

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PEDRO HENRIQUE MARKS DUARTE

EFEITO DO ETANOL NA AÇÃO ANTIMICROBIANA DA CLOREXIDINA SOBRE
BIOFILME ORAL

Porto Alegre

2015

PEDRO HENRIQUE MARKS DUARTE

EFEITO DO ETANOL NA AÇÃO ANTIMICROBIANA DA CLOREXIDINA SOBRE
BIOFILME ORAL

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 obtenção do título de Cirurgião-Dentista

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Reis Só

Porto Alegre

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Duarte, Pedro Henrique Marks
Efeito do etanol na ação antimicrobiana da
clorexidina sobre biofilme oral / Pedro Henrique
Marks Duarte. -- 2015.
28 f.

Orientador: Marcus Vinícius Reis Só.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade
de Odontologia, Curso de Odontologia, Porto Alegre,
BR-RS, 2015.

1. Biofilme Dentário. 2. Endodontia. 3. Etanol.
4. Irrigantes do canal radicular. 5. Microscopia
Confocal. I. Só, Marcus Vinícius Reis, orient. II.
Título.

Dedico este trabalho à minha família, pelo apoio incondicional durante a minha formação. À minha mãe, Miriam Beatriz Marks Duarte, que com a sua paixão pelo estudo, me inspirou nos momentos de dificuldade e me mostra a cada dia a necessidade e o valor do conhecimento. Ao meu pai, Sérgio da Cunha Duarte, que sempre foi meu exemplo de como um profissional deve ser, com a sua força de vontade e o modo como tratar o próximo.

Aos meus amigos e colegas de faculdade, em especial a Luís Eduardo Volkmer da Rosa e Primo Guilherme Vargas Pasqual, pela convivência e companheirismo nessa trajetória, nos momentos bons e ruins.

À Bárbara Rocha Christófoli, por estar sempre ao meu lado, me dando suporte nas dificuldades encontradas e sendo minha companheira, parceira e fonte de motivação.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Marcus Viícius Reis Só, orientador deste trabalho. Obrigado pela confiança depositada em mim ao aceitar me orientar neste trabalho, pelos ensinamentos sobre pesquisa e endodontia, pelo apoio e pelo contínuo incentivo. Sempre serás um exemplo de professor e cirurgião-dentista. Muito obrigado.

Aos cirurgiões-dentistas, e agora Doutores em Endodontia, Manuela Favarin Santini e Ricardo Abreu da Rosa, muito obrigado pelo companheirismo e auxílio durante este trabalho, suas contribuições foram essenciais para este trabalho e para a minha formação.

RESUMO

DUARTE, Pedro Henrique Marks. **Efeito do etanol na ação antimicrobiana da clorexidina sobre biofilme oral**. 28 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre

Introdução: A fim de evitar a formação de um precipitado marrom-alaranjado, resultado da reação entre o hipoclorito de sódio (NaOCl) e a clorexidina, deve-se utilizar uma solução intermediária. O objetivo foi avaliar o efeito do etanol 95%, como solução intermediária, na ação antimicrobiana da clorexidina 2% sobre o biofilme oral, por meio da análise em microscopia confocal de varredura à laser (MCVL).

Materiais e métodos: Formação de biofilme oral foi induzida sobre 80 blocos de dentina bovina, fixos em um dispositivo intraoral, distribuídos aleatoriamente em 2 grupos (5 e 10 minutos) e 4 subgrupos, de acordo com a solução: soro fisiológico (SORO₅ e SORO₁₀), soro fisiológico seguido de clorexidina (SORO/CHX₅ e SORO/CHX₁₀), etanol (ETANOL₅ e ETANOL₁₀), etanol seguido de clorexidina (ETANOL/CHX₅ e ETANOL/CHX₁₀). A superfície dos blocos foi corada com *Live/Dead® BacLight* para análise em MCVL. Imagens de três áreas de cada bloco foram obtidas e analisadas pelo programa BioImage_L. Os parâmetros avaliados foram biovolume (μm^3) da população total e de células vivas (verde) e o percentual (%) de células vivas da espessura do biofilme visualizada em MVCL e da porção mais superficial desse biofilme.

Resultados: Os grupos ETANOL₅, SORO/CHX₁₀, ETANOL₁₀ e ETANOL/CHX₁₀ apresentaram diferenças estatísticas ($P < 0,05$) em relação ao grupo Soro₅ para os dois tipos de espessura.. Os grupos ETANOL₁₀ e ETANOL/CHX₁₀ demonstraram diferenças em relação aos grupos ETANOL/CHX₅ e SORO₁₀ na análise de maior espessura, enquanto que. os grupos SORO/CHX₅, SORO/CHX₁₀, ETANOL₅, ETANOL₁₀, ETANOL/CHX₅ e ETANOL/CHX₁₀ apresentaram diferença estatística em relação aos grupos SORO₅ e SORO₁₀ ($P < 0,05$) na análise de superfície, porém sem diferença entre si ($P > 0,05$).

Conclusões: Baseados na metodologia e resultados é licito concluir que embora não se perceba a influência do etanol sobre a ação antibacteriana da clorexidina, é necessário cautela na indicação do etanol como irrigante intermediário.

Palavras-chave: Biofilme. Endodontia. Etanol. Irrigantes do Canal Radicular. Microscopia Confocal.

ABSTRACT

DUARTE, Pedro Henrique Marks. **Effect of ethanol on the antimicrobial action of chlorhexidine over oral biofilm.** 28 f. Final Paper (Graduation in Dentistry) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre

Introduction: In order to prevent the formation of an orange-brown precipitate, which is the result of a reaction between sodium hypochlorite (NaOCl) and chlorhexidine, it should be used as an intermediate flush. The aim of this study was to evaluate the effect of 95% alcohol, as an intermediate flush, over the antibacterial properties of 2% chlorhexidine on oral biofilm, with confocal laser scanning microscopy (CLSM).

Materials and Methods: Oral biofilm development was induced in 80 sterilized bovine dentin blocks, fixed on a removable orthodontic device, distributed in 2 groups (5 and 10 minutes) and 4 subgroups, according to the solution used: Saline solution (Soro5, Soro10), Saline solution followed by Chlorhexidine (S/CHX5, S/CHX10), Ethanol (E5, E10), ethanol followed by chlorhexidine (E/CHX5, E/CHX10). The surface of the block was dyed with *Live/Dead® BacLight* for analysis with CLSM. Images from three different areas were obtained and analysed by BioImage_L program. The parameters were total biovolume (μm^3) and of the live cells (green) and the percentage (%) of live cells of the thickness of the biofilm visualized in CLSM and of the most superficial portion of this biofilm.

Results: The groups E5, S/CHX10, E10 and E/CHX10 presented statistical differences ($P < 0.05$) in relation to the group S5. The E10 and E/CHX10 groups showed difference in relation with E/CHX5 and S10 groups, in the analysis of the thickness of the biofilm, meanwhile, the S/CHX5, S/CHX10, E5, E10, E/CHX5 and E/CHX10 groups showed statistical differences in relation to the groups S5 and S10 ($P < 0.05$), in the analysis of the surface, but without difference between each other ($P > 0.05$).

Keywords: Biofilm. Endodontics. Ethanol. Root canal irrigants. Confocal microscopy.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	7
2	ARTIGO CIENTÍFICO.....	9
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	20
	REFERÊNCIAS.....	23
	ANEXO – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP/UFRGS.....	26

1 INTRODUÇÃO

Os principais objetivos dos protocolos de irrigação endodôntica são movimentação de partículas, ação antimicrobiana, solubilização de tecidos e detritos orgânicos e inorgânicos e lubrificação das paredes dentinárias. É realizada antes, durante e após a conclusão do preparo do canal, empregando dispositivos e substâncias químicas específicas para cada caso clínico (HAAPASALO et al., 2010).

Nas infecções endodônticas primárias e secundárias, os microrganismos encontram-se organizados em biofilme, ou seja, as células bacterianas estão aderidas a um substrato, e imersas em uma matriz polissacarídica que preenche o espaço entre as células (DONLAN; COSTERTON, 2002). Estudos prévios têm utilizado o biofilme intraoral para testar o efeito de diferentes soluções irrigadoras e de medicações intracanal (DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2011; ORDINOLA-ZAPATA et al., 2012) e esse parece o modo mais fidedigno de simular *in vitro* o comportamento bacteriano frente a agente antimicrobianos.

Embora, idealmente, os métodos mecânicos devessem remover o biofilme intrarradicular, os instrumentos endodônticos não possuem acesso direto a todas as paredes, istmos e irregularidades do canal radicular (PAQUE; GANAHL; PETERS, 2009; PAQUE et al., 2010; PETERS, 2004) e por isso, se faz necessário o uso de soluções irrigadoras durante o preparo biomecânico. O processo de irrigação final busca otimizar a ação do irrigante principal, e é feita com o uso associado de duas ou mais substâncias, após o preparo completo do canal radicular (ALVES et al., 2011; BACA et al., 2011; PAIVA et al., 2012; ZEHNDER, 2006).

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é universalmente aceito como a solução padrão para a irrigação dos canais radiculares em função da sua capacidade de dissolver tecidos orgânicos e da sua propriedade antimicrobiana (ESTRELA et al., 2002). Entretanto, apresenta limitações diante de algumas condições microbianas endodônticas, elevado potencial alergênico e ação deletéria sobre a dentina radicular (ZHANG et al., 2010). Além disso, em altas concentrações, o NaOCl é tóxico e irritante aos tecidos periapicais (PASHLEY et al., 1985).

A clorexidina 2% tem sido utilizada em combinação com o hipoclorito de sódio, no intuito de contemplar as suas deficiências (HAPASAALO et al., 2010). A clorexidina apresenta baixa toxicidade (ZEHNDER, 2006) e ação sobre *E. faecalis* (LI; LIU; XU, 2012). Entretanto possui a desvantagem de não apresentar ação solvente de matéria orgânica nem ação neutralizante de produtos tóxicos de origem microbiana, tais como endotoxinas (DE LA CASA et al., 2008; DE OLIVEIRA et al., 2007).

A clorexidina, quando em contato com o NaOCl, produz um precipitado marrom-alaranjado (BUI; BAUMGARTNER; MITCHELL, 2008; TAY et al., 2006). Esse composto induz a alteração da cor dental e a obliteração dos túbulos dentinários, comprometendo a adesão do cimento obturador à dentina radicular (TAY et al., 2006).

A composição química desse precipitado não está completamente definida. A formação do precipitado ocorre a partir da combinação de concentrações mínimas do hipoclorito de sódio, desde 0,023% a 6% com a CHX (BASRANI et al., 2007). Diversas investigações foram realizadas para verificar a composição química deste precipitado (BARBIN et al., 2008; BASRANI et al., 2007; BASRANI et al., 2010; BUI; BAUMGARTNER; MITCHELL, 2008; MARCHESAN et al., 2007; THOMAS; SEM, 2010) sendo detectada a presença de Ca, Fe e Mg (NOWICKI; SEM, 2011). Inicialmente foi designado como sendo paracloroanilina (PCA) (NOWICKI; SEM, 2011) que, quando presente, é citotóxica (BUI; BAUMGARTNER; MITCHELL, 2008). Porém, Krishnamurthy e Sudhakaran (2010) observaram que o precipitado formado é composto de, ao menos duas moléculas isoladas, menores e derivadas da clorexidina, designadas de para-clorofenil-uréia (PCU) e para-cloro-fenilguanidil- 1,6-diguanididil-hexano (PCGH).

Com o propósito de minimizar a formação do precipitado, soluções como soro fisiológico, água destilada, ácido cítrico, EDTA e, mais recentemente, o etanol, vem sendo estudadas como possíveis irrigantes intermediários (KRISHNAMURTHY; SUDHAKARAN, 2010). Krishnamurthy e Sudhakaran (2010) observaram que o álcool absoluto foi a única solução que evitou a formação do precipitado quando comparado com o soro e a água destilada. Mortenson et al. (2012) verificou que o ácido cítrico e o EDTA não foram capazes de evitar a formação do precipitado.

Apesar de o álcool absoluto evitar a formação do precipitado, não se sabe quais são os seus efeitos sobre a atividade antimicrobiana da clorexidina. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi verificar se o etanol 95% altera a ação antimicrobiana da CHX 2%, sobre o biofilme oral, por meio da microscopia confocal de varredura à laser, em 5 e 10 minutos de contato com as soluções testadas.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

Este trabalho está apresentado na forma de artigo científico, nas normas da revista Brazilian Dental Journal.

Introdução

Os protocolos de irrigação endodôntica têm como principais objetivos a movimentação de partículas, ação antimicrobiana, solubilização de tecidos e detritos orgânicos e inorgânicos e lubrificação das paredes dentinárias. Deve ser realizada durante e após a conclusão da instrumentação endodôntica, empregando dispositivos e substâncias específicas para cada caso clínico (HAAPASALO et al., 2010).

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é universalmente aceito como a solução padrão para a irrigação dos canais radiculares em função de sua capacidade de dissolver tecidos orgânicos e de sua propriedade antimicrobiana (ESTRELA et al., 2002). Entretanto, apresenta limitações diante de algumas condições microbianas endodônticas, elevado potencial alergênico e ação deletéria sobre a dentina radicular (ZHANG et al., 2010). Além disso, em altas concentrações, o NaOCl é tóxico e irritante aos tecidos periapicais (PASHLEY et al., 1985). A clorexidina 2% (CHX) tem sido utilizada em combinação com NaOCl, no intuito de contemplar as deficiências apresentadas pelo hipoclorito (HAPASAALO et al., 2010). A clorexidina apresenta baixa toxicidade (ZEHNDER, 2006) e ação sobre *E. faecalis* (LI, LIU, XU, 2012). Entretanto possui a desvantagem de não apresentar ação solvente de matéria orgânica nem ação neutralizante de produtos tóxicos de origem microbiana, tais como endotoxina (DE LA CASA et al., 2008; DE OLIVEIRA et al., 2007).

A clorexidina, quando em contato com o NaOCl, produz um precipitado marrom-alaranjado (BUI; BAUMGARTNER; MITCHELL, 2008; TAY et al., 2006). Esse composto induz a alteração de cor dental e a obliteração dos túbulos dentinários, comprometendo a adesão do cimento obturador à dentina radicular (TAY et al., 2006) bem como podendo apresentar na sua composição a paracloroanilina substância essa dotada de efeito citotóxico (NOWICKI; SEM, 2011; BUI; BAUMGARTNER; MITCHELL, 2008).

Com o propósito de minimizar a formação do precipitado, soluções como soro fisiológico, água destilada, ácido cítrico, EDTA e, mais recentemente, o etanol, vem sendo estudadas como possíveis irrigantes intermediários (KRISHNAMURTHY; SUDHAKARAN, 2010). Krishnamurthy e Sudhakaran (2010) observaram que o álcool absoluto foi a única solução que evitou a formação do precipitado quando comparado com o soro e a água

destilada. Mortenson et al. (2012) verificou que o ácido cítrico e o EDTA não foram capazes de evitar a formação do precipitado.

Apesar do álcool evitar a formação do precipitado, não se sabe quais seus efeitos sobre a atividade antimicrobiana da clorexidina (CHX). Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi verificar se o etanol 95% altera a ação antimicrobiana da CHX 2%, sobre o biofilme oral, por meio da microscopia confocal de varredura à laser, em 5 e 10 minutos de contato com as soluções testadas.

Materiais e Métodos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética: 708.353). Para o cálculo amostral foi utilizado o pacote estatístico BioEstat 5.0 (Fundação Mamirauá, Belém, Pará, Brasil), que indicou um número de 80 amostras, 20 por grupo.

Oitenta blocos de dentina bovina, medindo aproximadamente 3 mm x 3 mm x 2 mm, foram obtidos utilizando-se um disco diamantado dupla face (Komet, Santo André, SP, Brasil) montado em micro motor de baixa rotação. As amostras foram imersas em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 17% por 3 minutos para remoção da smear layer produzida durante o corte das raízes. Em seguida, os blocos foram armazenados em tubos de ensaio com tampas rosqueáveis, contendo 5 ml de água destilada e esterilizados em autoclave.

Os blocos foram fixados com godiva a um dispositivo intrabucal palatino removível de resina acrílica autopolimerizável. Dois voluntários saudáveis (de 23 e 24 anos), com hábitos alimentares semelhantes, utilizaram o dispositivo durante três dias seguidos, para a indução do biofilme, removendo-os somente para alimentação e higiene oral (DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2011). Sobre os blocos foi colocada uma tela de proteção para evitar a remoção mecânica do biofilme. Após o período de indução do biofilme, os blocos foram removidos dos dispositivos e colocados em tubos Ependorf contendo 1ml de Brain Heart Infusion (BHI) e armazenados em estufa, a 37°C, por 24h. (ORDINOLA-ZAPATA et al. 2013).

Após as 24 horas, os blocos foram removidos do BHI e lavados com água destilada, para remoção de células não aderidas e meio de cultura.. As amostras foram divididas em quatro grupos, com dois subgrupos em cada (n=10): SORO5 – Soro (5 minutos), SORO10 – Soro (10 minutos), SORO/CHX5 – Soro (5 minutos) + CHX (5 minutos), SORO/CHX10 – Soro (10 minutos) + CHX (10 minutos), ETANOL5 – Etanol (5 minutos), ETANOL10 –

Etanol (10 minutos), ETANOL/CHX5 – Etanol (5 minutos) + CHX (5 minutos), ETANOL/CHX10 – Etanol (10 minutos) + CHX (10 minutos).

Os blocos de dentina ficaram imersos em 5 ml de cada solução. Após esse contato, a superfície dos blocos foi lavada com 2 ml de soro fisiológico e, em seguida, foi dispensado 0,25 µl do corante Live/Dead® BacLight Bacterial Viability (Invitrogen, Eugene, OR, USA) para análise em microscópio confocal de varredura à laser (MCVL) (Olympus Fluoview 1000, Olympus Corporation, Tóquio, Japão).

A técnica de SYTO9/iodeto de propídio se caracteriza por corar todas as células, vivas ou mortas, de verde com o SYTO9 e corar de vermelho as células com sua membrana celular danificada (células mortas), com o iodeto de propídio, que é um corante de ácido nucleico fluorescente.

Respectivamente, o comprimento de ondas absorvidos e emitidos foram 494/518 nm para SYTO9 e 536/617 nm para iodeto de propídio. O biofilme foi avaliado com aumento de 100x, em seguida três imagens foram obtidas de áreas aleatórias de cada bloco, utilizando uma espessura de 1 µm entre as secções e um formato de 386x386 pixels. O avaliador não tinha conhecimento do grupo a que pertencia cada bloco. Todas imagens foram analisadas utilizando o programa BioImage_L (<http://bio-image.com>) para biovolume total (μm^3), o total de células vivas (verde), e o percentual de células vivas (CHAVEZ DE PAZ, 2009). Essa análise foi realizada tanto para a espessura total de biofilme visualizada em MCLV quanto para a secção mais superficial desse biofilme. Os dados obtidos no modelo multi-espécie foram analisados utilizando o pacote Bioestat 5.0 (Instituto Mamirauá, Tefé, AM, Brasil). A distribuição normal dos dados foi confirmada pelo teste de Shapiro-Wilk. A comparação para o percentil de células vivas (verde) foi analisado utilizando o teste Anova (one way) e o teste Tukey ($\alpha = 5$).

A hipótese nula desse estudo é que o etanol não altera a atividade antimicrobiana da CHX 2%.

Resultados

A tabela 1 mostra que o percentual de células vivas na espessura total do biofilme foi similar entre os grupos de 5 minutos, com exceção do grupo ETANOL5 que apresentou diferença em relação ao grupo SORO5 ($P < 0.05$). Na análise geral entre os grupos, SORO/CHX10, ETANOL10 e ETANOL/CHX10 apresentaram diferenças estatísticas ($P <$

0,05) em relação ao grupo SORO5. Já os grupos ETANOL10 e ETANOL/CHX10 também demonstraram diferença em relação aos grupos ETANOL/CHX5 e SORO10.

A tabela 2 analisa somente a porção mais superficial do biofilme e os grupos SORO/CHX5, SORO/CHX10, ETANOL5, ETANOL10, ETANOL/CHX5 e ETANOL/CHX10 apresentaram diferença estatística em relação aos grupos SORO5 e SORO10 ($P < 0.05$), porém não apresentaram diferença entre si ($P > 0.05$).

Tabela 1. Média e desvio padrão do biovolume total, biovolume de células vivas e percentual de células vivas da espessura total de biofilme analisada.

			SORO	SORO + CHX	ETANOL	ETANOL + CHX
5 minutos	Média, (desvio padrão)	Biovolume total (μm^3)	309765 (135154)	209340 (40111)	335627 (177559)	185425 (62661)
		Biovolume de células vivas (μm^3)	300386 (132136)	119487 (70695)	147752 (110095)	117736 (81141)
		Células vivas (%)	96,78 (2,765)	57,77 (32,83)	52,51 ^a (27,14)	73,16(30,63)
10 minutos	Média, (desvio padrão)	Biovolume total (μm^3)	263778 (188199)	320903 (198248)	335369 (141403)	205677 (95246)
		Biovolume de células vivas (μm^3)	247002 (187542)	170264 (149738)	73034 (123231)	66104 (66340)
		Células vivas (%)	91,56 (10,32)	53,02 ^c (21,15)	26,98 ^{b,c} (20,12)	30,43 ^{b,c} (19,48)

^a Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Soro 5 minutos.

^b Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Soro 10 minutos e Etanol/CHX 5 minutos

^c Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Soro 5 minutos.

Tabela 2. Media e desvio padrão de biovolume total, biolum de células vivas e percentual de células vivas na superfície do biofilme.

			SORO	SORO + CHX	ETANOL	ETANOL + CHX
5 minutos	Media, (desvio padrão)	Biovolume total	20701 (14207)	10399	8864	10819
		(μm^3)	20016	(7433)	(11505)	(11197)
		Biovolume de células vivas (μm^3)	(13625)	4714	8864	6298
		Células vivas (%)	97,10 (2,509)	(4708)	(11505)	(8934)
			42,68 (31,59)	42,75 (24,89)	50,45 (37,34)	
10 minutos	Media, (desvio padrão)	Biovolume total	10207	16385	23811	9917
		(μm^3)	(12300)	(15288)	(19113)	(13823)
		Biovolume de células vivas (μm^3)	9158	2876	3574	1474
		Células vivas (%)	(11570)	(3307)	(10644)	(2792)
		91,13 (14,57)	24,04 (10,48) ^a	23,70 ^a (18,85)	12,69 ^a (14,65)	

^a Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Soro 5 e 10 minutos minutos.

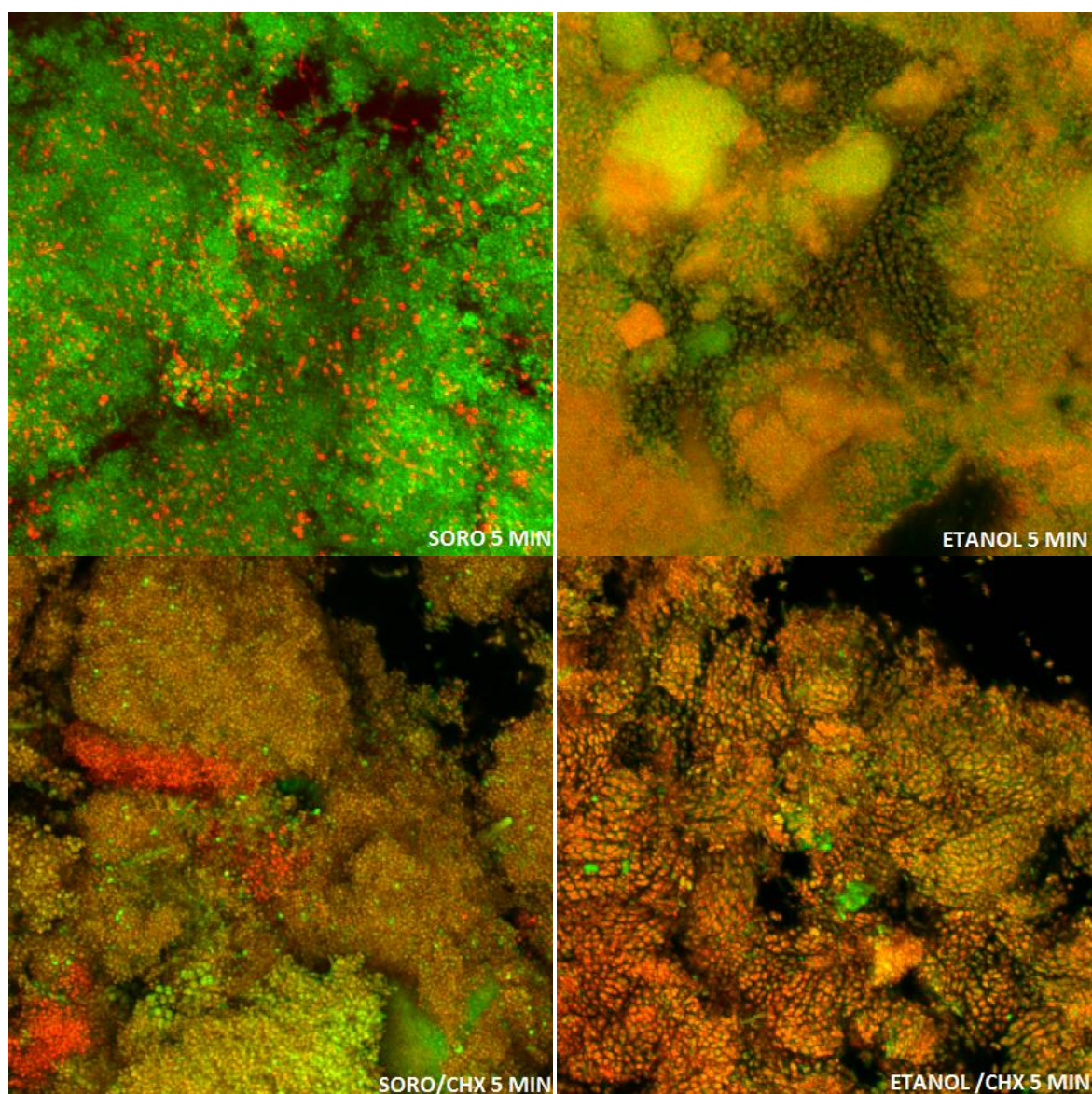


Fig 1. Imagens representativas dos grupos de 5 minutos, onde se observa maior concentração de células vivas (verdes) no grupo SORO5 e maior concentração de células mortas (vermelhas) no grupo ETANOL5.

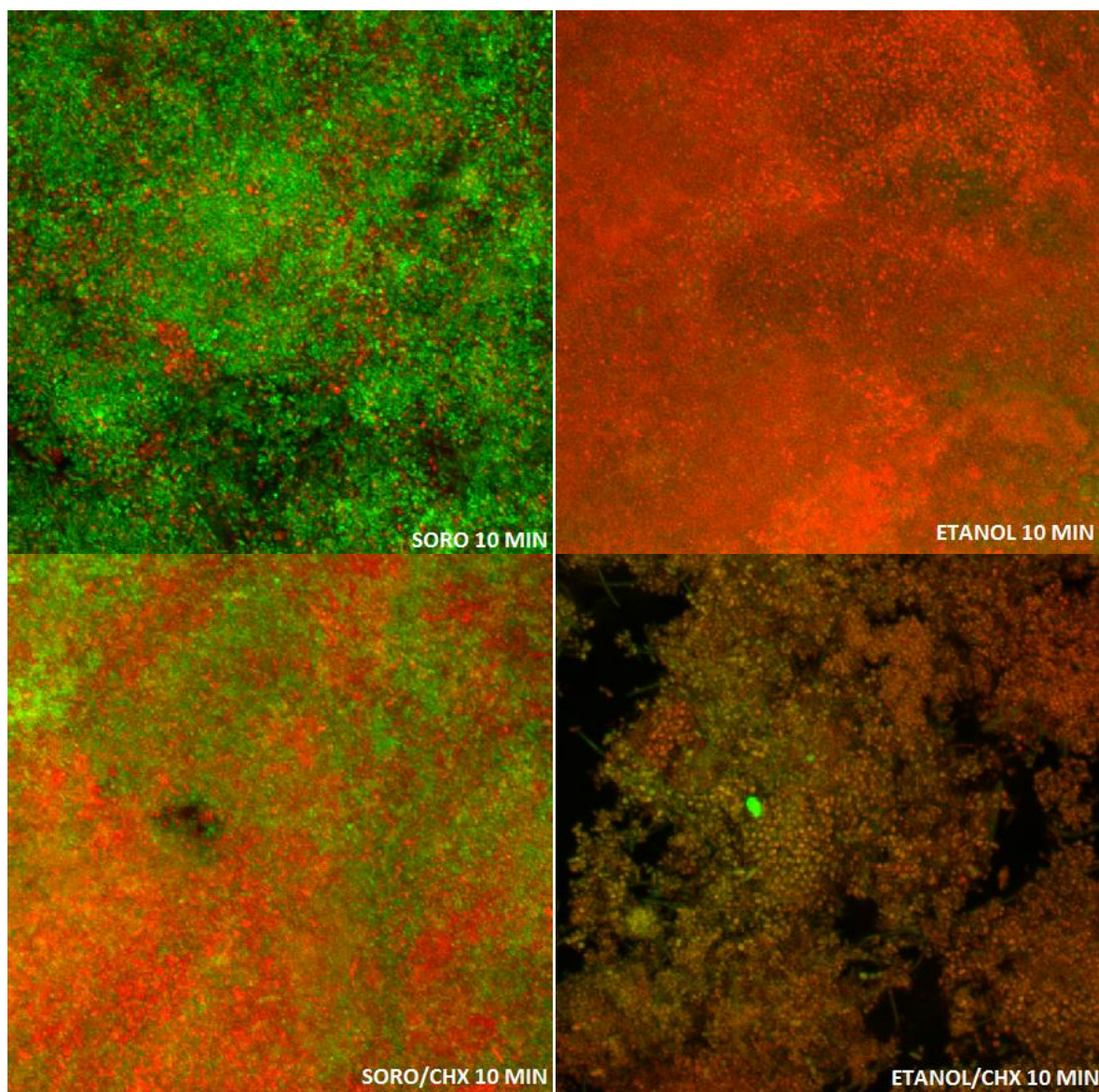


Fig 2. Imagens representativas dos grupos de 10 minutos, onde se observa maior concentração de células vivas (verdes) no grupo SORO10 e maior concentração de células mortas (vermelhas) no grupo ETANOL10.

Discussão

No presente estudo, foi utilizada a formação de biofilme misto por meio de um dispositivo intraoral para análise da ação antimicrobiana de soluções irrigadoras. Esta metodologia parece ser mais indicada para esse tipo de estudo porque representa o que acontece clinicamente em termos de colonização microbiana. A formação de biofilme misto foi induzida por microrganismos, que não somente o *Enterococcus faecalis*, sobrevivem ao tratamento endodôntico e ao meio alcalino gerado pelas medicações intracanaís (CHAVEZ DE PAZ, 2007). Além disso, na forma de biofilme, os microrganismos são mais resistentes aos agentes antimicrobianos em comparação com os microrganismos em estado planctônico (DONLAN, COSTERTON, 2002). Apesar de tais vantagens, cumpre ressaltar que essa metodologia não simula o que ocorre no interior do canal radicular, onde a ação da solução irrigadora é dificultada pela complexidade do sistema de canais radiculares e pela dificuldade de difusão no terço apical (SUSIN et al., 2010).

O uso de MCVL é útil para estudar a estrutura de biofilmes, pois permite a investigação de biofilmes intactos, sem a interferência de um processamento de amostras (HOHSCHIEDT et al., 2013; SHEN et al., 2009; ZAPATA et al., 2008). O protocolo de imersão utilizado não reproduz a ação da irrigação intracanal, entretanto, o objetivo do estudo era avaliar a interferência do etanol sobre a ação antimicrobiana da clorexidina.

A clorexidina em diferentes concentrações, tanto na forma de solução como gel não é capaz de dissolver biofilme. Estudos que utilizaram a análise em MCVL demonstraram que a CHX 2% parece não causar nenhum efeito visível sobre a estrutura do biofilme, especialmente de áreas de difícil acesso aos instrumentos (ORDINOLA-ZAPATA et al., 2012; DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2011). Ordinola-Zapata et al. (2012) afirmaram que, a ação antimicrobiana da CHX é esperada em situações de paredes dentinárias limpas, livres de biofilme. Por isso, deve ser utilizada em associação com NaOCl, sendo fundamental o uso de soluções que removam os resíduos deste irrigante do sistema de canais radiculares para evitar a formação de um precipitado marrom-alaranjado.

Krishnamurthy e Sudhakaran (2010) sugeriram o uso de álcool absoluto como irrigador intermediário entre o NaOCl e a CHX, devido a sua capacidade de remover os cristais de NaOCl e prevenir a formação de precipitado proveniente do contato de NaOCl e CHX.

Os resultados desse estudo estão em concordância com os achados de Chavez de Paz et al. (2010), uma vez que no grupo SORO + CHX5 e SORO +CHX10 o percentual de células vivas foram 57,77% e 53,02% respectivamente. Chavez de Paz et al. (2010) demonstraram que os efeitos antimicrobianos da CHX não foram altos no biovolume total. Foi observado que as células das camadas mais superficiais foram mais afetadas pela CHX que as células das camadas mais profundas do biofilme. Zaura-Arite (2001), demonstrou que com biofilmes mais espessos, o efeito da CHX diminui a medida que se observa as camadas mais profundas, devido a falta de penetração no biofilme intacto.

O presente estudo buscou avaliar a ação do etanol sobre o efeito antimicrobiano da CHX, tanto na profundidade do biofilme passível de ser analisado na microscopia confocal, quanto na camada mais superficial, nos tempos de 5 e 10 minutos de contato com as soluções. Quando avaliou-se somente a camada mais superficial do biofilme, os grupos do Soro 5 e 10min apresentaram maior percentual de células vivas do que os demais grupos experimentais.

Os resultados sugeriram uma melhor ação antimicrobiana para o ETANOL10 minutos e ETANOL +CHX10 min do que SORO10min e ETANOL + CHX5min quando a avaliação em profundidade foi levada em consideração. O Grupo do SORO + CHX10min apenas apresentou menor percentual de células vivas do que o grupo do SORO5minutos. Com esses achados foi possível confirmar a hipótese nula, uma vez que os grupos ETANOL, ETANOL + CHX e SORO + CHX não diferiram entre si, na análise superficial e profunda, nos 2 tempos experimentais, exceção feita ao grupo ETANOL +CHX5min que diferiu dos grupos ETANOL + CHX10min e ETANOL10min.

Os resultados deste estudo vão ao encontro dos de Suman et al. (2015), que avaliaram a ação destas combinações de irrigantes com 5 minutos de exposição. Os grupos analisados foram iguais e os resultados semelhantes quando se analisou a porcentagem de células vivas, na espessura total do biofilme (SORO-93,4%; SORO+CHX-69,6%; ETANOL-64,6%; ETANOL+CHX-76,3%)

Apesar desses resultados, a biocompatibilidade do etanol quando usado como solução irrigadora não está bem estabelecida (KRISHNAMURTHY; SUDHAKARAN, 2010) e seus efeitos sobre o tecido periapical ainda não foram estudados suficientemente para que se possa utilizar o etanol em um protocolo clínico.

Baseados na metodologia e resultados é lícito concluir que embora não se perceba a influência do etanol sobre a ação antibacteriana da clorexidina, é necessário cautela na indicação do etanol como irrigante intermediário.

Reconhecimentos

Os autores negam qualquer conflito de interesses em relação a este estudo.

Referências

BUI, T. B.; BAUMGARTNER, J. C.; MITCHELL, J. C. Evaluation of the interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate and its effect on root dentin. **J. Endod.**, Chicago, v. 34, no. 2, p. 181–185, Feb. 2008.

CHAVEZ DE PAZ, L. E. Image analysis software based on color segmentation for characterization of viability and physiological activity of biofilms. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 75, p. 1734–1739, 2009.

CHAVEZ DE PAZ, L. E., et al. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. **J. Endod.**, Chicago, v. 36, no. 1, p. 70-77, Jan. 2010.

DE LA CASA, M. L. et al. Protein content in irrigating solutions in contact with pulp tissue. **Acta Odontol. Latinoam.**, Buenos Aires, v. 21, no. 1, p. 65-68, 2008.

DE OLIVEIRA, L. D. et al. In vitro effects of endodontic irrigants on endotoxins in root canals. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 104, no. 1, p. 135-142, July 2007.

DEL CARPIO-PEROCHENA, A. E., et al. Biofilm dissolution and cleaning ability of different irrigant solutions on intraorally infected dentin. **J. Endod.**, Chicago, v. 37, p. 1134–1138, 2011

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 15, no. 2, p. 167-193, Apr. 2002.

ESTRELA, C. et al. Mechanism of action of sodium hypochlorite. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v. 13, no. 2, p. 113–117, 2002

HAAPASALO, M. et al. Irrigation in endodontics. **Dent. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 54, no. 2, p. 291-312, Apr. 2010.

HOHSCHIEDT G. L., et al., Response of *E. Faecalis* biofilms to different associations of auxiliary substances during root canal preparation: A confocal laser microscopy analysis. **Microsc. Res. Tech.**, New York, v. 76, p. 658–662, 2013.

- KRISHNAMURTHY, S.; SUDHAKARAN, S. Evaluation and prevention of the precipitate formed on interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine. **J. Endod.**, Chicago, v. 36, no. 7, p. 1154-1157, July 2010.
- LI, W.; LIU, H.; XU, Q. Extracellular dextran and DNA affect the formation of *Enterococcus faecalis* biofilms and their susceptibility to 2% chlorhexidine. **J. Endod.**, Chicago, v. 38, no. 7, p. 894-898, July 2012.
- MORTENSON, D. et al. The effect of using an alternative irrigant between sodium hypochlorite and chlorhexidine to prevent the formation of para-chloroaniline within the root canal system. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 45, no. 9, p. 878-882, Sept 2012
- ORDINOLA-ZAPATA R., et al. Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 45, p. 162–168, 2012.
- ORDINOLA-ZAPATA R., et al., Antimicrobial activity of triantibiotic paste, 2% chlorhexidine gel, and calcium hydroxide on an intraoral-infected dentin biofilm model. **J. Endod.**, Chicago, v. 39, p.115–118, 2013.
- PASHLEY, E.L. et al. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. **J. Endod.**, Chicago, v. 11, no. 12, p. 525–528, Dec. 1985.
- SHEN, Y., et al. Evaluation of the effect of two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria in vitro: A three-dimensional quantitative analysis. **J. Endod.**, Chicago, v.35, p.981– 985, 2009.
- SUMAN J., et al. Antibacterial activity of chlorhexidine after final irrigation with ethanol: CLSM and culture-based method analysis. **Microsc. Res. Tech.**, New York, early view, 2015.
- SUSIN, L. et al. Canal and isthmus debridement efficacies of two irrigant agitation techniques in a closed system. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 43, no. 12, p. 1077-1090, 2010.
- TAY, F. et al. Ultrastructure of smear layer-covered intraradicular dentin after irrigation with BioPure MTAD. **J. Endod.**, Chicago, v. 32, no. 10, p. 970–975, Oct. 2006.
- ZAPATA, R. O., et al., Confocal laser scanning microscopy is appropriate to detect viability of enterococcus faecalis in infected dentin. **J. Endod.**, Chicago, v.34, p.1198–1201, 2008.
- ZAURA-ARITE, E.; VAN MARLE, J.; TEN CATE, J. M. Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. **J. Dent. Res.**, v. 80, no. 5, p. 1436-1440, May 2001.
- ZEHNDER, M. Root canal irrigants. **J. Endod.**, Chicago, v. 32, p. 389–398, 2006.
- ZHANG, K. et al. The effect of initial irrigation with two different sodium hypochlorite concentrations on the erosion of instrumented radicular dentin. **Dent. Mater.**, Copenhagen, v. 26, no. 6, p. 514-523, June 2010.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No ano de 2010, Krishnamurthy e Sudhakaran avaliaram a capacidade de algumas soluções em remover o NaOCl das paredes do canal radicular previamente ao uso da CHX. Tanto a solução salina quanto a água destilada foram capazes de reduzir a formação do precipitado quando comparada com o grupo teste, onde não foi realizada nenhuma irrigação entre o NaOCl e a CHX. Porém, apenas o álcool absoluto foi capaz de impedir completamente a deposição do precipitado nas paredes dos canais. Em função disso, este estudo teve por objetivo avaliar o possível efeito do etanol na ação antimicrobiana da clorexidina.

Basrani et al. (2008) recomendaram a utilização de água destilada ou etanol como solução irrigadora intermediária. O bom desempenho do etanol na remoção de NaOCl nos canais radiculares deve-se à sua volatilidade, ao seu caráter tensoativo, por ser altamente eletronegativo e por poder penetrar de maneira profunda nos túbulos dentinários e ramificações dos canais radiculares.

Mortenson et al. (2010) analisaram a capacidade do EDTA, ácido cítrico e solução salina em remover NaOCl previamente à irrigação com CHX. O ácido cítrico foi a solução que proporcionou menor formação de precipitado no sistema de canais radiculares. Entretanto, Mortenson et al. (2010) realizaram procedimentos irrigadores em dentes monorradiculares, ao passo que, na presente pesquisa, o contato com as soluções irrigadoras deu-se através de blocos de dentina extraída.

A composição química do precipitado formado a partir da reação entre NaOCl e CHX ainda não está completamente estabelecida. Alguns trabalhos confirmaram a presença de PCA (BASRANI et al., 2007; KRISHNAMURTHY, SUDHAKARA, 2010), outros não (THOMAS, SEM, 2010; NOWICKI, SEM, 2011). Esse subproduto apresentou ser citotóxico em ratos (CHHABRA et al., 1991) e possivelmente carcinogênico em humanos (LUIZ et al., 2008).

Independente da presença da PCA, parece razoável a busca pela minimização ou até mesmo pela prevenção da formação deste precipitado porque é um subproduto insolúvel e de difícil remoção das paredes do canal radicular. A obliteração dos túbulos dentinários pode dificultar a penetração das medicações intracanal e comprometer o selamento da obturação (BUI; BAUMGARTNER; MITCHELL, 2008).

Algumas substâncias ao interagirem com outras são capazes de interferir nos seus mecanismos de ação. Tendo em vista que o etanol apresentou a capacidade de reduzir a formação do precipitado decorrente da interação entre o NaOCl e a CHX 2%, foi prudente estudar o efeito do etanol sobre a capacidade antimicrobiana da CHX 2% em um tempo de 5 e 10 minutos.

Os resultados sugeriram uma melhor ação antimicrobiana para o ETANOL 10 minutos e ETANOL +CHX 10 min do que SORO 10min e ETANOL + CHX 5min quando a avaliação em profundidade foi levada em consideração. O Grupo do SORO + CHX 10min apenas apresentou menor percentil de células vivas do que o grupo do SORO 5minutos. Com esses achados foi possível confirmar a hipótese nula, uma vez que os grupos ETANOL, ETANOL + CHX e SORO + CHX não diferiram entre si, na análise superficial e profunda e nos 2 tempos experimentais, exceção feita ao grupo ETANOL +CHX 5min que diferiu dos grupos ETANOL + CHX10min e ETANOL 10min.

Apesar desses resultados, a biocompatibilidade do etanol quando usado como solução irrigadora não está estabelecida (KRISHNAMURTHY; SUDHAKARAN, 2010) e seus efeitos sobre o tecido periapical ainda não foram estudados suficientemente para que se possa utilizá-lo em um protocolo clínico.

Referências

- ALVES, F. R. et al. Disinfecting oval-shaped root canals: Effectiveness of different supplementary approaches. **J. Endod.**, Chicago, v. 37, p. 496–501, 2011.
- BACA, P., et al. Residual effectiveness of final irrigation regimens on enterococcus faecalis-infected root canals. **J. Endod.**, Chicago, v. 37, p. 1121–1123, 2011.
- BARBIN, L. E. et al. Determination of para-chloroaniline and reactive oxygen species in chlorhexidine and chlorhexidine associated with calcium hydroxide. **J. Endod.**, Chicago, v. 34, no. 12, p. 1508-1514, Dec. 2008.
- BASRANI, B. R. et al. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. **J. Endod.**, Chicago, v. 33, no. 8, p. 966–969, Aug. 2007.
- BASRANI, B. R. et al. Determination of 4-chloroaniline and its derivatives formed in the interaction of sodium hypochlorite and chlorhexidine by gas chromatography. **J. Endod.**, Chicago, v. 36, no 2, p. 312–314, Feb. 2010.
- BUI, T. B.; BAUMGARTNER, J. C.; MITCHELL, J. C. Evaluation of the interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate and its effect on root dentin. **J. Endod.**, Chicago, v. 34, no. 2, p. 181–185, Feb. 2008.
- CHHABRA, R. S. et al. Carcinogenicity of p-chloroaniline in rats and mice. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v. 29, no. 2, p. 119-124, Feb. 1991.
- DE LA CASA, M. L. et al. Protein content in irrigating solutions in contact with pulp tissue. **Acta Odontol. Latinoam.**, Buenos Aires, v. 21, no. 1, p. 65-68, 2008.
- DE OLIVEIRA, L. D. et al. In vitro effects of endodontic irrigants on endotoxins in root canals. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 104, no. 1, p. 135-142, July 2007.
- DEL CARPIO-PEROCHENA, A. E., et al. Biofilm dissolution and cleaning ability of different irrigant solutions on intraorally infected dentin. **J. Endod.**, Chicago, v. 37 p. 1134–1138, 2011.
- ESTRELA, C. et al. Mechanism of action of sodium hypochlorite. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v. 13, no. 2, p. 113–117, 2002.
- HAAPASALO, M. et al. Irrigation in endodontics. **Dent. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 54, no. 2, p. 291-312, Apr. 2010.

- KRISHNAMURTHY, S.; SUDHAKARAN, S. Evaluation and prevention of the precipitate formed on interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine. **J. Endod.**, Chicago, v. 36, no. 7, p. 1154-1157, July 2010.
- LI, W.; LIU, H.; XU, Q. Extracellular dextran and DNA affect the formation of *Enterococcus faecalis* biofilms and their susceptibility to 2% chlorhexidine. **J. Endod.**, Chicago, v. 38, no. 7, p. 894-898, July 2012.
- LUIZ et al., Determination of para-chloroaniline and reactive oxygen species in chlorhexidine and chlorexidine associated with calcium hydroxide. **J. Endod.**, Chicago, v. 34, p. 1508-1514, 2008.
- MARCHESAN, M. A. et al. Chemical analysis of the flocculate formed by the association of sodium hypochlorite and chlorhexidine. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Endod.**, St. Louis, v. 103, no. 5, p. 103–105, May 2007.
- MORTENSON, D. et al. The effect of using an alternative irrigant between sodium hypochlorite and chlorhexidine to prevent the formation of para-chloroaniline within the root canal system. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 45, no. 9, p. 878-882, Sept. 2012.
- NOWICKI, J. B.; SEM, D.S. An in vitro spectroscopic analysis to determine the chemical composition of the precipitate formed by mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine. **J. Endod.**, Chicago, v. 37, no. 7, p. 983-988, July 2011.
- ORDINOLA-ZAPATA, R., et al. Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. **Int Endod J.**, Oxford, v. 45, p. 162–168, 2012.
- PAIVA, S. S. et al. Supplementing the antimicrobial effects of chemomechanical debridement with either passive ultrasonic irrigation or a final rinse with chlorhexidine: a clinical study. **J. Endod.**, Chicago, v. 38, p. 1202–1206, 2012.
- PAQUE, F.; GANAHL, D.; PETERS, O. A. Effects of root canal preparation on apical geometry assessed by micro-computed tomography. **J. Endod.**, Chicago, v. 35, no. 7, p. 1056–1059, July 2009.
- PAQUE, F. et al. Preparation of oval-shaped root canals in mandibular molars using nickel-titanium rotary instruments: a micro-computed tomography study. **J. Endod.**, Chicago, v. 36, no. 4, p. 703–707, Apr. 2010.
- PASHLEY, E. L. et al. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. **J. Endod.**, v. 11, no. 12, p. 525–528, Dec. 1985.
- PETERS, O. A. Current challenges and concepts in the preparation of root canal systems: a review. **J. Endod.**, Chicago, v. 30, no. 8, p. 559–567, Aug. 2004.

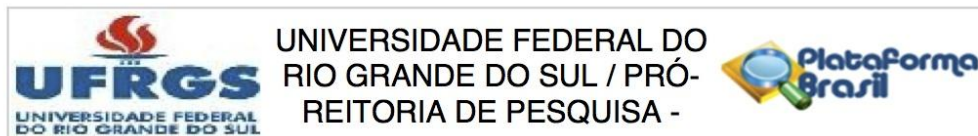
TAY, F. et al. Ultrastructure of smear layer-covered intraradicular dentin after irrigation with BioPure MTAD. **J. Endod.**, Chicago, v. 32, no. 10, p. 970–975, Oct. 2006.

THOMAS, J. E.; SEM, D. S. An in vitro spectroscopic analysis to determine whether parachloroaniline is produced from mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine. **J. Endod.**, Chicago, v. 36, no. 2, p. 315–317, Feb. 2010.

ZEHNDER, M. Root canal irrigants. **J. Endod.**, Chicago, v.32, p.389–398, 2006.

ZHANG, K. et al. The effect of initial irrigation with two different sodium hypochlorite concentrations on the erosion of instrumented radicular dentin. **Dent. Mater.**, Copenhagen, v. 26, no. 6, p. 514-523, June 2010.

ANEXO – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP/UFRGS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: O EFEITO DO ETANOL NA AÇÃO ANTIMICROBIANA DA CLOREXIDINA SOBRE BIOFILME ORAL

Pesquisador: Marcus Vinicius Reis Só

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 31022214.6.0000.5347

Instituição Proponente: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 708.353

Data da Relatoria: 12/06/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto do PPG da Faculdade de Odontologia a respeito do uso de soluções antimicrobianas para utilização durante tratamentos endodônticos.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL: Avaliar o efeito da utilização do etanol 95% na atividade antimicrobiana da clorexidina 2% sobre biofilme intraoral em diferentes tempos.

OBJETIVO ESPECÍFICO: Verificar se o etanol 95% prejudica a ação antimicrobiana da clorexidina 2% sobre biofilme intraoral, em 5 e 10 minutos de contato com a solução, por meio da análise em microscópio confocal de varredura à laser.

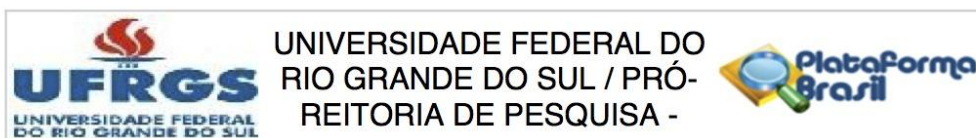
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e benefícios foram considerados apropriadamente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A formação de biofilme oral será induzida sobre 80 blocos de dentina bovina, fixos em um dispositivo intraoral. Os blocos serão distribuídos aleatoriamente em 2 grupos (5 e 10 minutos) e 4 subgrupos, de acordo com a solução: soro fisiológico (SORO5 e SORO10), soro fisiológico seguido de clorexidina (SCHX5 e SCHX10), etanol (E5 e E10), etanol seguido de clorexidina (ECHX5

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



Continuação do Parecer: 708.353

e ECHX10). A superfície dos blocos será corada com Live/Dead® BacLight para análise em MCVL. Imagens de três áreas de cada bloco serão obtidas e analisadas pelo programa BioImage_L. Os parâmetros avaliados serão biovolume (m³) da população total e de células vivas (verde) e o percentual (%) de células vivas.

Para formação do biofilme oral, in situ, 12 blocos de dentina serão fixos em dispositivos intrabucais removíveis. Serão feitas moldagens do arco superior de sete voluntários recrutados por meio de cartazes e, posteriormente modelos de gesso, a partir dos quais serão confeccionados os dispositivos mencionados acima.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto, parecer da COMPESQ, cálculo de tamanho amostral e orçamento foram devidamente apresentados.

Recomendações:

Tendo sido atendidas as pendências, o parecer é pela aprovação do projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Foi feito o esclarecimento com relação à obtenção do número de blocos desejado. Sete voluntários serão recrutados por meio de cartazes, os quais foram apresentados na versão revisada do projeto. Cada voluntário utilizará um dispositivo intraoral com 12 blocos de dentina provenientes de dentes bovinos, alcançando-se o número amostral desejado de 80 blocos.

O número do telefone do CEP informado no TCLE foi corrigido.

Situação do Parecer:

Aprovado

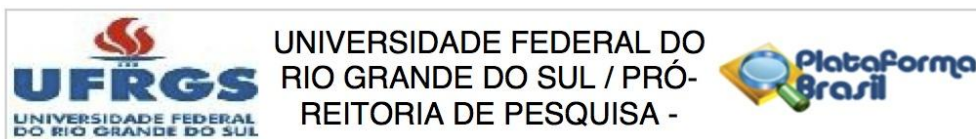
Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado.

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



Continuação do Parecer: 708.353

PORTO ALEGRE, 03 de Julho de 2014

Assinado por:
José Artur Bogo Chies
(Coordenador)

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