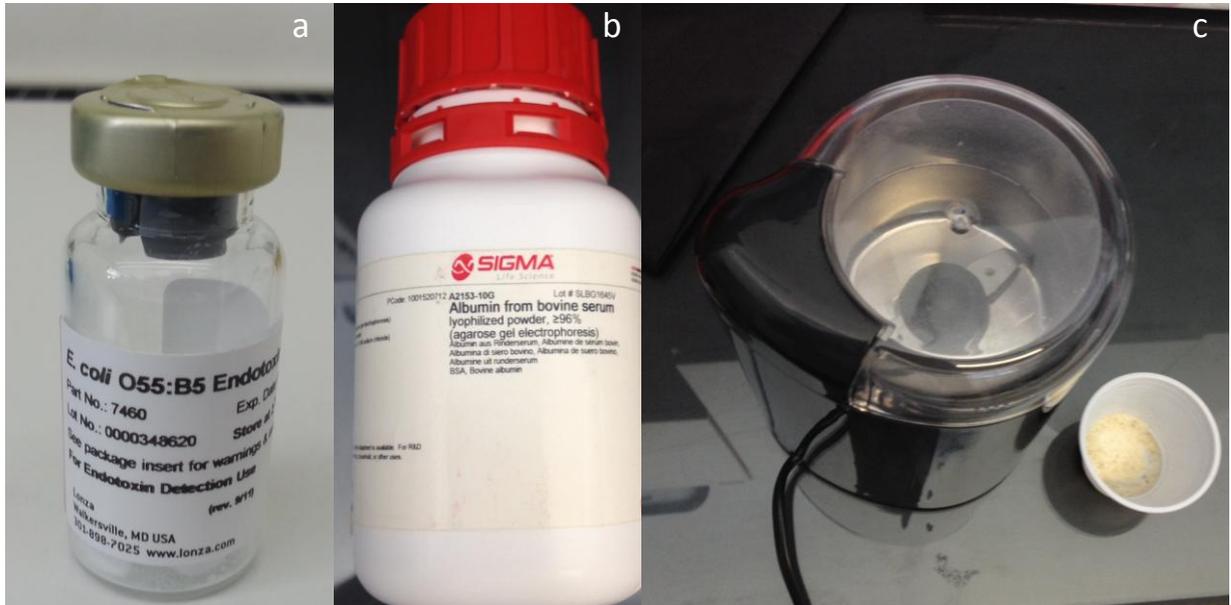
3.2 DELINEAMENTO

Inibidores

Pó de dentina, albumina sérica bovina (BSA 18%; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e lipopolissacarídeo de *Echerichia coli* (LPS; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), na proporção 1 µL/mL, foram testados como potenciais inibidores (26).

O pó de dentina foi preparado conforme descrito previamente (27), a partir de cinco raízes distais de molares inferiores humanos extraídos. As coroas dos dentes e o cimento das raízes foram removidos. A dentina radicular foi esmagada e moída utilizando um moedor elétrico (Modelo DCG-20, Cuisinart, East Windsor, NJ, EUA) e o pó de dentina foi suspenso em água destilada, 28mg por alíquota de 50µL, como preconizado por Haapasalo et al. (21). As alíquotas foram colocadas em tubos teste Eppendorf e esterilizadas em autoclave (HA-300 MII, Hirayama Manufacturing Co, Saitama, Japão) e mantidas a 4°C até o momento do uso.

Figura 1 - (a) Frasco contendo lipopolissacarídeo de *Echerichia coli*, (b) Frasco contendo Albumina sérica bovina, (c) Moedor elétrico, utilizado para moer dentina humana, e frasco contendo dentina em pó.



Fonte: Do autor, 2014.

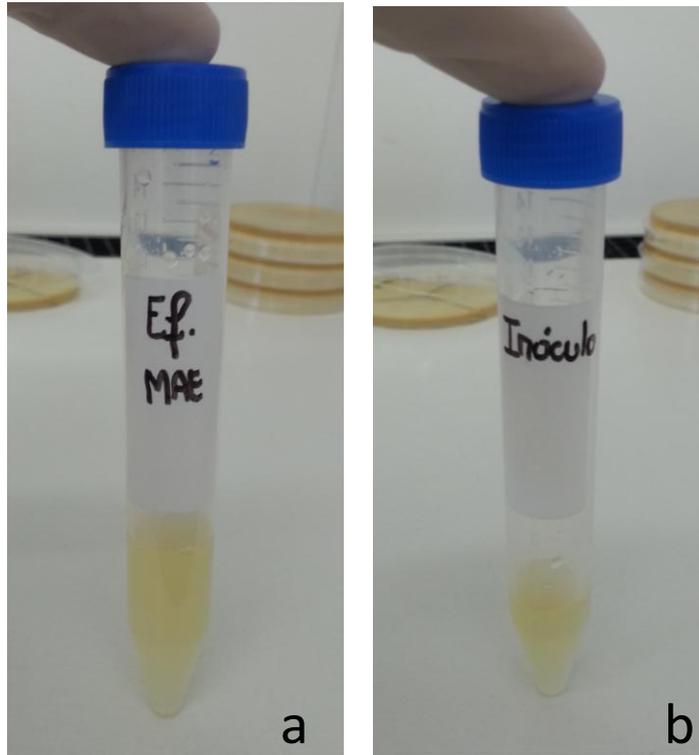
Substâncias químicas auxiliares testadas

As substâncias químicas auxiliares avaliadas foram: BioPure MTAD (*Dentsply Tulsa Dental Specialties*, Tulsa, OK, EUA), QMiX (*Dentsply Tulsa Dental Specialties*, Tulsa, OK, EUA), solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 0,5% 1%, 2,5% e 5% (*Asfer Indústria Química*, São Caetano do Sul, SP, Brasil) e clorexidina (CHX) gel 2% (*Essencial Farma*, Itapetininga, SP, Brasil). Além disso, água apirogênica estéril foi utilizada como controle negativo.

Suspensão bacteriana

Enterococcus faecalis (ATCC 29212) foi utilizado como organismo teste. Uma cultura overnight em placa de ágar Brain Heart Infusion (BHI; *Difco Laboratories*, Detroit, MI, EUA) foi avaliada em relação a pureza através de estudo da morfologia das colônias e pela coloração de Gram. Após foi suspensa em 5 mL de BHI caldo estéril. A suspensão bacteriana foi ajustada por meio de espectrofotômetro (FANEM LTDA, São Paulo, SP, Brasil) a uma densidade celular de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, correspondendo a um valor de absorvância igual a 0,036 (comprimento de onda 540nm)

Figura 2 – (a) Tubo plástico do tipo Falcon contendo *Enterococcus faecalis* em BHI caldo para o inóculo; (b) Tubo plástico do tipo Falcon contendo o inóculo de *Enterococcus faecalis*.



Fonte: Do autor, 2014.

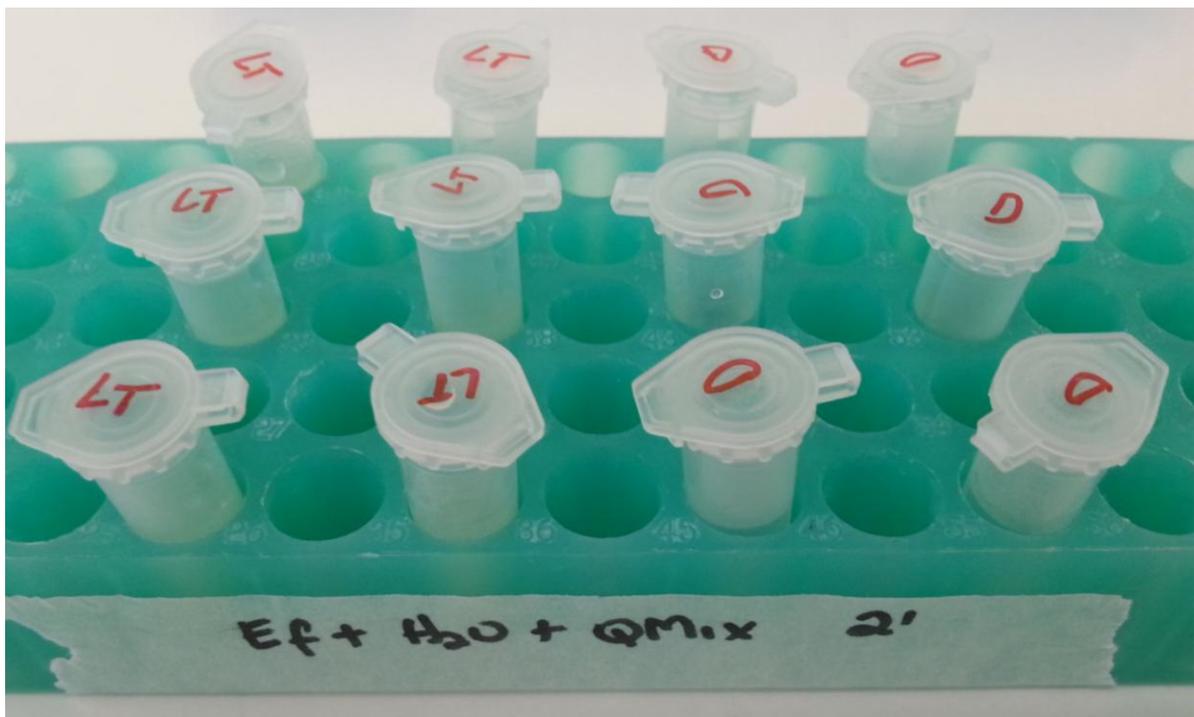
Atividade antibacteriana

Foi utilizado o teste de contato direto previamente descrito por Portenier et al (23), com pequenas modificações. Após ajustada a suspensão bacteriana, em 21 tubos falcon (um para cada solução com cada um dos inibidores), alíquotas de 450 μL da suspensão de pó de dentina, albumina sérica bovina ou LPS foram completamente misturados com 450 μL de uma das soluções irrigadoras e 450 μL da suspensão bacteriana, representando um volume total de 1350 μL . No controle negativo, em um tubo plástico do tipo falcon, água apirogênica ao invés das substâncias químicas auxiliares foi adicionado para manter o volume total. Para o controle da influência dos inibidores na atividade antimicrobiana do *E. faecalis*, em 07 tubos plásticos do tipo falcon (um para cada substância química auxiliar), água apirogênica ao invés dos inibidores foi adicionada para manter o volume total.

Após incubação durante 2 minutos, 30 minutos e 6 horas, alíquotas de 100 μL foram obtidas e submetidas a diluições seriadas até 10^{-4} . Quando as soluções irrigadoras estavam presentes na suspensão, os primeiros dois tubos da sequência de diluição continham um inativador para reduzir o efeito *carry-over* das soluções

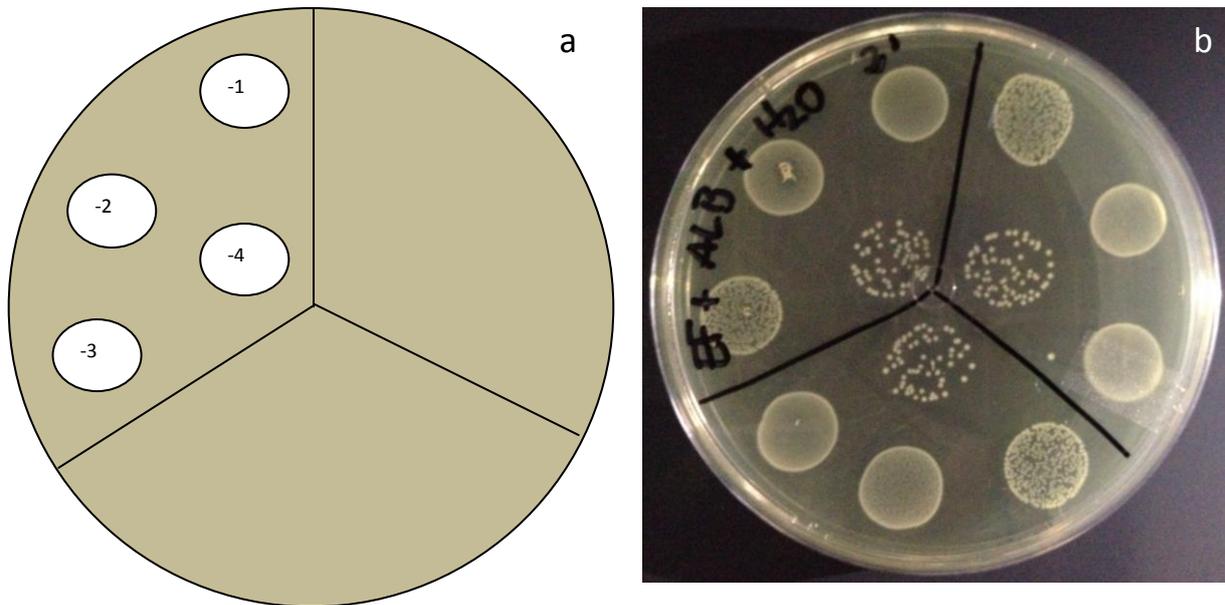
irrigadoras, conforme descrito por Pappen et al. (31). Os seguintes inativadores foram empregados: Tween 80 a 3% + α -lecitina a 0,3% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para MTAD, QMiX e CHX, e tiosulfato de sódio a 0,5% (Mallickrodt Chemical Works, St. Louis, MO, EUA) para NaOCl. Três alíquotas de 20 μ L de cada tubo de diluição foram semeadas em placas de ágar BHI e incubadas a 37°C durante 24 horas em estufa microbiológica. As colônias bacterianas foram contadas com limite para contagem de UFC estabelecido entre 5 e 50 colônias, a pureza foi verificada como já descrito e o número de UFC/mL foi calculado. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 3 - Exemplo de diluição seriada, contendo os dois primeiros tubos plásticos do tipo eppendorf com lecitina + tween 80 e os dois últimos com água destilada estéril feitas em triplicata.



Fonte: Do autor, 2014.

Figura 4 - (a) Representação gráfica da placa de petri com diluições. (b) Exemplo de placa de petri com o crescimento bacteriano nas 4 diluições.



Fonte: Do autor, 2014.

Análise dos dados

Os dados foram inseridos em uma planilha de cálculo (excel), testados em relação a sua normalidade pelo teste Shapiro-Wilk. Não foi constatada distribuição normal. Para comparar as diferentes soluções e a água, em cada tempo experimental (2min, 30min e 6horas), em contato com um dos inibidores (albumina, dentina e LPS) ou na ausência destes, e, posteriormente, para comparar o efeito dos inibidores em cada tempo experimental, considerando cada uma das soluções e a água, os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn. Foi estabelecido um nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

A tabela 1 sumariza os resultados obtidos. Nos períodos de 30 minutos e 6 horas, todas as substâncias químicas auxiliares eliminaram *E. faecalis*, mesmo na presença da dentina, albumina e LPS, sendo diferentes do respectivo controle. A presença dos inibidores, em todos os tempos experimentais, não alterou o crescimento do *E. faecalis* na ausência das soluções irrigadoras.

Em dois minutos, na ausência dos inibidores e na presença da endotoxina todas as soluções foram diferentes do controle (água), sendo capazes de eliminar o *E. faecalis*. Quando em contato com a albumina, apenas o NaOCl 5% foi capaz de eliminar *E. faecalis*. O NaOCl 1%, 2,5%, e CHX gel 2% reduziram a quantidade do microrganismo e o NaOCl 0,5%, MTAD e QMix não foram diferentes do controle. Em contato com a dentina, todas as soluções eliminaram *E. faecalis*, com exceção do MTAD que não apresentou diferenças em relação ao controle.

Tabela 1 - Mediana, valores mínimo e máximo para o número de UFC ($\times 10^5$ / mL) de *E. faecalis* quando expostos às substâncias químicas auxiliares, com ou sem inibidores, em diferentes períodos de tempo (2 minutos, 30 minutos ou 6 horas)

	Water			Albumine			Dentine			Endotoxin		
	2 min	30 min	6 h	2 min	30 min	6 h	2 min	30 min	6 h	2 min	30 min	6 h
Water	185 160-210 aA	182,5 180-185 aA	NC	200 188-224 aA	336 332-244 aA	NC	200 188-216 aA	316 5,2-380 aA	NC	88 4-204 aA	160 152-176 aA	NC
NaOCl 0.5%	0 bB	0 b	0	76 60-84 abA	0 b	0	0 bB	0 b	0	0 bB	0 b	0
NaOCl 1%	0 bB	0 b	0	6 3,2-9,6 cdA	0 b	0	0 bB	0 b	0	0 bB	0 b	0
NaOCl 2,5%	0 bB	0 b	0	14,4 13,6-16 bcdA	0 b	0	0 bB	0 b	0	0 bB	0 b	0
NaOCl 5%	0 b	0 b	0	0 d	0 b	0	0 b	0 b	0	0 b	0 b	0
2% CHX gel	0 bB	0 b	0	0,24 0,22-0,25 cdA	0 b	0	0 bB	0 b	0	0 bB	0 b	0
MTAD	0 bB	0 b	0	29,6 23,4-29,6 abcA	0 b	0	48 0,14-52 aA	0 b	0	0 bB	0 b	0
QMIX	0 bB	0 b	0	25,6 16-32 abcA	0 b	0	0 bB	0 b	0	0 bB	0 b	0

Fonte: Do autor, 2014.

Nota: Diferentes letras minúsculas na mesma coluna significam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha significam diferença estatística significativa entre água e inibidores para cada substância química auxiliar ($P < 0,05$). NC = UFC não contáveis (> 50 UFC).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou a influência de componentes teciduais ou endotoxina microbiana presentes nos canais radiculares contaminados sobre a atividade antimicrobiana de algumas soluções irrigadoras. Em canais radiculares infectados, substâncias químicas auxiliares que apresentam adequada ação contra bactérias endodônticas *in vitro*, podem ter sua atividade comprometida *in vivo*. Tal fato ocorre em função da presença de dentina e de várias outras substâncias que podem inibir a atividade antimicrobiana dos medicamentos e soluções empregadas no tratamento endodôntico (21-23).

A influência da presença de dentina humana, albumina e endotoxina na atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio, clorexidina gel, MTAD e QMIX foi investigada frente à cultura plactônica de *E. faecalis*. A cepa ATCC foi escolhida em função de já ter sido amplamente empregada em investigações prévias a respeito dos efeitos antimicrobianos de soluções irrigadoras de uso endodôntico (26,27,31,32).

O período experimental inicial foi estabelecido a partir dos achados de Morgental et al (27), os quais verificaram que um minuto de contato da clorexidina e do QMix com *E. faecalis* não foi suficiente para eliminá-lo. Considerando que o QMix e o MTAD são soluções preconizadas para o toailete final da cavidade após a conclusão do preparo-químico mecânico, o período de 2 minutos foi empregado objetivando-se verificar a ação antimicrobiana das soluções em um curto espaço de tempo. Como NaOCl e CHX são soluções preconizadas para o preparo químico-mecânico dos canais, o tempo de 30 minutos foi estabelecido, buscando-se aproximar o tempo de contato entre as soluções e o microrganismo do tempo dispendido na prática clínica para realizar-se tal procedimento. O período de 6 horas foi empregado em função da substantividade da clorexidina (9), que também está presente no QMix e possibilita uma atuação por longo período de tempo.

Os resultados desta pesquisa mostraram que apenas o NaOCl 5% não teve sua atividade antimicrobiana influenciada pelos substratos testados como possíveis inibidores em todos os tempos experimentais, mostrando-se o irrigante mais efetivo. Tal achado concorda com estudos prévios que também demonstraram a superioridade desta solução em altas concentrações (27,31,32). Apesar do NaOCl ser o irrigante mais amplamente empregado na Endodontia, não há consenso a

respeito da concentração ideal (3). Estudos prévios mostraram que seu emprego em altas concentrações é uma maneira de eliminar tanto as bactérias planctônicas como o biofilme presente no interior do canal radicular (13,14). Apesar de sua vantagem em relação à atividade antimicrobiana, o emprego do NaOCl em altas concentrações é controverso, pois pode causar irritação severa em casos de extravasamento acidental para os tecidos periapicais (33).

A presença da albumina, retardou a ação das substâncias químicas auxiliares testadas, com exceção do NaOCl 5%, em contato com o *E. faecalis*, uma vez que só foram capazes de eliminar tal microrganismo após 30 minutos de contato com o mesmo. Corroborando com estes achados, Pappen et al. (25) comprovaram o efeito inibitório da albumina, sendo concentração-dependente, sobre a ação do NaOCl. Por sua vez, Portenier et al. (23) verificaram que a ação do MTAD e da clorexidina foi retardada na presença de albumina. No mesmo estudo, a influência da albumina na ação antimicrobiana da clorexidina associada à cetramida foi comprovada. Por conter tais soluções em sua composição, o retardo da ação do QMix frente à cultura de *E. faecalis*, quando na presença da albumina, pode ser explicado.

O modelo de pó de dentina proposto por Haapasalo et al. (21) tem sido utilizado para investigar o efeito da presença desta na atividade antimicrobiana de substâncias empregadas no tratamento endodôntico (22,23,26,27). Assim como neste, no estudo de Portenier et al. (23) o efeito antimicrobiano do MTAD foi retardado pela presença de dentina. As demais soluções testadas não foram influenciadas pela presença deste componente, discordando dos achados de Haapasalo et al (21), onde a ação antimicrobiana do NaOCl 1% e da clorexidina 0,05% foi reduzida na presença de dentina. Da mesma forma, Portenier et al. (23) verificaram que a dentina atrasou a atividade antimicrobiana da clorexidina 0,02%. Tais diferenças podem ser atribuídas às menores concentrações da clorexidina empregadas nos referidos estudos em comparação com a utilizada no presente. Quando a concentração de 2% foi testada, os resultados encontrados foram semelhantes aos aqui apresentados (27). Diferindo dos achados da presente investigação, Morgental et al. (27) verificaram que a presença de pó de dentina retardou a ação antimicrobiana do QMix, NaOCl 1% e 6%. As diferenças verificadas podem ser atribuídas aos curtos tempos experimentais, 10 segundos e 1 minuto, não avaliados nesta pesquisa, e, também, ao fato de os referidos autores terem utilizado pó de dentina bovina, cuja

composição química ainda foi pouco investigada, podendo influenciar na intensidade do efeito tampão por ela promovido, sendo este responsável pela inibição da ação antimicrobiana das soluções.

A endotoxina bacteriana não apresentou efeito inibitório nas substâncias químicas auxiliares testadas. O LPS bacteriano é encontrado na parede celular de bactérias gram-negativas sendo liberado durante o crescimento, multiplicação e lise celular. Sendo assim, é um componente comumente presente em canais radiculares contaminados (34). Por ser capaz de formar componentes eletrostáticos com algumas substâncias desinfetantes (26), a hipótese testada foi de que tal componente poderia influenciar negativamente a ação antimicrobiana das substâncias químicas auxiliares frente à cultura plantônica de *E. faecalis*, porém o mesmo não foi observado. Em canais radiculares infectados constatou-se que a concentração do LPS é variável de acordo com a presença ou ausência de sintomatologia (35). Sendo assim, embora no presente estudo tenha sido empregada a concentração média de endotoxina encontrada nos canais radiculares (35), o efeito de variações em sua concentração deve ser investigado em futuras pesquisas.

Com os avanços tecnológicos, o preparo químico-mecânico dos canais radiculares tem se tornado uma manobra cada vez mais rápida e atenção deve ser tomada para que as substâncias empregadas tenham tempo suficiente para atuar de forma satisfatória. O conjunto de dados obtidos na presente investigação contribuiu com informações a respeito de possíveis interações das soluções irrigadoras com componentes dos canais radiculares em um modelo *in vitro*. O retardo na atividade antimicrobiana do NaOCl 0,5%, 1% e 2,5%, da Clorexidina gel 2%, do MTAD e do QMix na presença de albumina e do MTAD na presença de dentina evidenciou a influência destes componentes na ação das substâncias químicas auxiliares no sistema de canais radiculares durante o tratamento endodôntico. Entretanto, fatores que não estão presentes no modelo experimental empregado podem exercer um papel importante na efetividade e modo de ação destas substâncias *in vivo*. Sendo assim, tais achados devem ser complementados com investigações *in vivo* para melhor representar a aplicação clínica destas soluções.

6 CONCLUSÕES

Conclui-se que, em curto período de tempo, a dentina e a endotoxina não influenciaram a ação antimicrobiana das substâncias químicas auxiliares testadas, frente ao *E. faecalis*. Na presença de albumina as substâncias testadas, com exceção do NaOCl 5%, necessitaram de um tempo maior para eliminar o microrganismo. O mesmo foi observado na presença de dentina, quando o *E. faecalis* foi exposto ao MTAD.

REFERÊNCIAS

1. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965;20:340-9.
2. Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res.* 1981;89:321-8.
3. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod.* 2006;32:389-98.
4. Haapasalo M, UT, Endal U. Persistent, recurrent and acquired infection of the root canal system post-treatment. *Endod topics* 2003;6:29-56.
5. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.* 2006;32:93-8.
6. Love RM. *Enterococcus faecalis*--a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J.* 2001;34:399-405.
7. Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Dent Clin North Am.* 2010;54:291-312.
8. Dychdala GR. Chlorine and chlorine compounds. In: Block SS, editor. *Disinfection, sterilization and prevention.* 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1991. p. 133-5.
9. Fardal O, Turnbull RS. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *J Am Dent Assoc.* 1986;112:863-9.
10. Bystrom A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J.* 1985;18:35-40.
11. Heling I, Irani E, Karni S, Steinberg D. In vitro antimicrobial effect of RC-Prep within dentinal tubules. *J Endod.* 1999;25:782-5.
12. Torabinejad M, Khademi AA, Babagoli J, Cho Y, Johnson WB, Bozhilov K et al. A new solution for the removal of the smear layer. *J Endod.* 2003;29:170-5.
13. Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod.* 2006;32:527-31.
14. Dai L, Khechen K, Khan S, Gillen B, Loushine BA, Wimmer CE et al. The effect of QMix, an experimental antibacterial root canal irrigant, on removal of canal wall smear layer and debris. *J Endod.* 2011;37:80-4.
15. Lotfi M, Vosoughhosseini S, Saghiri MA, Zand V, Ranjkesh B, Ghasemi N. Effect of MTAD as a final rinse on removal of smear layer in ten-minute preparation time. *J Endod.* 2012;38:1391-4.

16. Tong Z, Ling J, Lin Z, Li X, Mu Y. The effect of MTADN on 10 *Enterococcus faecalis* isolates and biofilm: an in vitro study. *J Endod.* 2013;39:674-8.
17. Dentsply. [Internet]. QMiX 2in1 irrigating solution. [acesso em 2013, maio 29]; Disponível em: <http://www.tulsadentalspecialties.com/default/endodontics/activation/QMix.aspx>.
18. Wang Z, Shen Y, Ma J, Haapasalo M. The effect of detergents on the antibacterial activity of disinfecting solutions in dentin. *J Endod.* 2012;38:948-53.
19. Rasimick BJ, Nekich M, Hladek MM, Musikant BL, Deutsch AS. Interaction between chlorhexidine digluconate and EDTA. *J Endod.* 2008;34:1521-3.
20. Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *J Endod.* 2011;37:1380-5.
21. Haapasalo HK, Siren EK, Waltimo TM, Orstavik D, Haapasalo MP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int Endod J.* 2000;33:126-31.
22. Portenier I, Haapasalo H, Orstavik D, Yamauchi M, Haapasalo M. Inactivation of the antibacterial activity of iodine potassium iodide and chlorhexidine digluconate against *Enterococcus faecalis* by dentin, dentin matrix, type-I collagen, and heat-killed microbial whole cells. *J Endod.* 2002;28:634-7.
23. Portenier I, Waltimo T, Orstavik D, Haapasalo M. Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. *J Endod.* 2006;32:138-41.
24. Haapasalo M, Qian W, Portenier I, Waltimo T. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. *J Endod.* 2007;33:917-25.
25. Pappen FG, Qian W, Aleksejūniene J, Leonardo RT, Leonardo MR, Haapasalo M. Inhibition of sodium hypochlorite antimicrobial activity in the presence of bovine serum albumin. *J Endod.* 2010;36:268-71.
26. Shrestha A, kishen A. The effect of tissue inhibitors on the antibacterial activity of chitosan nanoparticles and photodynamic therapy. *J Endod.* 2012;38:1275–1278.
27. Morgental RD, Singh A, Sappal H, Kopper PM, Vier-Pelisser FV, Peters OA. Dentin inhibits the antibacterial effect of new and conventional endodontic irrigants. *J Endod.* 2013;39:406-10.
28. Tögl-Leimüller A, Egger G, Porta S. Albumin as one-way transport vehicle into sites of inflammation. *Exp Pathol.* 1986;30:91–6.
29. Kishen A. Periapical biomechanics and the role of cyclic biting force in apical retrograde fluid movement. *Int Endod J.* 2005;38:597–603.

30. Pappen FG, Shen Y, Qian W, Leonardo MR, Giardino L, Haapasalo M. In vitro antibacterial action of Tetraclean, MTAD and five experimental irrigation solutions. *Int Endod J*. 2010;43:528-35.
31. Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2001;34:424–8.
32. Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004;97:79–84.
33. Kleier DJ, Averbach RE, Mehdipour O. The sodium hypochlorite accident: experience of diplomates of the American Board of Endodontics. *J Endod*. 2008;34:1346–50.
34. Leonardo MR, Silva RA, Assed S, Nelson-Filho P. Importance of bacterial endotoxin (LPS) in endodontics. *J Appl Oral Sci*. 2004;12:93-8.
35. Jacinto RC1, Gomes BP, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *J Med Microbiol*. 2005; 54:777-83.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DA COMPESQ



Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Odontologia

PARECER CONSUBSTANCIADO DA COMISSÃO DE PESQUISA

Parecer aprovado em reunião do dia 16 de agosto de 2013

ATA nº 05/2013.

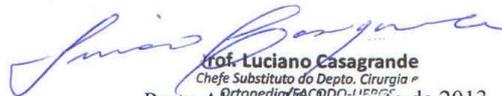
A Comissão de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul após análise aprovou o projeto abaixo citado com o seguinte parecer:

O objetivo do presente estudo *in vitro* será avaliar a eficácia de soluções irrigadoras, empregadas para o preparo dos canais radiculares, sobre *E. Faecalis*, e o efeito da presença de pó de dentina, albumina sérica bovina ou LPS na atividade antimicrobiana de tais soluções. Especificamente o projeto visa: a) comparar a capacidade do BioPure MTAD, QMiX, NaOCl a 2,5% e clorexidina a 2% em eliminar o *E. faecalis* na forma planctônica; b) avaliar o efeito inibidor do pó de dentina na atividade antimicrobiana do BioPure MTAD, QMiX, NaOCl a 2,5% e clorexidina a 2%; c) Avaliar o efeito inibidor do albumina sérica bovina na atividade antimicrobiana do BioPure MTAD, QMiX, NaOCl a 2,5% e clorexidina a 2% e d) Avaliar o efeito inibidor do LPS na atividade antimicrobiana do BioPure MTAD, QMiX, NaOCl a 2,5% e clorexidina a 2%. Solução salina esterilizada será empregada como controle negativo. As soluções serão testadas sobre *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), avaliando o possível efeito inibitório de dentina pulverizada, albumina sérica bovina e lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano. O pó de dentina será preparado a partir de raízes distais de molares inferiores e posteriormente esterilizado. A sobrevivência das bactérias expostas aos irrigantes na presença ou ausência dos inibidores será monitorizada, sob condições planctônicas. O número de unidades formadoras de colônias (UFC) será determinado, submetido à transformação logarítmica e, posteriormente, analisado por meio de ANOVA e teste t de Student. Valores de P inferiores a 0,05 serão considerados significativos. Cumpre ressaltar que as raízes a serem empregadas na pesquisa são parte dos dentes já empregados em um estudo prévio, já avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Número do parecer: 244.304; Data da relatoria: 21/03/13).

O projeto encontra-se bem descrito e fundamentado. O parecer é pela aprovação. Cadastrar o projeto na plataforma Brasil e encaminhar ao comitê de ética da UFRGS. Atenciosamente, Comissão de Pesquisa de Odontologia.

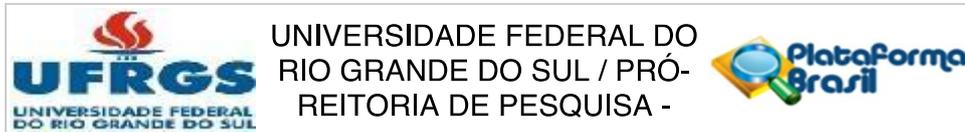
PROJETO DE PESQUISA Nº 25582: EFEITO DE INIBIDORES TECIDUAIS SOBRE A ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE NOVAS SOLUÇÕES IRRIGADORAS

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Patricia Maria Poli Kopper


Prof. Luciano Casagrande
 Chefe Substituto do Depto. Cirurgia e
 Ortodontia/FACOD/UFRGS
 Porto Alegre, 16 de agosto de 2013.

Prof. Dr. Luciano Casagrande
 Coordenador da Comissão de Pesquisa ODONTOLOGIA UFRGS

ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DA CEP/UFRGS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITO DE INIBIDORES TECIDUAIS SOBRE A ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE NOVAS SOLUÇÕES IRRIGADORAS

Pesquisador: Patrícia Maria Poli Kopper Móra

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 35289314.0.0000.5347

Instituição Proponente: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 834.833

Data da Relatoria: 25/09/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto que envolve a participação de bolsistas de Iniciação Científica e aluno de Pós-doutorado. Tem como tema o papel da presença de microrganismos como causa de falha de tratamento endodôntico. Nesse contexto, *Enterococcus faecalis* é bactéria presente em 24-74% das infecções endodônticas persistentes e assintomáticas. Soluções irrigadoras, como hipoclorito de sódio e gluconato de clorexidina, são utilizadas no preparo do canal radicular. EDTA e irrigantes que contêm substâncias quelantes em sua composição (como BioPure MTAD e QMiX) também têm sido recomendados. Estudos in vitro têm mostrado que dentina e materiais orgânicos presentes no interior dos canais radiculares podem afetar a ação antibacteriana de soluções irrigadoras e medicamentos intracanal. Trabalhos prévios sugerem que dentina, albumina e lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano são inibidores potenciais da ação de soluções irrigadoras.

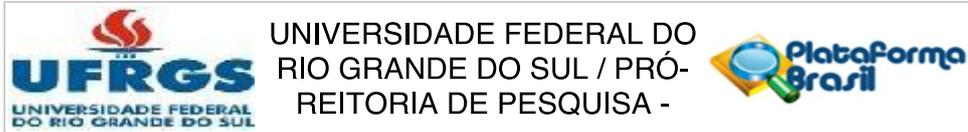
Objetivo da Pesquisa:

Esta pesquisa tem por objetivo 'avaliar a eficácia de soluções irrigadoras, empregadas para o preparo dos canais radiculares, sobre *E. faecalis*, e o efeito da presença de pó de dentina, albumina sérica bovina ou LPS na atividade antimicrobiana de tais soluções.'

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Benefícios estão descritos no projeto de pesquisa, na Plataforma e no TCLE.

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



de Fischer será utilizado para avaliação das variáveis categóricas de instrumento fraturado. Será empregado um nível de significância de 0,05.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do presente estudo será avaliar o transporte apical e o tempo de preparo do canal radicular, bem como a deformação e a fratura de instrumentos WaveOne, Wizard Navigator e ProTaper.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Apresentados de forma completa pelo pesquisador.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto já foi aprovado pela Compesq Odontologia, sendo que cronograma e orçamento estão adequados. A diligência foi atendida na íntegra.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

O projeto de pesquisa está em condições de aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto de pesquisa está em condições de aprovação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Encaminha-se.

PORTO ALEGRE, 12 de Abril de 2013

Assinador por:
José Artur Bogo Chies
(Coordenador)

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - 2º andar do Prédio da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br