

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**  
**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE ODONTOLOGIA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DE DIFERENTES SOLUÇÕES  
IRRIGADORAS SOBRE O BIOFILME BACTERIANO: ANÁLISE POR MEIO DA  
MICROSCOPIA CONFOCAL**

**NICOLE FLACH**

Porto Alegre

2010

**NICOLE FLACH**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DE DIFERENTES SOLUÇÕES  
IRRIGADORAS SOBRE O BIOFILME BACTERIANO: ANÁLISE POR MEIO  
DA MICROSCOPIA CONFOCAL**

Trabalho de Conclusão apresentado à Comissão de Graduação do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito para obtenção do Grau de Cirurgiã-Dentista.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fabiana Soares Grecca

Porto Alegre

2010

## SUMÁRIO

<b>ARTIGO: Avaliação <i>In Vitro</i> do Efeito de Diferentes Soluções Irrigadoras Sobre o Biofilme Bacteriano: Análise Por Meio da Microscopia Confocal.....</b>	<b>03</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>03</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>04</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>05</b>
<b>Materiais e Métodos.....</b>	<b>06</b>
Considerações Éticas.....	07
Amostra e Preparação dos Dentes.....	07
Secção das Raízes e Aparato Experimental.....	07
Desenvolvimento do Biofilme Intrarradicular.....	08
Divisão dos Grupos.....	09
Determinação da Viabilidade Bacteriana.....	10
<b>Resultados.....</b>	<b>11</b>
<b>Discussão.....</b>	<b>14</b>
<b>Conclusões.....</b>	<b>17</b>
<b>Agradecimentos.....</b>	<b>17</b>
<b>Referências.....</b>	<b>18</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>22</b>
ANEXO A - Tabela dos resultados na íntegra.....	22

## ARTIGO

### **Avaliação *In Vitro* do Efeito de Diferentes Soluções Irrigadoras Sobre o Biofilme Bacteriano: Análise Por Meio da Microscopia Confocal**

*Nicole Flach*<sup>1</sup>, *Luciana Bitello Firmino*<sup>2</sup>, *Daiana Elisabeth Böttcher*<sup>3</sup>, *Marcelo Lazzaron Lamers*<sup>4</sup>, *Clarissa Fatturi Parolo*<sup>5</sup>, *Marisa Maltz*<sup>6</sup> e *Fabiana Soares Grecca*<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Aluna do curso de Graduação em Odontologia da FO-UFRGS\*, Porto Alegre, Brasil e bolsista do Programa de Educação Tutorial, FO-UFRGS\*, Porto Alegre, Brasil;

<sup>2</sup>Mestranda do Departamento de Odontologia Preventiva e Social, FO-UFRGS\*, Porto Alegre, Brasil;

<sup>3</sup>Mestranda do Departamento de Odontologia Conservadora, FO-UFRGS\*, Porto Alegre, Brasil;

<sup>4</sup>Professor Adjunto do Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS-UFRGS\*\*, Porto Alegre, Brasil;

<sup>5</sup>Professora Adjunta do Departamento de Odontologia Preventiva e Social, FO-UFRGS\*, Porto Alegre, Brasil;

<sup>6</sup>Professora Titular do Departamento de Odontologia Preventiva e Social, FO-UFRGS\*, Porto Alegre, Brasil;

<sup>7</sup>Professora Adjunta do Departamento de Odontologia Conservadora, FO-UFRGS\*, Porto Alegre, Brasil.

\*Faculdade de Odontologia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

\*\* Instituto de Ciências Básicas da Saúde - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

### **Resumo**

O objetivo do presente trabalho foi avaliar, *in vitro*, a efetividade de duas soluções irrigadoras endodônticas e de sua associação na desinfecção de canais radiculares bovinos infectados com *Enterococcus faecalis* através da Microscopia de Varredura a Laser Confocal (MVLC). Foram selecionados 21 incisivos bovinos; em 18 desses foi inoculada uma monocultura de *Enterococcus faecalis* por 21 dias. Após esse período, os dentes foram randomicamente divididos em três grupos testes (n=5) de acordo com a

substância química irrigadora utilizada para o preparo químico-mecânico dos canais radiculares: grupo 1 (G1) – hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5%, grupo 2 (G2) - clorexidina (CX) 2% gel, grupo 3 (G3) - NaOCl 2,5% + CX 2% gel; e em dois grupos controles (GC) (n=3): grupo controle negativo (GCN) - sem preparo e esterilizados e grupo controle positivo (GCP) - sem preparo e contaminado. Finalizada essa etapa, as amostras foram coradas com SYTO9 e iodeto de propídeo e submetidas à análise por meio da MVLC. Para a tabulação dos resultados, foram padronizados escores segundo a viabilidade bacteriana: 0 =  $\leq 25\%$  de bactérias viáveis, 1 =  $>25\%$  e  $< 50\%$ , 2 =  $50\%$ , 3 =  $> 50\%$  e  $< 75\%$  e 4 =  $\geq 75\%$ . A avaliação foi realizada por um único examinador calibrado e cego. A análise estatística foi realizada por meio dos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney com nível de significância de 5%. O GCP apresentou escores 2 e 3; o GCN exibiu escore 0 em todas as amostras -  $p < 0,05$  (todas as bactérias estavam inviáveis); o G1 apesar de ter demonstrado eficiência em remover a grande totalidade do biofilme, foi classificado com escore 4 pois as bactérias restantes estavam viáveis -  $p < 0,05$ ; o G2 apresentou a maior parte dos escores equivalente a 3, mas apresentou inferior potencial de limpeza dos canais radiculares comparado ao G1; e o G3 foi classificado principalmente com escores entre 2 e 3, apresentando o melhor resultado, já que exibiu mínima quantidade bacteriana, semelhante ao G1, e um número de microrganismos inviáveis superior ao mesmo grupo ( $p = 0,01$ ), devido à ação adicional da CX. A irrigação final com o uso da clorexidina, portanto, demonstrou maior atividade antibacteriana.

**Palavras-chave:** *Enterococcus faecalis*, endodontia, microscopia confocal, viabilidade bacteriana

## **Abstract**

The purpose of this study was to evaluate *in vitro* the effectiveness of two endodontic irrigants and their association on disinfection of root canals of infected bovine teeth with *Enterococcus faecalis* by Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM). Twenty-one bovine incisors were selected; in 18 teeth were inoculated a monoculture of *Enterococcus faecalis* for 21 days. After this period, the teeth were randomly divided into three test groups (n = 5) according to the chemical solution used for irrigation during the chemo-mechanical preparation: group 1 (G1) - 2.5% sodium hypochlorite

(NaOCl), group 2 (G2) - 2% chlorhexidine (CHX) gel, group 3 (G3) - 2.5% NaOCl + 2% CHX gel; and two control groups (GC) (n = 3): negative control group (GCN) - sterile and without prepare of root canals and positive control group (GCP) - root canal infected. Afterwards, the samples were stained with SYTO9 and propidium iodide and subjected to analysis by CLSM. Scores were standardized according to the bacterial viability to tabulate the results: 0 =  $\leq 25\%$  of viable bacteria, 1 =  $> 25\%$  and  $< 50\%$ , 2 = 50%, 3 =  $> 50\%$  and  $< 75\%$  and 4 =  $\geq 75\%$ . The evaluation was performed by one blinded and calibrated examiner. Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney test with a significance level of 5%. The GCP showed scores 2 and 3; GCN exhibited score 0 in all samples -  $p < 0.05$  (all bacteria were not viable); although G1 has shown great efficiency in removing the entire biofilm, was ranked with score 4 because the bacteria were viable -  $p < 0.05$ ; G2 showed the majority of scores equal to 3, but had less potential for cleaning the root canals compared to G1; G3 was rated with scores between 2 and 3 mostly presenting the best result; this last group had a minimal bacterial quantity similar to G1 and a shorter number of viable microorganisms to the same group ( $p = 0.01$ ) due to the additional action of CHX. Therefore the final irrigation with the use of chlorhexidine showed greater antibacterial activity.

**Key words:** *Enterococcus faecalis*, endodontics, confocal microscopy, bacterial viability

## Introdução

A infecção bacteriana possui papel primário na etiologia de desenvolvimento de necrose pulpar, patogênese periapical e doença pós-tratamento endodôntico (KAKEHASHI et al, 1965). *Enterococcus faecalis* é a bactéria mais comum e, ocasionalmente, a única isolada de canais radiculares de dentes com persistente lesão periapical (RÒÇAS, SIQUEIRA e SANTOS, 2004). Sua resistência antimicrobiana inerente, sua habilidade para se adaptar a mudanças ambientais e seu crescimento nas paredes do canal radicular como biofilme (NAIR, 1987) tornam esse microrganismo responsável por muitos insucessos endodônticos (LIN, SKRIBNER e GAENGLER, 1992).

A partir disso, um dos fatores cruciais para o sucesso do tratamento endodôntico consiste na erradicação de microrganismos e de seus produtos do sistema

de canal radicular (GOMES et al, 2004). Entre as substâncias químicas auxiliares usadas em endodontia para preparação químico-mecânica, o hipoclorito de sódio (NaOCl) em diferentes concentrações, tem sido o mais comumente usado.

Esse irrigante endodôntico tem a habilidade de destruir um amplo espectro de microrganismos e de dissolver materiais orgânicos; todavia, é sabido que soluções de hipoclorito de sódio têm efeitos citotóxicos e que alteram os componentes orgânicos da dentina, especialmente o colágeno (RING, et al, 2008). Tem sido mostrado ainda que a instrumentação e a irrigação antibacteriana com NaOCl pode render em torno de 50 a 75% de desinfecção do canal radicular no final da primeira sessão de tratamento (PETERS, 2002).

Outra substância que tem sido utilizada como irrigante em endodontia é o gluconato de clorexidina (CX). A CX apresenta amplo espectro antimicrobiano, substantividade e baixa toxicidade (VIANNA et al, 2004; FERRAZ et al, 2001). Sua desvantagem é não agir como um solvente tecidual (DAMETTO et al, 2005) e, por isso, não fica claro se essa substância é efetiva durante o preparo químico-mecânico em função de tal inabilidade (OKINO et al, 2004).

Técnicas microscópicas têm sido utilizadas na avaliação do efeito de diferentes substâncias irrigadoras no biofilme endodôntico (SHEN et al, 2009). A Microscopia de Varredura a Laser Confocal, em particular, pode constituir reconstruções tridimensionais (3D) com acurácia (SHEN et al, 2009) e se torna importante na medida em que é um método adequado para identificação de bactérias vivas e mortas dentro dos túbulos dentinários *in situ* (ZAPATA et al, 2008). Segundo SHEN et al (2009) as mensurações quantitativas 3D da viabilidade do biofilme através desse método provêm um poderoso instrumento para análises das dinâmicas de inativação por agentes antimicrobianos.

Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar, *in vitro*, a efetividade de dois irrigantes endodônticos e de sua associação na desinfecção de canais radiculares bovinos, infectados com *Enterococcus faecalis*, através da Microscopia de Varredura a Laser Confocal.

## **Materiais e Métodos**

## **Considerações Éticas**

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Pesquisa da Faculdade de Odontologia e pelo Comitê de Ética em Pesquisa, ambos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## **Amostra e Preparação dos Dentes**

Foram selecionados para o estudo 21 incisivos bovinos extraídos de carcaças descartáveis provenientes de frigoríficos da cidade de Porto Alegre. Após a extração, os dentes foram estocados em uma solução de timol 0,2% e imersos em NaOCl 5% por 30 minutos para remover tecidos orgânicos.

Os dentes tiveram a superfície externa das raízes raspadas com lâmina de bisturi número 12 (Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda., Juiz de Fora, Brazil), em seguida, limpas com pedra pomes e água e, posteriormente, foram armazenados em água destilada a 4°C até a próxima etapa.

As coroas foram removidas por meio de um corte horizontal com um disco de carborundum (Vipi, Pirassununga, SP, Brasil) e o comprimento das raízes foi padronizado em 14 mm (desde o ápice radicular até o bordo cervical) (**Figura 1 a**).

A exploração dos canais radiculares foi realizada com lima de aço inoxidável Flexofile (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Switzerland) número 20, sempre com os canais inundados com hipoclorito de sódio a 2,5%. O comprimento de trabalho foi estabelecido subtraindo-se 1 mm quando a ponta da lima se encontrava justaposta à saída foraminal.

## **Secção das Raízes e Aparato Experimental**

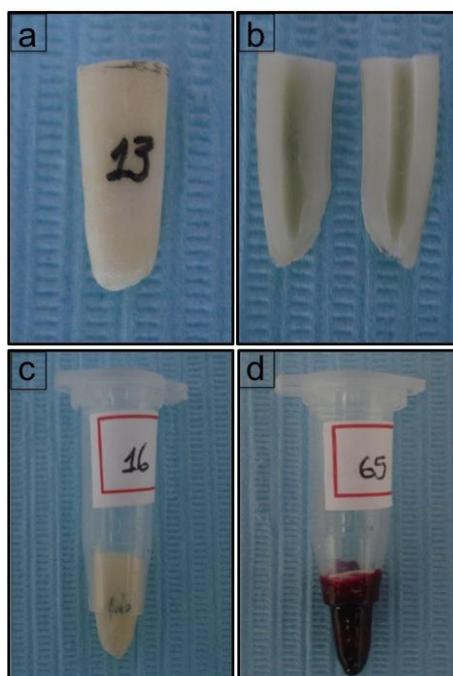
A secção das raízes foi realizada a partir da demarcação da superfície externa com duas linhas retas traçadas com tinta nankin nas regiões vestibular e palatina. Após isso, foi realizado um corte longitudinal exatamente nos locais das demarcações, obtendo-se, portanto, dois segmentos, um com a porção mesial e outro com a porção distal da raiz. Os cortes foram realizados em máquina cortadeira Isomet – Low Speed Saw (Buehler – Lake Bluff, Illinois, USA) utilizando disco de diamante (Extec, Enfield, CT, USA) com 0,3 mm de espessura e 120 mm de diâmetro, numa velocidade de 250 rpm (**Figura 1 b**).

Os segmentos resultantes foram reposicionados em um aparato composto por tubos de eppendorf 1,5 mL (Cral, São Paulo, SP, Brasil), sendo que as duas partes de

cada dente foram adaptadas à extremidade cortada dos tubos na mesma e exata posição anterior à divisão dentária (**Figura 1 c**). A seguir, foi feita a inoculação com o indicador biológico.

A superfície externa dos tubos próxima ao dente e a porção radicular exposta, exceto os 3 mm apicais, foram cobertas com duas camadas de esmalte para unhas (Impala, Laboratório Avamiller de Cosméticos Ltda., Guarulhos, SP).

Os canais radiculares foram irrigados com NaOCl 2,5% e secos com cone de papel estéril (Tanari, Tanariman Ind. Ltda., Manacaru, AM, Brasil). Após isso, os ápices também foram selados com duas camadas de esmalte para unhas (**Figura 1 d**). Finalizada essa etapa, os aparatos montados com os dentes unidos aos tubos de eppendorf foram esterilizados em plasma de peróxido de hidrogênio.



**Figura 1.** Dente padronizado em 14 mm (a); dente separado em mesial e distal (b); dente encaixado no tubo de eppendorf unindo as duas partes - mesial e distal (c); aparato impermeabilizado (d).

### **Desenvolvimento do Biofilme Intrarradicular**

Uma cepa referência de *Enterococcus faecalis* - ATCC 8750 foi usada para a formação do biofilme intracanal. A cepa bacteriana foi cultivada em meio Brain Heart Infusion Agar (BHI, Himedia) suplementado com sangue de carneiro 5% (v/v) e incubado a 37°C por 24 horas. Após crescimento bacteriano, essa cultura de *Enterococcus faecalis* foi mantida sob refrigeração durante o período experimental. A

partir desse estoque, novas culturas foram preparadas em caldo Tryptic Soy Broth (TSB, Merck KGa A, Germany) e mantidas em estufa a 37°C por 24h conforme andamento do período experimental. A concentração final do inóculo de *Enterococcus faecalis* foi padronizada tendo-se como referência a absorbância de 0,036 e comprimento de onda de 550 nm em espectrofotômetro (Biomate 3, USA), ajustadas ao padrão de turbidez nº 1 de MacFarland. Frascos de vidro de 10 mL (Wheaton do Brasil S.A., São Bernardo do Campo, SP) serviram de apoio para os aparatos e cada dente foi infectado com 1 mL da cultura de *Enterococcus faecalis* que era renovada semanalmente até se completarem os 21 dias de formação do biofilme intrarradicular. Todo o processo de inserção e troca semanal do inóculo foi realizado em capela microbiológica sob condições assépticas para se evitar a contaminação das amostras.

### **Divisão dos Grupos**

Após a infecção intracanal com *Enterococcus faecalis* de 18 dentes por 21 dias, os dentes foram randomicamente divididos em três grupos testes (n=5) de acordo com a substância química auxiliar usada: grupo 1 (G1) - NaOCl 2,5%, grupo 2 (G2) - CX 2% gel, grupo 3 (G3) - NaOCl 2,5% + CX 2% gel; e em dois grupos controles (n=3): grupo controle negativo (GCN) - sem preparo e estéril e grupo controle positivo (GCP) - sem preparo e contaminado.

O eppendorf de cada aparato foi cortado na sua porção superior, próximo ao dente, para permitir o preparo dos canais.

Todos os canais foram preparados por um único pesquisador através da técnica clássica com limas de aço inoxidável Flexofile (Dentsply, Maillefer, Ballaigues, Switzerland). O instrumento inicial utilizado foi o de número 30 e o final foi o de número 80. Nos grupos 1 e 3 foi utilizada solução de hipoclorito de sódio a 2,5% para irrigação. A cada troca de instrumento, o canal era irrigado com 2 mL da solução. Para tal, foi utilizada uma seringa plástica descartável de 20 ml (BD Indústria Cirúrgica Ltda.) acoplada a uma agulha Navi Tip ( ref. IJP 349 – Ultradent Products Inc, USA).

Porém, no G3, após a conclusão do preparo do canal, foi feita a neutralização do NaOCl com 2 mL de soro fisiológico. E, em seguida, aplicação de gel de clorexidina a 2% como agente químico final do preparo. O gel de clorexidina foi aplicado com o auxílio de seringa e agulha 27G, colocando-se o gel até que o canal estivesse completamente preenchido. Enquanto o gel permaneceu no canal, foram realizados movimentos de limagem com o instrumento final durante um minuto. Finalmente, o gel

foi removido com o auxílio de 2 mL de soro fisiológico. No G2, utilizou-se o gel de clorexidina durante todo o preparo. O canal era preenchido com o gel, como descrito anteriormente. A cada troca de instrumento, o gel era removido com 2 mL de soro fisiológico e uma nova quantidade de clorexidina era repostada no canal radicular.

### **Determinação da Viabilidade Bacteriana**

Para realização do transporte ao Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CME/UFRGS) as amostras tiveram o caldo TSB contaminado substituído por 300 µL de meio de transporte reduzido (RTF) no interior do eppendorf para conservar as bactérias viáveis até o momento final da análise microscópica.

Após a instrumentação dos canais, as amostras foram removidas do aparato e separadas nas duas metades da raiz (mesial e distal), e imersas novamente em RTF até o momento da análise. Uma das faces do dente, aleatoriamente selecionada, foi colocada em um aparato com base de lamínula de vidro com 20 mm de diâmetro e espessura de 0,17 mm e levado ao microscópio utilizado Olympus FV 1000<sup>®</sup> (**Figura 2**), com objetivas de análise UPL SAPO 60 x OIL, para o aumento de 60x, e VPL FLN 40x OIL, para o aumento de 40x, da marca Olympus-Europa. O software para aquisição das imagens foi o Olympus Fluoview Versão 1.7.

Para a determinação da viabilidade bacteriana, foi utilizado o kit “Life/ Death” (BacLight<sup>™</sup> kit L- 13152; Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA), o qual foi desenvolvido para diferenciar bactérias vivas e mortas, baseadas na permeabilidade da membrana plasmática. Esse kit é composto por dois marcadores de ácidos nucleicos: SYTO9 e o iodeto de propídeo. O SYTO9 (excitado a 488 nm e emitido a 525 nm) penetra tanto nas bactérias viáveis quanto nas não-viáveis, enquanto o iodeto de propídeo (excitado a 488 nm e emitido a 560nm) penetra somente em bactérias com membrana plasmática danificada. Dessa forma, a bactéria que incubada na presença dos dois marcadores, simultaneamente, fluoresce na cor verde, se viável, e na vermelha, se inviável (VITKOV et al, 2005). A quantidade de cada corante utilizada foi de 25 µL, na proporção de 1:1, sendo o volume final de 50 µL. Os corantes foram aplicados no canal radicular e ficaram agindo por 5 minutos sobre a amostra antes da análise. Após esse período, no terço apical do dente, foi realizada uma análise topográfica da amostra, através de “slices”. Os cortes foram feitos no sentido sagital com espessura de 0.51 µm

para a objetiva de 40x e de 0.47  $\mu\text{m}$  para a objetiva de 60x. Os comprimentos de onda utilizados para análise foram AlexaFluor 488, para análise do verde, e AlexaFluor 546 para análise do vermelho. O último milímetro do terço apical foi excluído da análise pelo fato de o preparo químico-mecânico não ter abrangido essa região.

Para fins de análise das células microbianas, foi realizado zoom digital de 3x, no aumento de 60x. O terço apical da raiz foi o foco da avaliação; e para isso, três áreas de interesse foram consideradas: uma mais apical, uma na porção média e outra na porção cervical. A escala utilizada foi de 10  $\mu\text{m}$ .

O quinto slice obtido em direção à superfície do canal radicular a partir da imagem mais superficial dos túbulos dentinários foi padronizado para análise dos resultados, que foi feita por um examinador cego calibrado. Foram realizadas a análise por escores e também uma análise descritiva dos resultados. Foram padronizados valores de escores correspondentes à porcentagem de viabilidade bacteriana da população total presente nas amostras. Dessa forma: 0 =  $\leq 25\%$  de bactérias viáveis, 1 =  $>25\%$  e  $< 50\%$ , 2 = 50%, 3 =  $> 50\%$  e  $< 75\%$  e 4 =  $\geq 75\%$ . Para a realização da análise estatística dos dados obtidos foram usados os testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney com  $p < 0,05$ . Para o cálculo foi considerado somente o maior valor de escore correspondente a cada amostra.



Fonte: [http://www.hotfrog.com.mx/Uploads/PressReleases/Microscopio-Confocal-Olympus-2468\\_image.jpg](http://www.hotfrog.com.mx/Uploads/PressReleases/Microscopio-Confocal-Olympus-2468_image.jpg)

**Figura 2.** Microscópio Confocal Olympus FV 1000®.

## Resultados

O GCP (grupo controle positivo) apresentou a formação de um biofilme bacteriano abundante com presença de bactérias mortas e vivas (**Figura 3 A-C**). Em relação à viabilidade, o mesmo exibiu escores 2 e 3.

O GCN (grupo controle negativo) exibiu escore 0 em todas as amostras, com uma grande variabilidade no número total de bactérias. Em algumas áreas detectou-se ausência de bactérias, em outras, bactérias presentes somente nos túbulos dentinários e, ainda, mínima quantidade de bactérias na superfície do canal radicular. Em todos esses casos as bactérias apresentaram-se coradas na cor vermelha, estando, portanto, inviáveis (**Figura 3 D-F**). Houve diferença estatisticamente significativa com todos os outros grupos ( $p < 0,05$ ) (**Tabela 1**).

O G1 (NaOCl) foi capaz de reduzir a quantidade de bactérias presentes no conduto radicular (**Figura 3 G-I**). Apesar disso, das poucas bactérias restantes observou-se que a maioria apresentava-se viável, sendo classificada predominantemente com escore 4, e, sendo assim, diferente estatisticamente dos demais grupos ( $p < 0,05$ ) (**Tabela 1**), por possuir a maior viabilidade bacteriana entre todos esses.

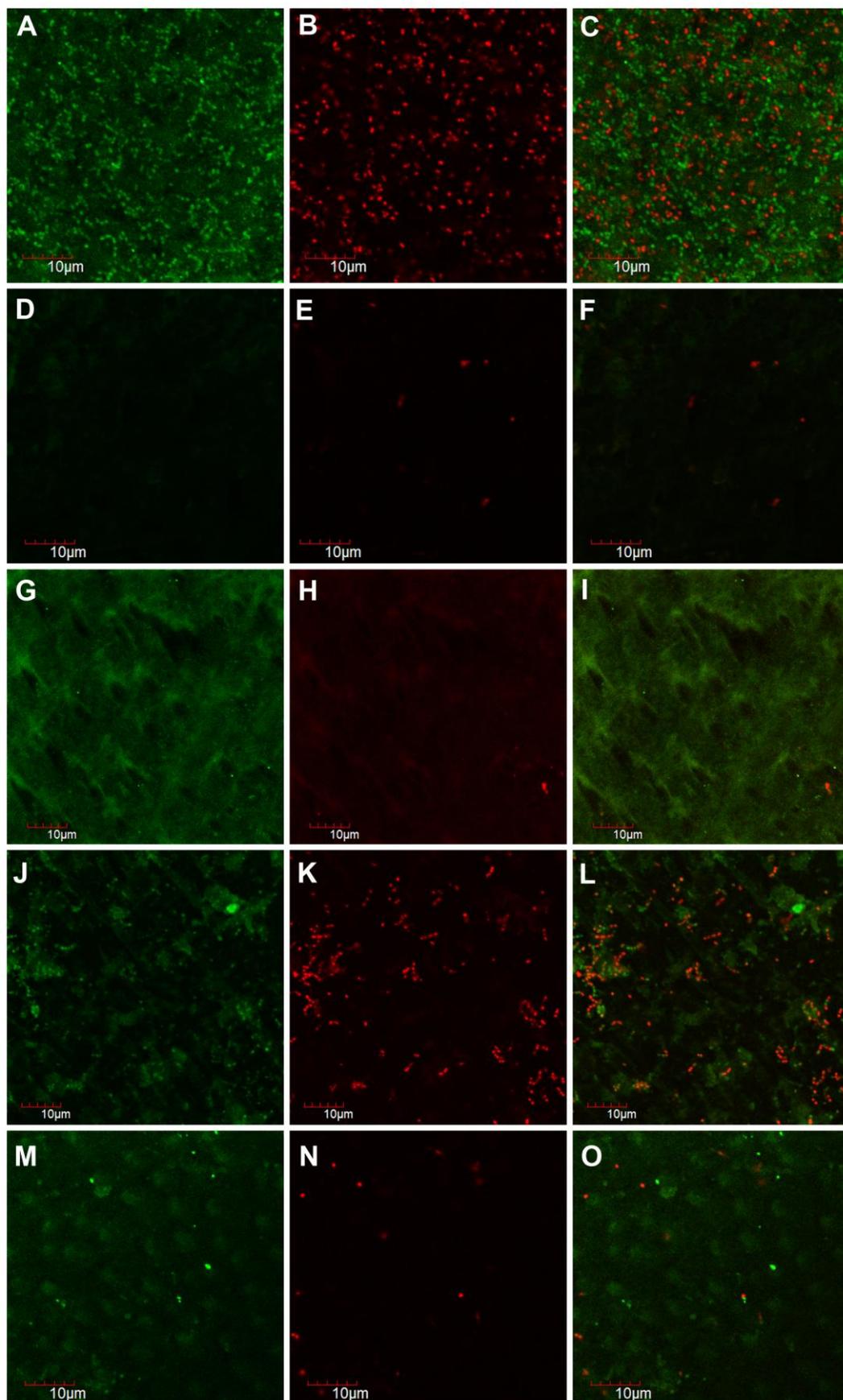
Já o G2 (CX) apresentou uma boa quantidade de bactérias, encontrando-se microrganismos em abundância em algumas áreas (**Figura 3 J-L**). A quantidade de bactérias foi maior do que aquela exibida pelo G1, porém, apesar do número, havia menos bactérias viáveis proporcionalmente ao mesmo (escore 3) -  $p = 0,01$  (**Tabela 1**).

O G3 (NaOCl + CX) foi classificado, em grande parte, com escore 3. Demonstrou uma diminuição da viabilidade bacteriana quando comparado ao grupo instrumentado apenas com hipoclorito de sódio (G1) -  $p = 0,01$  - e uma viabilidade bacteriana semelhante ao G2 ( $p = 0,55$ ) (**Tabela 1**). Adicionalmente, apresentou uma baixa população bacteriana remanescente, a qual foi semelhante ao G1 (**Figura 3 M-O**).

**Tabela 1.** Número de amostras correspondente a viabilidade bacteriana.

ESCORES	GC positivo	GC negativo	Hipoclorito de sódio	Clorexidina	Hipoclorito de sódio + Clorexidina
0		3 <sup>B</sup>			
1					
2	1 <sup>ADE*</sup>				1 <sup>ADE</sup>
3	2 <sup>ADE</sup>		1 <sup>C</sup>	5 <sup>ADE</sup>	3 <sup>ADE</sup>
4			4 <sup>C</sup>		1 <sup>ADE</sup>

\* Letras diferentes expressam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3. Efeitos da instrumentação do canal radicular com diferentes soluções irrigantes:** A coluna da esquerda representa as bactérias viáveis (verde), a coluna central as

bactérias inviáveis (vermelho) e a coluna da direita a população bacteriana total (sobreposição das imagens da primeira e da segunda coluna). **A-C**: viabilidade bacteriana do grupo controle positivo; **D-F**: viabilidade bacteriana do grupo controle negativo; **G-I**: viabilidade bacteriana do grupo instrumentado com hipoclorito de sódio 2,5%; **J-L**: viabilidade bacteriana do grupo instrumentado com clorexidina 2% gel; **M-O**: viabilidade bacteriana do grupo instrumentado com hipoclorito de sódio 2,5% + clorexidina 2% gel. Barra = 10 µm; imagens representativas da análise das amostras de cada grupo (zoom digital 3x, aumento 60x).

## Discussão

Apesar do preparo do canal com agentes antimicrobianos contribuir para a redução da microbiota endodôntica (ESTRELA et al, 2007), ainda há discussão quanto à escolha da solução irrigante ideal e de sua concentração (ESTRELA et al, 2003). Características como atividade antimicrobiana, habilidade para dissolver tecidos orgânicos, propriedade lubrificante e baixa citotoxicidade são recomendáveis no uso de soluções químicas, especialmente em canais radiculares com complexidades anatômicas que limitam a ação de instrumentos endodônticos (SAFAVI, SPANGBERG e LANGELAND, 1990).

Os resultados do presente estudo demonstraram que, em um quadro de contaminação por microrganismos, o biofilme bacteriano apresenta uma elevada porcentagem de bactérias mortas, como demonstrado no grupo controle positivo.

A instrumentação com NaOCl reduziu a quantidade total de bactérias quando comparado aos demais grupos embora as bactérias remanescentes ainda se apresentassem viáveis. Este dado demonstra a elevada capacidade de limpeza desta substância e ao poder de dissolução de material orgânico inerente à mesma. Em outro estudo, também por meio de avaliação com microscopia confocal, foi revelado efeito de eliminação de *Enterococcus faecalis* pela ação do NaOCl em torno de 91% (CHÁVEZ DE PAZ, BERGENHOLTZ e SVENSÄTER, 2010). A presença de bactérias viáveis, mesmo com o tratamento padrão ouro utilizado nos tratamentos endodônticos, ressalta a necessidade de utilização de materiais complementares com poder bactericida.

Diferentemente do NaOCl, a CX (G2) apresentou habilidade de inviabilizar uma maior porcentagem de microrganismos, contudo com menor poder de limpeza do canal radicular. Esses achados vão ao encontro dos resultados de CLEGG et al (2006), em que por meio de microscopia eletrônica de varredura, a clorexidina 2% foi capaz de matar bactérias, mas falhou em romper o biofilme. Todavia, vai contra outros achados

que relatam que a CX gel, por ser viscosa, torna a instrumentação facilitada, aumentando a remoção mecânica dos tecidos orgânicos, e assim, compensando sua inabilidade em dissolvê-los (VIANNA et al, 2004). Em relação ao *Enterococcus faecalis*, CHÁVEZ DE PAZ, BERGENHOLTZ e SVENSÄTER (2010) demonstraram um efeito de remoção do mesmo em torno de 49% pela ação da CX.

A associação dos dois irrigantes, representada pelo terceiro grupo experimental, mostrou-se eficiente, aliando a propriedade de solvente tecidual do NaOCl e a atividade antimicrobiana da CX contra o *Enterococcus faecalis*. Do mesmo modo, estudos prévios têm advogado a combinação de NaOCl e de CX com o intuito de elevar suas propriedades antimicrobianas, sendo que a vantagem de uso como irrigação final da CX poderia prolongar tal potencial devido a sua substantividade (VIANNA e GOMES, 2009). Outros achados também demonstraram que a irrigação acrescida com a CX 2% resultou em elevação de desinfecção do sistema de canais radiculares, revelando um resultado clinicamente importante (ZAMANY, SAFAVI e SPÅNGBERG, 2003).

Em outros trabalhos, quando testadas *in vitro*, ambas as substâncias acima descritas exibiram um bom potencial bactericida (VIANNA et al, 2004). O NaOCl e a CX, dentre outros irrigantes, parecem ser hábeis em penetrar bem nos túbulos dentinários (BUCK, ELEAZER e STAAT, 1999). Há inúmeros estudos demonstrando a eficácia dos dois irrigantes, porém, com resultados distintos. VIANNA et al (2006), por exemplo, em um estudo *in vivo*, sugere que o NaOCl 2,5% em comparação com a CX 2% gel possui maior capacidade de inviabilizar patógenos endodônticos e de suportar a remoção celular. Em um estudo *in vitro*, o NaOCl também demonstrou melhor eficácia antimicrobiana comparada à CX (ESTRELA et al, 2003). Já VIANNA et al (2004) e FERRAZ et al (2007), também em estudos *in vitro*, verificaram o contrário, maior potencial antimicrobiano por parte da CX 2% gel em relação ao NaOCl 2,5%. E esse tipo de diferença, segundo ESTRELA et al (2003), pode ser causada por diferentes métodos experimentais, concentração, tipo de solução irrigante ou período de análises.

Em seu trabalho, ZEHNDER (2006) descreve que a irrigação com CX é mais efetiva em bactérias gram-positivas do que em gram-negativas e que a mesma deveria ser usada adicionalmente durante o retratamento endodôntico em que altas proporções de bactérias gram-positivas (tais como *Enterococcus faecalis*) são esperadas no sistema de canal radicular. De acordo com AL-AHMAD et al (2009), a alta prevalência de *Enterococcus faecalis* em infecções endodônticas poderia ser causada por sua

habilidade de formar biofilme e de se coagregar com outras bactérias presentes nos canais radiculares.

A partir dos resultados encontrados, podemos conjecturar o uso de EDTA como irrigante final durante o preparo químico-mecânico, devido a sua conhecida capacidade de remoção de smear layer. Segundo a pesquisa de BRYCE et al (2009), o EDTA apresenta capacidade de ruptura, embora seu potencial antimicrobiano seja menos evidente. Essa observação é suportada pela hipótese de que o EDTA facilita a remoção de biofilme ou de células bacterianas de biofilmes como proposto por GULABIVALA et al (2005). Além do potencial do NaOCl e da CX em remover *Enterococcus faecalis*, demonstrado por CHÁVEZ DE PAZ, BERGENHOLTZ e SVENSÄTER (2010) através da microscopia confocal, esses autores ainda revelaram que ficou em 5% o efeito correspondente ao EDTA em remover essa bactéria.

A observação da profundidade de penetração de inúmeros microrganismos em túbulos dentinários em função do tempo de incubação, da eficácia dos irrigantes e dos curativos endodônticos tem sido permitida por modelos experimentais de infecção de canal radicular *in vitro* (PEREZ et al, 1993). Para o desenvolvimento dessas pesquisas, dentes bovinos têm sido bastante utilizados (ZAPATA et al, 2008; MOREIRA et al, 2009; AL-AHMAD et al, 2009). Os dentes bovinos foram escolhidos para o presente estudo pelo fato de apresentarem dentina similar à humana em estrutura, composição e diâmetro de túbulos (CAMARGO et al, 2007). Porém, a primeira possui maior homogeneidade de composição mineral do que a segunda (WEGEHAUPT et al, 2008).

A grande vantagem do uso da microscopia confocal, como método de análise em pesquisas, é a possibilidade que a mesma apresenta de identificar bactérias vivas e mortas. Além disso, a MVLC permite seccionamento óptico, reconstrução tridimensional e, conseqüentemente, observação e localização exata da distribuição espacial de bactérias em diferentes camadas de lesão periapical e em torno de células periapicais (SUNDE et al, 2003). Segundo ZAPATA et al (2008) a técnica MVLC pode ser usada como um complemento para os estabelecimentos microbiológico, histológico, padrão de microscopia eletrônica e PCR - técnicas baseadas para a identificação de bactérias viáveis (por exemplo, durante a avaliação *in vitro* de materiais dentais que poderiam estar em contato com dentina infectada e para o estudo da atividade metabólica de células bacterianas durante o processo de infecção dentinária).

Entretanto, a MVLC é uma técnica restrita. A capacidade que os minerais possuem de refletir o laser do sistema óptico através de seus cristais e os debris

resultantes do preparo químico-mecânico dos canais radiculares resultam em uma limitada profundidade de análise das amostras, tornando-a superficial.

Além disso, outro ponto a ser ressaltado, é a importância de se possuir parâmetros de interpretação da técnica, já que a mesma permite seccionamento óptico gerando inúmeros slices da área de interesse e possibilidades de reconstrução em 3D. São fundamentais a calibragem do avaliador e a padronização da imagem foco a ser avaliada para todas as amostras.

## Conclusões

O NaOCl 2,5% demonstrou-se eficiente em remover a grande totalidade do biofilme de *Enterococcus faecalis* das amostras através do preparo químico-mecânico do canal radicular. Porém, as bactérias restantes foram identificadas predominantemente como viáveis.

A irrigação com CX 2% gel foi mais eficiente em eliminar *Enterococcus faecalis* viáveis, mas apresentou inferior potencial de limpeza dos canais radiculares, deixando mais biofilme.

A irrigação final com CX apresentou maior atividade, considerando-se o fato de ter exibido mínima quantidade bacteriana, semelhante ao G1, e um número de microrganismos inviáveis superior ao mesmo grupo, devido à ação adicional da CX.

Mais experimentos são necessários para investigar o efeito comparativo da ação da CX nas formulações gel e líquida e o papel adicional do EDTA na eliminação dos microrganismos remanescentes no sistema de canal radicular.

## Agradecimentos

*Os autores agradecem ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) pelo procedimento de esterilização em plasma de peróxido de hidrogênio do material de interesse, ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS, especialmente à Prof<sup>ta</sup>. Gertrudes Corção, pela gentileza de ter cedido a cepa referência de *Enterococcus faecalis* - ATCC 8750 para a pesquisa, ao Laboratório de Bioquímica e Microbiologia (LABIM) da Faculdade de Odontologia da UFRGS pelo apoio e espaço ofertados ao estudo, ao Centro de Microscopia Eletrônica (CME) do Campos do Vale,*

*também da UFRGS, em especial ao Henrique Biehl, pela assistência técnica no uso do Microscópio Confocal e obtenção das imagens, e ao Profº Alex Nogueira Haas, Professor Adjunto de Periodontia da FO-UFRGS, pelo auxílio na realização da análise estatística.*

## **Referências**

AL-AHMAD, A. et al. Endodontic and Salivary Isolates of *Enterococcus faecalis* Integrate into Biofilm from Human Salivary Bacteria Cultivated *In Vitro*. **J Endod**, v. 35, n. 7, p. 986-991, Jul 2009.

BRYCE, G. et al. Contemporary Root Canal Irrigants Are Able to Disrupt and Eradicate Single - and Dual-Species Biofilms. **J Endod**, v. 35, n. 9, p. 1243-1248, Sep 2009.

BUCK, R.; ELEAZER, P.D.; STAAT, R.H. In Vitro Disinfection of Dentinal Tubules by Various Endodontics Irrigants. **J Endod**, v. 25, n. 12, p. 786-788, Dec 1999.

CAMARGO, C.H. et al. Topographical, Diametral, and Quantitative Analysis of Dentin Tubules in the Root Canals of Human and Bovine Teeth. **J Endod**, v. 33, p. 422-426, 2007.

CHÁVEZ DE PAZ, L.E.; BERGENHOLTZ, G.; SVENSÅTER, G. The Effects of Antimicrobials on Endodontic Biofilm Bactéria. **J Endod**, v. 36, n. 1, p. 70-77, 2010.

CLEGG, M.S. et al. The Effect of Exposure to Irrigant Solutions on Apical Dentin Biofilms *In Vitro*. **J Endod**, v. 32, p. 434-437, 2006.

DAMETTO, F.R. et al. In Vitro Assessment of the Immediate and Prolonged Antimicrobial Action of Chlorhexidine Gel as an Endodontic Irrigant against *Enterococcus faecalis*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 99, p. 768-772, 2005.

ESTRELA, C. et al. Antimicrobial Efficacy of Ozonated Water, Gaseous Ozone, Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine in Infected Human Root Canals. **Int Endod J**, v. 40, p. 85-93, 2007.

ESTRELA, C.R.A. et al. Control of Microorganisms In Vitro by Endodontic Irrigants. **Braz Dent J**, v. 14, n. 3, p. 187-192, 2003.

FERRAZ, C.C.R. et al. In Vitro Assessment of the Antimicrobial Action and the Mechanical Ability of Chlorhexidine Gel as an Endodontic Irrigant. **J Endod**, v. 27, p. 452-455, 2001.

FERRAZ, C.C.R. et al. Comparative Study of the Antimicrobial Efficacy of Chlorhexidine Gel, Chlorhexidine Solution and Sodium Hypochlorite as Endodontic Irrigants. **Braz Dent J**, v. 18, n. 4, p. 294-298, 2007.

GOMES, B.P.F.A. et al. Microbiological Examination of Infected Dental Root Canals. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 19, p. 71-76, 2004.

GULABIVALA, K. et al. Effects of Mechanical and Chemical Procedures on Root Canal Surfaces. **Endod Top**, v. 10, p. 103-122, 2005.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H.R.; FITZGERALD, R.J. The Effects of Surgical Exposures of Dentalpulp in Germ-free and Conventional Laboratory Rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 20, p. 34-35, 1965.

LIN, L.M.; SKRIBNER, J.E.; GAENGLER, P. Factors Associated with Endodontic Treatment Failures. **J Endod**, v. 18, p. 625-627, 1992.

MOREIRA, D.M. et al. Structural Analysis of Bovine Root Dentin after Use of Different Endodontics Auxiliary Chemical Substances. **J Endod**, v. 35, n.7, p. 1023-1027, Jul 2009.

OKINO, L.A et al. Dissolution of Pulp Tissue by Aqueous Solution of Chlorhexidine Digluconate and Chlorhexidine Digluconate Gel. **Int Endod J**, v. 37, p. 38-41, 2004.

PEREZ, F. et al. In Vitro Study of the Penetration of Three Bacterial Strains into Root Dentin. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 103, p. 76-97, 1993.

PETERS, L.B. et al. Effects of Instrumentation, Irrigation and Dressing with Calcium Hydroxide on Infection in Pulpless Teeth with Periapical Bone Lesions. **Int Endod J**, v. 35, p. 13-21, 2002.

NAIR, R.P.N. Light and Electron Microscopic Studies of Root Canal Flora and Periapical Lesions. **J Endod**, v. 13, p. 29-39, 1987.

RING, K.C. et al. The Comparison of the Effect of Endodontic Irrigation on Cell Adherence to Root Canal Dentin. **J Endod**, v. 34, p. 1474-1479, 2008.

RÔÇAS, I.N.; SIQUEIRA, J.F.Jr; SANTOS, K.R. Association of *Enterococcus faecalis* with Different Forms of Periradicular Diseases. **J Endod**, v. 30, p. 315-320, 2004.

SAFAVI, K.E.; SPANGBERG, L.S.W.; LANGELAND, K. Root Canal Dentine Tubule Disinfection. **J Endod**, v. 16, p. 207-210, 1990.

SHEN, Y. et al. Evaluation of the Effect of Two Chlorhexidine Preparations on Biofilm Bacteria In Vitro: A Three-Dimensional Quantitative Analysis. **J Endod**, v. 35, n. 7, p. 981-985, Jul 2009.

SUNDE, P.T. et al. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) for Direct Visualization of Bacteria in Periapical Lesions of Asymptomatic Root-filled Teeth. **Microbiology**, v. 149, n. 5, p. 1095-1102, May 2003.

VIANNA, M.E. et al. In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Activity of Chlorhexidine and Sodium Hypochlorite. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 97, n. 1, p. 79-84, Jan 2004.

VIANNA, M.E. et al. In Vivo Evaluation of Microbial Reduction after Chemo-mechanical Preparation of Human Root Canals Containing Necrotic Pulp Tissue. **Int Endod J**, v. 39, n. 6, p. 484-492, Jun 2006.

VIANNA, M.E.; GOMES, B.P.F.A. Efficacy of Sodium Hypochlorite Combined with Chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* In Vitro. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 107, n. 4, p. 585-589, Apr 2009.

VITKOV, L. et al. Ex Vivo Gingival-biofilm Consortia. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, p. 404-411, 2005.

WEGEHAUPT, F. et al. Is Bovine Dentine an Appropriate Substitute for Human Dentine in Erosion/Abrasion Tests? **J Oral Rehabil**, v. 35, p. 390-394, 2008.

ZAMANY, A.; SAFAVI, K.; SPANGBERG, L.S. The Effect of Chlorhexidine as an Endodontic Disinfectant. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 96, n. 5, p. 578-581, Nov 2003.

ZAPATA, R.O. et al. Confocal Laser Scanning Microscopy Is Appropriate to Detect Viability of *Enterococcus faecalis* in Infected Dentin. **J Endod**, v. 34, n. 10, p. 1198-1201, Oct 2008.

ZEHNDER, M. Root Canal Irrigants. **J Endod**, v. 32, p.389-398, 2006.

## ANEXO

ANEXO A - Tabela dos resultados na íntegra:

AMOSTRAS	SCORE 0	SCORE 1	SCORE 2	SCORE 3	SCORE 4	OBSERVAÇÕES
CP 1A				X		-
CP 1B				X		-
CP 1C				X		-
CP 2A			X			-
CP 2B			X			-
CP 2C			X			-
CP 3A			X			-
CP 3B			X			-
CP 3C				X		-
CN 4A	X					Sem bactérias.
CN 4B	X					Mínima quantidade de bactérias.
CN 4C	X					Mínima quantidade de bactérias.
CN 5A	X					Mínima quantidade de bactérias.
CN 5B	X					Bactérias presentes apenas nos túbulos dentinários.
CN 5C	X					Sem bactérias.
CN 6A	X					Mínima quantidade de bactérias.
CN 6B	X					Mínima quantidade de bactérias.
CN 6C	X					Mínima quantidade de bactérias.
H 7A	X					Sem bactérias.
H 7B					X	Bactérias presentes apenas nos túbulos dentinários.
H 7C					X	Poucas bactérias, todas vivas.
H 8A					X	Quantidade razoável de bactérias, mas aparentam estar no interior dos túbulos dentinários.
H 8B					X	Quantidade razoável de bactérias.
H 8C					X	Poucas bactérias na superfície, mas há quantidade razoável das mesmas em regiões mais

						profundas.
H 9A				X		Quantidade razoável de bactérias.
H 9B					X	Poucas bactérias, todas vivas.
H 9C					X	Poucas bactérias, todas vivas.
H 10A					X	Poucas bactérias, todas vivas.
H 10B					X	Poucas bactérias, todas vivas.
H 10C					X	Poucas bactérias, todas vivas.
H 11A				X		Mínima quantidade de bactérias.
H 11B				X		Mínima quantidade de bactérias.
H 11C				X		Mínima quantidade de bactérias.
C 12A				X		Grande quantidade de bactérias.
C 12B			X			Quantidade razoável de bactérias.
C 12C			X			Grande quantidade de bactérias.
C 13A		X				Quantidade razoável de bactérias.
C 13B		X				Quantidade razoável de bactérias.
C 13C				X		Grande quantidade de bactérias.
C 14A			X			Bactérias vivas espalhadas pela superfície e bactérias mortas localizadas em nichos.
C 14B				X		-
C 14C			X			-
C 15A				X		Bactérias localizadas em nichos com predomínio de bactérias vivas.
C 15B				X		-
C 15C				X		-
C 16A				X		-
C 16B				X		-
C 16C				X		-
H+C 17A	X					Sem bactérias.
H+C 17B			X			-

H+C 17C			X			-
H+C 18A			X			Poucas bactérias.
H+C 18B				X		Poucas bactérias.
H+C 18C			X			Poucas bactérias.
H+C 19A					X	Mais de 90% de bactérias vivas.
H+C 19B				X		-
H+C 19C				X		-
H+C 20A		X				Poucas bactérias.
H+C 20B				X		Dentina ondulada, análise de mais de uma imagem.
H+C 20C			X			Grande quantidade de bactérias.
H+C 21A			X			Leve predomínio de bactérias vivas.
H+C 21B				X		-
H+C 21C				X		-

Legenda:

CP = Controle Positivo

CN = Controle Negativo

H = Hipoclorito de sódio

C = Clorexidina

H+C = Hipoclorito de sódio + Clorexidina

Os números correspondem às amostras analisadas.

A = Região apical do terço apical (exceto milímetro final)

B = Região média do terço apical

C = Região cervical do terço apical