



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

ARTURO JAVIER ARANDA GARCIA

**EFETIVIDADE ANTIBACTERIANA DE SOLUÇÕES IRRIGADORAS E
SISTEMA ENDOX PLUS NO TRATAMENTO DE CANAIS
RADICULARES**

ARARAQUARA

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

Arturo Javier Aranda Garcia

**EFETIVIDADE ANTIBACTERIANA DE SOLUÇÕES IRRIGADORAS E
SISTEMA ENDOX PLUS NO TRATAMENTO DE CANAIS
RADICULARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia – Área de Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, para a obtenção do Título de Doutor em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho

Co-orientadora: Profa. Dra. Juliane M. Guerreiro Tanomaru

ARARAQUARA

2012

Aranda Garcia, Arturo Javier.

Efetividade antibacteriana de soluções irrigadoras e sistema Endox Plus no tratamento de canais radiculares. Arturo Javier Aranda Garcia. – Araraquara: [s.n.], 2012. 73 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador : Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho.

Co-orientador: Profa. Dra. Juliane M. Guerreiro Tanomaru

1. Desinfecção 2. Endodontia 3. Enterococcus faecalis
4. Irrigantes do canal radicular. I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Ceres Maria Carvalho

Galvão de Freitas, CRB-8/4612 , Serviço Técnico de Biblioteca e

Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

ARTURO JAVIER ARANDA GARCIA

**“EFETIVIDADE ANTIBACTERIANA DE SOLUÇÕES IRRIGADORAS E
SISTEMA ENDOX PLUS NO TRATAMENTO DE CANAIS
RADICULARES”**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho

2º Examinador: Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo

3º Examinador: Prof. Dr. Milton Carlos Kuga

4º Examinador: Prof. Dr. Evandro Watanabe

5º Examinador: Prof. Dr. Manoel Eduardo de Lima Machado

Araraquara, 13 de fevereiro de 2012.

DADOS CURRICULARES

ARTURO JAVIER ARANDA GARCIA

NASCIMENTO	12.04.1973 – Distrito Federal, Ciudad de México, México
FILIAÇÃO	Arturo Javier Aranda Figueroa Martina Garcia Velazco
1992 – 1995	Graduação em Odontologia na Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (UNAM) - México.
1998 – Atual	Membro da Secretaria de Marinha – Armada de México.
2002 – 2004	Especialização em Endodontia pela Universidad Latino Americana (ULA), Ciudad de Mexico, México.
2005 – 2007	Pós-graduação em Odontologia – Área de Endodontia, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia, Universidad Latino Americana (ULA), México.
2005 – 2009	Professor da disciplina de Endodontia dos cursos de graduação e de Especialização, Universidad Latino Americana (ULA), México.

2009 – 2010 Coordenador do Curso de Especialização em Endodontia, Centro Mexicano em Estomatologia (CME), Puebla, Mexico.

ASSOCIAÇÕES

Colegio Nacional de Cirujanos-dentistas de Mexico

Academia Mexicana de Endodoncia

Consejo Mexicano de Endodoncia

SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa em Odontologia

IADR – International Association for Dental Research

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese:

Sagrario, para ti meu amor, guerreira incansável, todo meu amor e agradecimento por estes 14 anos juntos cheios de lutas e sonhos realizados, por todo teu apoio porque sem você nada teria sido possível. Para você toda minha admiração, por ter sido pai e mãe para os nossos queridos filhos, cada dia agradeço a Deus por ter colocado na minha vida a melhor esposa e mãe. Te amo.

Aos meus três queridos filhos: Jesús, Pablo e Maite, os amo com todo o meu coração, o que mais dói em todo este tempo é ter perdido momentos valiosos ao lado de vocês. Espero que entendam que todo este sacrifício de seus pais é para benefício de vocês, só lhe peço a Deus que me permita retribuir todo esse tempo e demonstrar-lhes o grande amor que sinto por vocês. Vosso futuro é o que dia a dia me dá força para seguir aprendendo e me superando.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus pelas muitas bênçãos, oportunidades e sonhos realizados. Obrigado Senhor por abençoar o nosso caminho, por cumprir mais este objetivo em minha vida, Tu sabes o que significa, por que sem Ti nada seria possível.

Aos meus pais, Arturo e Martina pelo apoio, acompanhando cada um dos meus sonhos, sempre estão no meu coração, meu amor e agradecimento por todos os ensinamentos que me deram, muitas das minhas vitórias eu devo a vocês, pelo exemplo de luta que sempre me demonstraram. Os amo.

Ao meu sogro Rafael por todo o apoio em todos os meus projetos, cuidados com sua filha e netos, muito em especial à *minha sogra Mercedes* que hoje não está mais conosco. Mas nos deixou um grande ensinamento de amor e unidade familiar. Mesmo no céu ela nos cuida e intercede por nós diante de Deus, Nosso Senhor. Obrigado, meu carinho e respeito por vocês.

Ao meu Capitão Arturo Cabrera MacGregor por todo o seu apoio incondicional em cada um dos meus sonhos militares e profissionais. Nós

sabemos que este curso é o primeiro degrau deste sonho, o mais difícil, e as pessoas falavam que era impossível conseguir, lembra-se chefe? Foi pelo senhor, mais por me permitir ser o seu amigo, quero expressar-lhe minha admiração e respeito pelo excelente ser humano. Obrigado por acreditar em mim. Sempre pode contar comigo, incondicionalmente.

À Dra. Leticia Ortega Valencia, que prematuramente se adiantou neste caminho, mas me deixou um grande ensinamento de amor aos semelhantes e em especial à família. Também obrigado pelos seus pedidos para que chegassem aqui, obrigado, com todo carinho.

Ao Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo por todo o apoio na realização deste sonho, porque sem sua ajuda jamais teria sido possível. Quando estudava na especialização lia teus livros e jamais imaginei chegar a conviver com a excelente pessoa que você é. Mas o que mais admiro é a tua humildade diante da tua grandeza. Obrigado por seus bons conselhos nos momentos mais difíceis. Um agradecimento a toda tua família, esposa e filhas, pela hospitalidade e amizade.

Ao Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho e a sua esposa *Profa. Dra. Juliane Guerreiro Tanomaru* por todo o apoio durante este tempo, pela sua hospitalidade, mas principalmente pela amizade para com a minha pessoa e

família, minha admiração pelos excelentes profissionais que estão motivando os seus alunos a ser cada dia melhores, sempre dispostos para compartilhar seus conhecimentos, pois esta é a verdadeira missão de um professor. À sua família professora Juliane, pela sua hospitalidade e amizade.

Ao Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho por aceitar ser meu orientador, por todo o apoio que recebi durante este tempo, por tantos bons momentos compartilhados, pela sua amizade, pelos bons conselhos, sempre disposto a conversar comigo, minha admiração e respeito.

Ao Prof. Dr. Milton Carlos Kuga, a quem considero uma das pessoas mais inteligentes que conheço, uma pessoa tenaz e perfeccionista, que sempre tem uma resposta a cada pergunta, pela sua amizade, pelos bons momentos, pelos seus conselhos, sua grande disponibilidade a trabalhar comigo, isso gera em mim uma grande motivação para continuar me preparando, receba minha admiração e respeito.

À Profa. Dra. Gisele Faria, pelos seus conhecimentos compartilhados, à motivação que gera em todos os alunos que sempre buscam um bom conselho ou orientação de sua parte, por me permitir trabalhar contigo e pelos conhecimentos com que me brindou. Minha admiração e respeito.

Ao Prof. Dr. Fabio Luis Camargo V. Berbert, pela amizade e cordialidade, pelos seus conhecimentos, a confiança de trabalhar ao seu lado e continuar aprendendo, minha admiração e respeito.

À minha grande amiga Gisselle Chávez, pela sua amizade, por toda a ajuda durante todo este tempo, é inestimável o meu agradecimento para ti, todo meu reconhecimento pela tua tenacidade e dedicação para ser cada dia melhor profissional e mãe, obrigado por tudo amiga.

À minha amiga Roberta Bosso, obrigado pela sua ajuda e por sempre estar disposta a auxiliar qualquer pessoa, minha admiração pela tua dedicação e pela excelente pessoa que você é.

Aos colegas de pós-graduação, todos e cada um, do mestrado e do doutorado, pelos bons momentos e pela amizade.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho - UNESP”, nas pessoas do seu Magnífico Reitor Prof. Dr. Herman Jacobus Cornelis Voorwald e Vice-Reitor Prof. Dr. Julio Cezar Duringan, bem como à Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOAr – UNESP), nas pessoas do seu atual Diretor, Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla, e sua Vice-Diretora, Prof. Dra. Andréia Affonso Barreto Montandon, pela oportunidade de poder cursar a Pós-Graduação, cumprindo um dos meus sonhos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Endodontia, coordenado pelo Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho.

Aos docentes do Departamento de Odontologia Restauradora – Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Vilella Berbert, Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho, Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru, Profa. Dra. Gisele Faria, Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo e Prof. Dr. Milton Carlos Kuga.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara, pela disponibilidade e ajuda em todo momento, em especial para os funcionários do *Departamento de Odontologia Restauradora, da Biblioteca* e da *Seção de Pós-graduação*.

Ao Brasil, um país tão lindo, muito parecido ao meu, na hospitalidade e na generosidade de suas pessoas, hoje digo que é a minha segunda pátria, porque morei muito feliz neste maravilhoso país.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, os mais sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 PROPOSIÇÃO	21
3 CAPÍTULO I	22
4 CAPÍTULO II	40
CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
REFERÊNCIAS	63
APÊNDICE	68
ANEXO	72

Aranda Garcia AJ. Efetividade antibacteriana de soluções irrigadoras e sistema Endox Plus no tratamento de canais radiculares [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade antibacteriana de soluções irrigadoras e do sistema Endox Plus no preparo de canais radiculares.

Capítulo 1 - Para comparar a efetividade antibacteriana da solução de hipoclorito de sódio (NaOCl), MTAD BioPure e do Sistema Endox Plus durante o preparo biomecânico, foram utilizadas 70 raízes de dentes humanos unirradiculados contaminadas com cepa de *E. faecalis* (ATCC 29212) e incubadas por 21 dias. Os espécimes foram divididos em cinco grupos: GI- Sistema Endox Plus, GII- NaOCl 2,5 % /MTAD, GIII- NaOCl 2,5% /EDTA, GIV- solução salina (controle positivo), GV- Controle negativo (sem instrumentação/irrigação). Foi realizada a análise microbiológica das amostras por meio de diluições seriadas e a contagem das UFCs. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por ANOVA e Tukey post-hoc ($p < 0,05$). Todos os espécimes mostraram crescimento bacteriano após o período de contaminação com similar contagem de UFC/mL log, sem diferença estatística entre os grupos. Após os procedimentos houve uma redução da quantidade de bactérias em todos os grupos, exceto no controle negativo. Não houve diferenças estatísticas significantes entre os GI e GIV. Os grupos II e III não

mostraram crescimento bacteriano, mostrando diferença estatística com os outros grupos. Na coleta final, houve um aumento na contagem bacteriana nos grupos I, II, III e IV, sem diferença significativa entre eles. Porém, houve diferença na proliferação bacteriana quando comparados com a coleta pós-preparo. O sistema Endox Plus demonstrou a menor efetividade antibacteriana quando comparado às soluções de NaOCl 2,5% /MTAD e NaOCl 2,5% /EDTA e, todos os procedimentos avaliados permitiram a proliferação bacteriana após 7 dias, mostrando a permanência da infecção no SCR.

Capítulo 2 - Foi avaliada a atividade antibacteriana das soluções irrigadoras MTAD BioPure, Chlor-XTRA e CHX-Plus pelo teste de contato direto sobre biofilme de *E. faecalis* em dentina bovina. Foram 48 corpos-de-prova de 5mm x 5mm x 0,7mm que foram esterilizados. Após formação de biofilme com a cepa de *E. faecalis* (ATCC 29212) por 15 dias foi realizado o teste antibacteriano por contato direto. Os tempos de contato foram de 1 e 3 minutos. A análise microbiológica foi realizada por meio da contagem das UFC/mL após cada um dos períodos experimentais, como no capítulo 1. Chlor-XTRA foi capaz de eliminar biofilme de *E. faecalis* após 1 e 3 minutos de contato, com diferença estatística significativa entre os demais grupos ($p < 0,05$). MTAD Biopure possui a menor atividade antibacteriana quando comparado às soluções de Chlor-XTRA e CHX-Plus. Chlor-XTRA foi o irrigante que se mostrou eficaz sobre biofilme de *E. faecalis*.

Palavras-chave: Desinfecção, Endodontia, *Enterococcus faecalis*, Irrigantes do canal radicular.

Aranda Garcia AJ. Antibacterial effectiveness of irrigating solutions and Endox Plus system in the treatment of root canals [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

ABSTRACT

The aim of this study is to evaluate the antimicrobial effectiveness of irrigating solutions and the Endox Plus system in the treatment of the root canals.

Chapter I- In order to compare the antimicrobial effectiveness of sodium hypochlorite solution (NaOCl), MTAD Biopure and Endox Plus system during chemomechanical preparation, were used 70 single-rooted human teeth, which were contaminated with the strain of *E. faecalis* (ATCC 29212) and incubated for 21 days. The specimens were divided into five groups: GI- Endox Plus system, GII- NaOCl 2.5% /MTAD, GIII- NaOCl 2.5% /EDTA, GIV- saline solution (positive control), GV- negative control (without instrumentation/irrigation). Microbiological analysis of the samples consisted in evaluation of the CFUs. The data obtained were statistically analyzed by ANOVA tests and Tukey post-hoc ($p < 0.05$). The specimens showed bacterial growth after the initial incubation period with similar counting of CFU/mL log, with no statistical difference among the groups. After the procedures there was a decrease of the amount of bacteria in all groups, except in the negative control. There were no statistically differences between the GI and GIV. The GII and GIII didn't show bacterial growth, showing

statistical differences with the other groups. In the final sample, bacterial counts increased in groups I, II, III, IV, with no statistically significant differences among the groups, but there was a difference when compared to the post-instrumentation sample. The Endox Plus system presented the lowest antibacterial effectiveness when compared to the solutions of NaOCl 2.5% /MTAD y NaOCl 2.5% /EDTA and all the evaluated procedures allowed the recovery of bacteria 7 days after treatment, demonstrating persistence of infection in the root canal system.

Chapter II- The antibacterial activity of the irrigating solutions MTAD Biopure, Chlor-XTRA and CHX-Plus was evaluated with the test of direct contact over the biofilm of the *E. faecalis* in bovine root dentine. There were used roots of bovine incisors to obtain segments of root canal for the preparation of 48 dentine sections 5mm x 5mm x 0.7 mm, which were sterilized later. After biofilm formation with the strain of *E. faecalis* (ATCC 29212) the antibacterial direct contact test was taken for 15 days. The contact times were of 1 and 3 minutes. The microbiological analysis consisted in evaluation of the number of UFC/mL after each of the experimental periods as in Chapter I. Chlor-XTRA was able to eliminate *E. faecalis* biofilm after 1 and 3 minutes of contact, with a statistically significant difference among the other groups ($p < 0,05$). MTAD Biopure has the lowest antibacterial activity when compared to solutions Chlor-XTRA e CHX-Plus. Chlor-XTRA was the irrigant that proved to be effective against *E. faecalis* biofilm.

Keywords: Disinfection, Endodontics, *Enterococcus faecalis*, Root canal irrigants.

INTRODUÇÃO

A etiologia principal das patologias pulpares persistentes tem sido atribuída às bactérias viáveis no sistema de canais radiculares (SCR) após o preparo biomecânico e obturação²³. O sucesso do tratamento endodôntico depende da eliminação ou redução da microbiota presente no SCR e da prevenção da reinfecção^{5,11,13}. *E. faecalis* é o micro-organismo que tem sido associado aos casos de insucesso do tratamento endodôntico, sua prevalência varia de 44 a 77%. Sua virulência pode ser explicada pela capacidade de competir com outros micro-organismos, invadir os túbulos dentinários e sobreviver na ausência de nutrientes^{4,6,20}.

A utilização de soluções irrigadoras durante a instrumentação auxilia na limpeza e antissepsia do SCR garantindo o sucesso da terapia endodôntica e complementa a ação mecânica dos instrumentos¹⁷. O hipoclorito de sódio (NaOCl) é o irrigante mais utilizado na Endodontia e sua atividade antimicrobiana tem sido demonstrada sobre bactérias na forma planctônica e de biofilme¹. No entanto, outras soluções irrigadoras surgiram como alternativa ao uso do NaOCl, as quais utilizam algumas associações de agentes antibacterianos, quelantes e detergentes, tais como MTAD, CHX-Plus e Chlor-XTRA^{11,15,22}.

MTAD BioPure (Dentsply, Tulsa Dental, OK) é um irrigante de canais radiculares que foi introduzido por Torabinejad e Johnson²¹ em 2003. É

composto por uma mistura de doxiciclina, ácido cítrico e um detergente (Tween 80)^{18,22}. Diversos estudos tem demonstrado sua ação antibacteriana, sendo efetivo na eliminação de *E. faecalis*^{3,10,12,14}. Em contrapartida existem estudos que não encontraram eficácia significativa quando comparado ao NaOCl. Dunavant et al.⁵ (2006) demonstraram que NaOCl a 1% foi significativamente mais eficaz na eliminação do biofilme de *E. faecalis* do que o MTAD, quando avaliado através do teste de contato direto.

CHX-Plus e Chlor-XTRA (Vista Dental Products, Racine, WI, EUA) são produtos relativamente novos utilizados na irrigação dos canais radiculares, que contém na sua composição uma substância modificadora da superfície, que diminui a tensão superficial, associado às soluções de gluconato de clorexidina 2% e NaOCl a 5,8%, respectivamente^{11,16}.

Shen et al.¹⁵ (2011) avaliaram a susceptibilidade de biofilmes multiespécies à solução de CHX-Plus, em comparação à solução de Clorexidina (CHX) a 2%. Foram usados discos de hidroxiapatita para formação de biofilme durante vários períodos de tempo (2 dias, 1, 2, 3, 6, e 12 semanas), para depois serem submetidos à exposição aos irrigantes avaliados (CHX 2% ou CHX-Plus), por 1, 3 e 10 minutos. Depois do tratamento, a quantidade de bactérias viáveis/mortas foi analisada por meio de microscopia confocal a laser. A proporção de bactérias mortas no biofilme de 3 semanas foi menor do que os biofilmes imaturos de 2 dias, 1 e 2 semanas pós-contato, com ambas as soluções irrigadoras. O tratamento de 3 e 10 minutos com a CHX- Plus é mais efetivo sobre

as bactérias do biofilme maturo, mostrando maiores níveis de atividade bactericida em todos os períodos de exposição, quando comparado a CHX 2%.

Williamson et al.²³ (2009) compararam o efeito bactericida de 4 irrigantes: NaOCl a 6%, Chlor-XTRA, CHX a 2% e CHX-Plus sobre biofilme de *E. faecalis* (cepa ER3/2s) em três tempos de contato (1, 3 e 5 minutos). Os resultados indicaram que todos os grupos experimentais mostraram uma redução significativa de bactérias viáveis do biofilme em comparação com o grupo controle (água destilada). O NaOCl a 6% e Chlor-XTRA foram significativamente superiores sobre esta cepa em relação a CHX 2% e o CHX-Plus em todos os períodos experimentais, exceto em 5 minutos.

O sistema Endox Plus (Anfratron Technologies GmbH, Wasserburg, Germany) é uma nova versão do anterior sistema Endox (Lysis Srl, Nova Milanese, Itália), que foi desenvolvido para atuar na desinfecção do SCR. De forma similar à versão anterior, este equipamento utiliza uma ponta fina de aço inoxidável que é introduzido no interior do canal radicular promovendo aumento da temperatura e alteração na permeabilidade da membrana bacteriana e das leveduras, tendo um efeito antimicrobiano². Possui também um eletrodo neutro que é mantido na mão do paciente, fechando o circuito elétrico. O sistema Endox Plus apresenta alguns câmbios no seu painel de controle, mas seu funcionamento segue baseado na corrente alternada de alta frequência. Lendini et al.⁹ (2005) avaliaram o sistema Endox (Lysis Srl, Itália), após a instrumentação, na remoção de debris dentinários e restos pulpares vitais em canais radiculares de 75 dentes humanos com indicação de exodontia, por motivos terapêuticos. Os dentes foram

divididos em dois grupos (n=30): G1- sem preparo e G2- com preparo. Cada grupo foi dividido em dois subgrupos A e B (n=15). Em 1A e 2A foram aplicados dois impulsos elétricos com o sistema Endox, em 1B e 2B foram aplicados 4 impulsos e no grupo controle (n=15) os canais foram instrumentados e irrigados com EDTA e NaOCl a 5% (50°C) sem tratamento com o sistema Endox. Os espécimes foram avaliados em MEV por meio de um sistema de escores. Os resultados mostraram que o sistema Endox com 4 impulsos elétricos proporciona uma ótima eficácia na remoção de debris e restos pulpares quando usado após o preparo biomecânico e que este preparo é fundamental para o uso deste sistema.

São poucos os estudos que avaliam a atividade antibacteriana destas soluções irrigadoras sobre biofilme de *E. faecalis* e nenhum trabalho com o sistema Endox Plus, sendo que estes modelos experimentais podem colaborar com o publicado na literatura.

2 PROPOSIÇÃO

Os objetivos específicos deste trabalho são:

1. Comparar a efetividade antibacteriana do sistema Endox Plus, NaOCl 2,5%/MTAD e NaOCl 2,5%/EDTA durante o preparo biomecânico em canais radiculares contaminados com *E. faecalis*.
2. Avaliar a atividade antibiofilme das soluções irrigadoras MTAD Biopure, Chlor-XTRA e CHX-Plus no biofilme de *E. faecalis* formado em dentina bovina pelo método de contato direto.

3 CAPÍTULO I

EFETIVIDADE ANTIBACTERIANA DE SOLUÇÕES IRRIGADORAS E SISTEMA ENDOX PLUS NO TRATAMENTO DE CANAIS RADICULARES *

A. J. Aranda Garcia, J. M. Guerreiro-Tanomaru, R. T. Leonardo, N. B. de Faria-Júnior, G. M. Chávez-Andrade, M. Tanomaru-Filho, I. Bonetti-Filho

* Artigo aceito para publicação no periódico *International Endodontic Journal*

Resumo

Objetivo Comparar a efetividade antibacteriana do Sistema Endox Plus e solução de hipoclorito de sódio (NaOCl), associado a MTAD BioPure ou EDTA, em canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis*.

Metodologia Após preparo inicial, os canais radiculares de setenta raízes de dentes humanos unirradiculados foram contaminados com *E. faecalis* (ATCC 29212) e incubados por 21 dias. Os espécimes foram divididos em cinco grupos: GI- Sistema Endox Plus, GII- NaOCl 2.5 % /MTAD, GIII- NaOCl 2,5% /EDTA, GIV- solução salina (controle positivo), GV- Controle negativo (sem preparo/irrigação). Foi realizada a análise microbiológica das amostras por meio da contagem das UFCs.

Resultados Todos os espécimes apresentaram crescimento bacteriano após o período de contaminação com similar contagem de UFC/mL ($P > 0.05$). Após

preparo biomecânico houve diminuição da quantidade de bactérias em todos os grupos, exceto no controle negativo. Não houve diferenças estatísticas significantes entre os GI e GIV. Os grupos II e III não mostraram crescimento bacteriano, mostrando diferença estatística com os demais grupos ($P < 0.05$). Na coleta final, houve aumento na contagem bacteriana nos grupos I, II, III e IV sem diferença significativa entre eles.

Conclusões O sistema Endox Plus apresentou menor efetividade antibacteriana do que o uso de soluções de NaOCl 2,5% /MTAD e NaOCl 2,5% /EDTA. Todos os procedimentos avaliados permitiram a recuperação das bactérias após 7 dias, demonstrando a permanência da infecção no SCR.

Palavras-chave: *Enterococcus faecalis*, irrigação do canal radicular, MTAD, Sistema Endox Plus.

INTRODUÇÃO

Os micro-organismos e seus produtos apresentam papel essencial nas patologias pulpar e periapical (Kakehashi *et al.* 1965, Moller *et al.* 1981, Lin *et al.* 1992, Dornelles-Morgental *et al.* 2011). *E. faecalis* tem sido associado aos casos de insucesso do tratamento endodôntico. A sua virulência está relacionada à capacidade de invadir os túbulos dentinários formando biofilme e de sobreviver em condições de privação de nutrientes (Evans *et al.* 2002, Stuart *et al.* 2006, Dornelles-Morgental *et al.* 2011).

O preparo químico-mecânico é capaz de reduzir a quantidade de micro-organismos do sistema de canais radiculares (SCR), mas a completa eliminação microbiana é complexa em função da anatomia endodôntica (Bystrom & Sundqvist 1981, Siqueira *et al.* 1999). Uma variedade de soluções irrigadoras tem sido utilizada visando diminuir a microbiota endodôntica. O hipoclorito de sódio (NaOCl) é o irrigante mais usado e sua atividade antibacteriana tem sido demonstrada sobre bactérias planctônicas e de biofilme (Arias-Moliz *et al.* 2009). A associação de NaOCl e EDTA tem mostrado uma superior ação bactericida e de limpeza dos canais radiculares na remoção da *smear layer* (Berutti *et al.* 1997, Kishen *et al.* 2008).

MTAD BioPure é uma associação irrigante introduzida em 2003 (Torabinejad *et al.* 2003a), composta por uma mistura de doxiciclina a 3%, ácido cítrico a 4.25% e um detergente (Tween 80) (Torabinejad *et al.* 2003b, Singla *et*

al. 2011). Tem sido considerada biocompatível e efetiva clinicamente (Zhang *et al.* 2003, Torabinejad *et al.* 2005). Diversos estudos têm demonstrado sua ação antibacteriana como irrigante final, sendo eficaz na eliminação de *E. faecalis*, tanto em forma planctônica como em biofilme, após análise imediata ou empregando o método de difusão em ágar (Torabinejad *et al.* 2003b, Davis *et al.* 2007, Newberry *et al.* 2007, Shabahang *et al.* 2008, Prabhakar *et al.* 2010).

O sistema Endox Plus (Anfratron Technologies GmbH, Wasserburg, Germany) é uma nova versão do sistema Endox (Lysis Srl, Nova Milanese, Itália), desenvolvido para atuar na desinfecção do SCR. De forma similar à versão anterior, utiliza uma ponta fina de aço inoxidável, que atua como um eletrodo, transmitindo os impulsos elétricos no canal radicular (Cassanelli *et al.* 2008). O sistema Endox Plus apresenta funcionamento baseado na corrente alternada de alta frequência, em uma fração de segundo. De acordo com o fabricante, o princípio de ação do sistema Endox é a ablação do tecido pulpar por meio de calor e desta maneira, elimina os micro-organismos do SCR. Este princípio baseia-se na estrutura molecular de todos os tecidos, que é sensível à ação produzida pelos campos eletromagnéticos gerados pela corrente alternada de alta frequência. Apresenta três efeitos principais: 1) aumento da temperatura local entre 300 e 500°C, 2) aumento da porcentagem de Ozônio (O³) devido à ionização do meio, 3) produção de raios UV (Lendini *et al.* 2005).

Os poucos estudos com o sistema Endox apresentam resultados controversos. O sistema demonstrou eficácia na eliminação de debris dentinário e da *smear layer* dos canais radiculares quando usado após o preparo biomecânico e

avaliado por meio de MEV (Lendini *et al.* 2005). Porém, outros estudos não demonstraram superioridade na atividade antimicrobiana, quando comparado aos protocolos de irrigação convencionais (Virtej *et al.* 2007, Karale *et al.* 2011).

O objetivo deste estudo foi comparar a efetividade antibacteriana do sistema Endox Plus, NaOCl 2,5% /MTAD e NaOCl 2,5% /EDTA durante o preparo biomecânico em canais radiculares contaminados com *E. faecalis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista – UNESP (Anexo A). Foram usadas 70 raízes de dentes humanos unirradiculados extraídos padronizadas em 15mm de comprimento. O comprimento de trabalho foi determinado 1mm aquém do ápice e os canais radiculares foram instrumentados até LK #35 (Dentsply-Maillefer, Ballaingues, Suíça). Foi utilizado 2mL de soro fisiológico após cada troca de instrumento com seringa de 5mL (Ultradent products, EUA) e agulha de irrigação 29G – 17mm (NaviTips, Ultradent Products, USA) com aspiração simultânea. Ao final do preparo, os canais foram preenchidos com EDTA 17% (Biodinâmica, Ibioporã, PR, Brasil) por 3 minutos, irrigados com 5mL de soro fisiológico e secos com pontas de papel absorvente. Posteriormente, foi realizado o vedamento da região apical dos espécimes com resina composta fotopolimerizável (Z100, 3M ESPE, EUA) e a superfície

radicular externa foi impermeabilizada com duas camadas de adesivo epóxi (Araldite, Brascola Ltda, Taboão da Serra, SP, Brasil) (Apêndice A – Fig. A1).

Os espécimes foram aleatoriamente distribuídos em quatro microplacas de cultura celular de 24 poços (Corning Incorporated, Corning, NY, EUA). Cada microplaca recebeu 15 espécimes (grupos experimentais e controle positivo) e uma microplaca com 10 espécimes (controle negativo), fixados com resina acrílica quimicamente ativada (Clássico Artigos Odontológicos, SP, Brasil). Para permitir no modelo experimental a transmissão da alta frequência de corrente alternada necessária para o funcionamento do Endox Plus, foi colocado um fio de cobre justaposto ao ápice, fixado com adesivo epóxi, deixando uma porção do fio exposta, com a finalidade de criar um circuito fechado. As microplacas com os espécimes foram embaladas e submetidas à esterilização em óxido de etileno.

Contaminação dos canais radiculares

Os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar (VecoFlow Ltda., Campinas, SP, Brasil). Cepas padrão de *E. faecalis* (ATCC 29212) foram cultivadas em caldo Tryptic Soy – TSb (Difco Detroit, MI, EUA) por 48 horas. As bactérias foram semeadas em placas com Agar Tryptic Soy – Tsa (Difco Detroit, MI, EUA) e incubadas em condições de microaerofilia a 37°C por 48 horas. Foi preparada uma suspensão bacteriana em solução fisiológica esterilizada, com concentração equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. O ajuste da densidade óptica da suspensão foi feito em espectrofotômetro (Modelo 600 Plus, Femto, SP, Brasil). O meio de cultura (TSb) foi misturado com a suspensão bacteriana na proporção 1:1 e os canais radiculares foram contaminados com 20

μL desta mistura. As microplacas fechadas foram mantidas em condições de microaerofilia a 37°C . O período de contaminação foi de 21 dias, realizando o acréscimo de meio TSb estéril a cada 2 dias, conforme estudos prévios (Soares *et al.* 2010, Dornelles-Morgental *et al.* 2011). Após este período foi realizada a coleta inicial de todos os canais radiculares para a confirmação da contaminação por *E. faecalis*. Foram utilizados dois cones de papel absorventes esterilizados #35 (Miltex INC, USA) por espécime, os quais permaneceram no canal durante 1 minuto e transferidos para tubos testes (Eppendorf) contendo 1mL de solução fisiológica esterilizada. Os tubos foram agitados por 1 minuto em vórtex.

Procedimentos de irrigação e desinfecção

As placas contendo as raízes foram aleatoriamente divididas em três grupos experimentais e dois grupos controles, como mostra a Tabela 1.

TABELA 1. Divisão dos grupos experimentais e controles

<i>Grupos</i>	<i>N</i>	<i>Volume total</i>
GI- Endox Plus + SS	15	12mL
GII- NaOCl + MTAD	15	12mL
GIII- NaOCl + EDTA	15	12mL
GIV- Controle positivo (SS)	15	12mL
GV- Controle negativo	10	-

G, grupo; SS, solução salina; NaOCl, hipoclorito de sódio.

Em todos os grupos experimentais e no grupo controle positivo, os canais radiculares foram instrumentados até uma LK #45 no comprimento de trabalho com escalonamento até uma LK #60, utilizando o irrigante avaliado em cada troca de lima nos grupos correspondentes, com auxílio de uma seringa e agulha de irrigação descritas anteriormente.

No grupo I, foi utilizado 2mL de solução salina esterilizada após cada troca de lima durante a instrumentação e ao final foi usada a ponta verde (23mm de comprimento) do sistema Endox Plus de acordo com as especificações do fabricante (Apêndice A – Fig. A2), realizando três disparos em cada terço do canal radicular (cervical, médio e apical). O circuito foi fechado por meio do eletrodo neutro e o fio de cobre fixado no espécime (Apêndice A – Fig. A3). Ao final foi realizada irrigação com 2mL de solução salina.

No grupo II, foi usada a solução de NaOCl a 2,5% (Ciclo Farma indústria Química Ltda. EPP Serrana, SP, Brasil) e no final do preparo foi realizada a irrigação com 2mL de MTAD Biopure (Dentsply, Tulsa Dental, OK). O procedimento no grupo III foi similar ao GII, mas a irrigação final foi realizada com 2mL de solução de EDTA, por três minutos e agitado com a lima memória (LK #45), seguido de irrigação com solução salina estéril. No grupo IV, foi utilizado 2mL de solução salina estéril como nos grupos anteriores e o grupo V foi o controle negativo, sem preparo/irrigação dos canais radiculares.

Imediatamente após os procedimentos realizados, os canais radiculares nos grupos II e III foram preenchidos com tiosulfato de sódio a 1%, durante 2 minutos para neutralização do NaOCl. Os outros grupos foram preenchidos pelo mesmo período com solução salina. Em seguida, foi realizada a segunda coleta microbiológica de forma similar à coleta inicial usando dois cones de papel absorvente #45 (Miltex INC, USA) por espécime. Os canais radiculares foram preenchidos com solução salina estéril e as microplacas fechadas com os espécimes foram novamente incubadas a 37°C em condições de microaerofilia por

7 dias. Após este período, foi realizada a coleta final seguindo os mesmos procedimentos das coletas anteriores (inicial e pós-preparo).

Análise microbiológica

A análise microbiológica das três coletas foi realizada por meio da determinação do número de UFC/mL de *E. faecalis*. Foram realizadas diluições decimais seriadas, alíquotas de 20µL foram semeadas em triplicata em placas de Petri contendo meio TSA e incubadas em microaerofilia a 37°C por 48 horas (Apêndice A – Fig. A4).

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à transformação logarítmica na base 10 e analisados por meio do programa GraphPad Prism 3.0 (San Diego, CA, EUA). Para a comparação entre os grupos foram aplicados os testes estatísticos de ANOVA e de Tukey com nível de significância de 0,05. Para a comparação entre as coletas microbiológicas dentro de cada grupo foram utilizados os testes de ANOVA de medidas repetidas com nível de significância de 0,05.

RESULTADOS

Os resultados estão representados na Fig. 1. Todos os espécimes mostraram crescimento bacteriano após o período de contaminação, obtendo-se uma padronização com similar contagem de UFC/mL log, sem diferença

estatística entre os grupos ($P > 0.05$). Após os procedimentos de instrumentação, irrigação e desinfecção houve uma diminuição da quantidade de bactérias em todos os grupos, exceto no controle negativo, com diferença significativa ($P < 0.05$). Não houve diferenças estatísticas significantes entre os GI e GIV ($P > 0.05$) e os GII e GIII, não demonstraram crescimento bacteriano, com diferença em relação aos demais ($P < 0.05$).

Na coleta final, após 7 dias, houve um aumento na contagem bacteriana nos grupos I, II, III e IV, sem diferença significativa entre eles, mas havendo quando comparado com a coleta pós-preparo. A comparação entre as coletas em cada grupo mostra que no grupo controle negativo (GV) todas as coletas apresentaram similar contagem de bactérias, mostrando a viabilidade do *E. faecalis* durante todo o experimento.

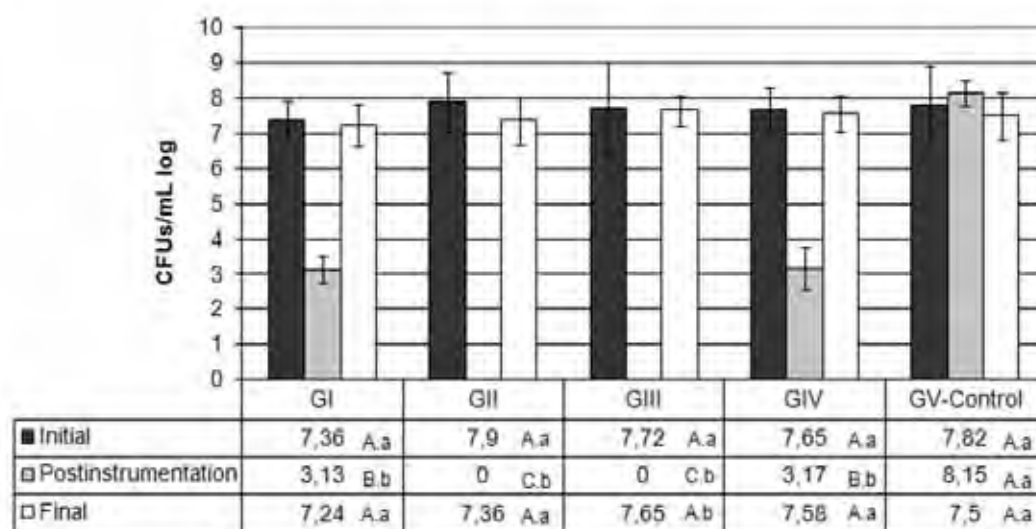


FIGURA 1. Comparação entre grupos na coleta inicial, pós-preparo e final e entre coletas em cada grupo (média de UFC/mL em log₁₀). Letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam valores de médias estatisticamente similares ($P > 0.05$).

DISCUSSÃO

A metodologia utilizada nesta pesquisa visa à reprodução clínica de infecção endodôntica do Sistema de Canais Radiculares (SCR), com período de contaminação por *E. faecalis*, durante 21 dias, como descrito em estudos prévios (Soares *et al.* 2010, Dornelles-Morgental *et al.* 2011). *E. faecalis* tem demonstrado habilidade de penetração nos túbulos dentinários em 21 dias de incubação (Stuart *et al.* 2006, Soares *et al.* 2010).

O sistema Endox Plus apresenta o mesmo princípio da versão anterior, baseado na corrente alternada de alta frequência (HFAC) visando vaporização dos tecidos do canal radicular e eliminação dos micro-organismos presentes no SCR por meio de umas pontas que transmitem os impulsos elétricos (Lendini *et al.* 2005, Virtej *et al.* 2007, Cassanelli *et al.* 2008, Karale *et al.* 2011).

Como alternativa ao NaOCl visando ampliar sua ação, o MTAD apresenta capacidade de remoção da *smear layer* (Singla *et al.* 2011), e poucos efeitos adversos sobre a dentina, além de atividade antimicrobiana (Beltz *et al.* 2003, Singla *et al.* 2011). Estudos afirmam que o MTAD associado ao NaOCl a 1,3% é eficaz na erradicação desta espécie bacteriana (Newberry *et al.* 2007, Shabahang *et al.* 2008). Outros estudos revelam que o MTAD não elimina esta bactéria do SCR e que a irrigação com NaOCl associado ao EDTA é igual ou mais eficaz (Kho & Baumgartner 2006, Johal *et al.* 2007). Um estudo (Dunavant *et al.* 2006)

demonstrou que NaOCl a 1% foi significativamente mais eficiente na eliminação de biofilme de *E. faecalis* do que o MTAD por meio do teste de contato direto.

Após a instrumentação dos canais radiculares ocorre uma eliminação da microbiota da luz do canal, mas pode ocorrer nova colonização pela permanência de micro-organismos nos túbulos dentinários não atingidos pela ação do preparo químico-mecânico (Siqueira *et al.* 2002, Molander *et al.* 2007). Assim, a realização da coleta final após 7 dias dos procedimentos, demonstrou aumento de *E. faecalis* após irrigação com NaOCl associado ao EDTA, em concordância com estudos já publicados (Oliveira *et al.* 2007, Dornelles-Morgental *et al.* 2011).

O presente estudo é o primeiro a avaliar o sistema Endox Plus. Poucos estudos compararam a versão anterior deste sistema com os protocolos de irrigação comumente utilizados. Karale *et al.* (2011) compararam *in vitro* a eficácia antibacteriana do sistema Endox, NaOCl a 3% e Clorexidina a 2% em canais radiculares de dentes humanos contaminados com *E. faecalis* após instrumentação. O período de incubação foi de 24 horas, sendo realizada a coleta imediatamente após irrigação. Os resultados mostraram que os três métodos foram eficazes, mas o NaOCl apresentou os melhores resultados. No presente estudo, o sistema Endox Plus mostrou pouca efetividade, sendo maior o período de contaminação usado e a avaliação realizada também na coleta após 7 dias permitiu recuperação de bactérias que persistiram nos túbulos dentinários.

Virtej *et al.* (2007) compararam a efetividade antibacteriana do sistema Endox, MTAD, NaOCl a 3% e *HealOzone* em canais radiculares contaminados

com uma microbiota mista, por meio da análise de três coletas: após 1 semana de contaminação, imediatamente após realizados os métodos de desinfecção e após uma semana. Após a segunda coleta, não houve diferenças estatisticamente significantes entre o grupos de NaOCl, MTAD e *HealOzone* que mostraram uma completa eliminação da microbiota. O sistema Endox foi significativamente menos eficaz. Após uma semana, o sistema Endox também mostrou o menor efeito antibacteriano, concordando com resultados do presente estudo.

CONCLUSÕES

O sistema Endox Plus apresentou menor efetividade antibacteriana quando comparado às soluções de NaOCl 2,5% /MTAD e NaOCl 2,5% /EDTA durante o preparo biomecânico. Todos os procedimentos avaliados permitiram a recuperação das bactérias após 7 dias, mostrando a permanência da infecção no sistema de canais radiculares.

REFERÊNCIAS

- Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-Garcia M, Baca P (2009). Enterococcus faecalis biofilms eradication by root canal irrigants. *Journal of Endodontics* **35**, 711-4.
- Beltz RE, Torabinejad M, Pouresmail M (2003). Quantitative analysis of the solubilizing action of MTAD, sodium hypochlorite, and EDTA on bovine pulp and dentin. *Journal of Endodontics* **29**, 334-7.
- Berutti E, Marini R, Angeretti A (1997). Penetration ability of different irrigants into dentinal tubules. *Journal of Endodontics* **23**, 725-7.
- Bystrom A, Sundqvist G (1981). Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scandinavian Journal of Dental Research* **89**, 321-8.
- Cassanelli C, Marchese A, Cagnacci S, Debbia EA (2008). Alteration of Membrane Permeability of Bacteria and Yeast by High Frequency Alternating Current (HFAC). *The Open Microbiology Journal* **2**, 32-7.
- Davis JM, Maki J, Bahcall JK (2007). An in vitro comparison of the antimicrobial effects of various endodontic medicaments on Enterococcus faecalis. *Journal of Endodontics* **33**, 567-9.
- Dornelles-Morgental R, Guerreiro-Tanomaru JM, de Faria-Junior NB, Hungaro-Duarte MA, Kuga MC, Tanomaru-Filho M (2011). Antibacterial efficacy of endodontic irrigating solutions and their combinations in root canals contaminated with Enterococcus faecalis. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontology* **112**, 396-400.

- Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL (2006). Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *Journal of Endodontics* **32**, 527-31.
- Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D (2002). Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *International Endodontics Journal* **35**, 221-8.
- Johal S, Baumgartner JC, Marshall JG (2007). Comparison of the antimicrobial efficacy of 1.3% NaOCl/BioPure MTAD to 5.25% NaOCl/15% EDTA for root canal irrigation. *Journal of Endodontics* **33**, 48-51.
- Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ (1965). The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulps in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology* **20**, 340-9.
- Karale R, Thakore A, Shetty V (2011). An evaluation of antibacterial efficacy of 3% sodium hypochlorite, high-frequency alternating current and 2% chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*: An in vitro study. *Journal of Conservative Dentistry* **14**, 2-5.
- Kho P, Baumgartner JC (2006). A comparison of the antimicrobial efficacy of NaOCl/Biopure MTAD versus NaOCl/EDTA against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics* **32**, 652-5.
- Kishen A, Sum CP, Mathew S, Lim CT (2008). Influence of irrigation regimens on the adherence of *Enterococcus faecalis* to root canal dentin. *Journal of Endodontics* **34**, 850-4.

- Lendini M, Alemanno E, Migliaretti G, Berutti E (2005). The effect of high-frequency electrical pulses on organic tissue in root canals. *International Endodontic Journal* **38**, 531-8.
- Lin LM, Skribner JE, Gaengler P (1992). Factors associated with endodontic treatment failures. *Journal of Endodontics* **18**, 625-7.
- Molander A, Warfvinge J, Reit C, Kvist T (2007). Clinical and radiographic evaluation of one- and two-visit endodontic treatment of asymptomatic necrotic teeth with apical periodontitis: a randomized clinical trial. *Journal of Endodontics* **33**, 1145-8.
- Moller AJ, Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE, Heyden G (1981). Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scandinavian Journal of Dental Research* **89**, 475-84.
- Newberry BM, Shabahang S, Johnson N, Aprecio RM, Torabinejad M (2007). The antimicrobial effect of biopure MTAD on eight strains of *Enterococcus faecalis*: an in vitro investigation. *Journal of Endodontics* **33**, 1352-4.
- Oliveira DP, Barbizam JV, Trope M, Teixeira FB (2007). In vitro antibacterial efficacy of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontology* **103**, 702-6.
- Prabhakar J, Senthilkumar M, Priya MS, Mahalakshmi K, Sehgal PK, Sukumaran VG (2010). Evaluation of antimicrobial efficacy of herbal alternatives (Triphala and green tea polyphenols), MTAD, and 5% sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilm formed on tooth substrate: an in vitro study. *Journal of Endodontics* **36**, 83-6.

- Shabahang S, Aslanyan J, Torabinejad M (2008). The substitution of chlorhexidine for doxycycline in MTAD: the antibacterial efficacy against a strain of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics* **34**, 288-90.
- Singla MG, Garg A, Gupta S (2011). MTAD in endodontics: an update review. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontology* **112**, e70-6.
- Siqueira JF, Jr., Lima KC, Magalhaes FA, Lopes HP, de Uzeda M (1999). Mechanical reduction of the bacterial population in the root canal by three instrumentation techniques. *Journal of Endodontics* **25**, 332-5.
- Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Santos SR, Lima KC, Magalhaes FA, de Uzeda M (2002). Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. *Journal of Endodontics* **28**, 181-4.
- Soares JA, Roque de Carvalho MA, Cunha Santos SM *et al.* (2010). Effectiveness of chemomechanical preparation with alternating use of sodium hypochlorite and EDTA in eliminating intracanal *Enterococcus faecalis* biofilm. *Journal of Endodontics* **36**, 894-8.
- Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB (2006). *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *Journal of Endodontics* **32**, 93-8.
- Torabinejad M, Khademi AA, Babagoli J *et al.* (2003a). A new solution for the removal of the smear layer. *Journal of Endodontics* **29**, 170-5.

- Torabinejad M, Shabahang S, Aprecio RM, Kettering JD (2003b). The antimicrobial effect of MTAD: an in vitro investigation. *Journal of Endodontics* **29**, 400-3.
- Torabinejad M, Shabahang S, Bahjri K (2005). Effect of MTAD on postoperative discomfort: a randomized clinical trial. *Journal of Endodontics* **31**, 171-6.
- Virtej A, MacKenzie CR, Raab WH, Pfeffer K, Barthel CR (2007). Determination of the performance of various root canal disinfection methods after in situ carriage. *Journal of Endodontics* **33**, 926-9.
- Zhang W, Torabinejad M, Li Y (2003). Evaluation of cytotoxicity of MTAD using the MTT-tetrazolium method. *Journal of Endodontics* **29**, 654-7.

4 CAPÍTULO II

ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE SOLUÇÕES IRRIGADORAS USADAS EM ENDODONTIA SOBRE BIOFILME DE *Enterococcus faecalis* *

*Artigo será submetido para publicação no periódico *Journal of Endodontics*

Resumo

Introdução: Diversas soluções irrigadoras tem sido avaliadas quanto à sua efetividade antibiofilme, para serem usadas como alternativa ao NaOCl, as quais utilizam associações de agentes antibacterianos, quelantes e detergentes. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana das soluções irrigadoras MTAD BioPure (Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK), Chlor-XTRA e CHX-Plus (Vista Dental Products, Racine, WI) pelo teste de contato direto sobre biofilme de *E. faecalis* formado sobre dentina bovina. **Métodos:** Foram obtidos segmentos de canal radicular de dentes bovinos e confeccionados 48 blocos de 5mm x 5mm x 0,7mm que foram esterilizados. Após formação de biofilme com cepa de *E. faecalis* (ATCC 29212) por 15 dias, foi realizado o teste por contato direto. Os tempos de contato foram de 1 e 3 minutos e foi empregado o soro como controle positivo. A análise microbiológica foi realizada por meio da

contagem das UFC/mL após cada um dos períodos de contato. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelos testes de ANOVA, Tukey e *t*-pareado ($p < 0,05$). **Resultados:** Chlor-XTRA foi capaz de eliminar biofilme de *E. faecalis* após 1 e 3 minutos de contato, com diferença estatística significativa entre os demais grupos ($p < 0,05$). MTAD Biopure não eliminou o biofilme em nenhum dos tempos de contato, sem diferença estatística quando comparado ao grupo controle ($p > 0,05$). CHX-Plus teve uma relativa atividade antibacteriana, com melhores resultados em comparação ao G1 (MTAD). Não houve diferença estatística entre os tempos de contato de 1 e 3 minutos em cada grupo ($p > 0,05$). **Conclusão:** MTAD Biopure possui a menor atividade antibacteriana quando comparado às soluções de Chlor-XTRA e CHX-Plus. Chlor-XTRA foi o irrigante que se mostrou eficaz sobre biofilme de *E. faecalis*.

Palavras-chave: Biofilme, *Enterococcus faecalis*, Chlor-XTRA, CHX-Plus, MTAD, soluções irrigadoras.

INTRODUÇÃO

Diversos estudos publicados na literatura tem identificado *E. faecalis* como a espécie bacteriana prevalente no sistema de canais radiculares (SCR) de dentes tratados com infecção persistente com lesão periapical (1, 2). A capacidade deste micro-organismo de invadir os túbulos dentinários, de sobreviver em ambiente desfavorável com escassez de nutrientes e resistir à ação dos irrigantes e curativos de demora, faz com que a erradicação desta espécie seja muito difícil de ser realizada (2-5).

E. faecalis possui uma grande facilidade para formar biofilme (6, 7), o que facilita a coagregação com outras espécies bacterianas, tornando mais difícil sua remoção e desta maneira se protegendo dos agentes antimicrobianos (4, 8, 9). O hipoclorito de sódio (NaOCl) é o irrigante mais utilizado na Endodontia e sua atividade antimicrobiana tem sido demonstrada sobre bactérias planctônicas e biofilme (33). No entanto, têm surgido outras soluções irrigadoras como uma alternativa ao uso do NaOCl, que utilizam associações de agentes antibacterianos, quelantes e detergentes (10, 11).

MTAD BioPure (Dentsply, Tulsa Dental, OK) é um irrigante de canais radiculares que foi introduzido por Torabinajead & Johnson em 2003 (12). É composto por uma mistura de doxiciclina a 3%, ácido cítrico a 4.25% e um detergente (Tween 80) (13, 14). Diversos estudos publicados têm demonstrado sua ação antibacteriana, sendo efetiva na eliminação de *E. faecalis*, tanto em forma planctônica como em biofilme (14-16).

CHX-Plus (Vista Dental Products, Racine, WI) é um produto relativamente novo utilizado na irrigação dos canais radiculares. É composto por solução de gluconato de clorexidina a 2% associada a um detergente não iônico (Triton-X[®]), com o objetivo de reduzir a tensão superficial e assim facilitar sua penetração nos túbulos dentinários (10, 11, 17). Chlor-XTRA (Vista Dental Products, Racine, WI) contém na sua formulação NaOCl a 5,8% adicionado também com um agente modificador da superfície (Triton-X[®]). São poucos os estudos publicados sobre estas soluções irrigadoras, demonstrando uma superior efetividade antibacteriana quando comparados com as soluções de NaOCl a 6% e CHX a 2% sobre biofilme de *E. faecalis* (2) e de outras espécies microbianas (9, 17), avaliadas por meio do teste de contato direto e analisadas em MEV, microscopia confocal a laser ou pela contagem de UFC/mL.

A ação antibacteriana de irrigantes relativamente novos merecem mais estudos, os quais se apresentam como uma alternativa à utilização do NaOCl, ou associado a um detergente, no caso específico do Chlor-XTRA e que foram introduzidos com o intuito de melhorar a limpeza e desinfecção do SCR. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana das soluções irrigadoras MTAD BioPure, Chlor-XTRA e CHX-Plus pelo teste de contato direto sobre biofilme de *E. faecalis* em dentina bovina.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 16 dentes bovinos (incisivos centrais) com comprimento variando entre 23 e 25mm. As coroas foram removidas na junção cimento-esmalte. As raízes foram cortadas longitudinalmente em segmentos de 0,7mm de espessura e a superfície do canal radicular foi planificada. Em seguida, os segmentos foram cortados para obtenção de blocos de 5mm x 5mm x 0,7mm (largura x comprimento x espessura). Todos esses cortes foram realizados em máquina de corte de precisão (Isomet 1000, Buelher Ltda., Lake Bluff, Il, EUA). Os 48 corpos-de-prova foram colocados em tubo de ensaio contendo água destilada e levados a uma autoclave para esterilização a 121°C por 20 minutos.

Formação do biofilme no substrato de dentina bovina

Todos os procedimentos e a manipulação dos corpos-de-prova foram realizados dentro de uma câmara de fluxo laminar (VecoFlow Ltda, Campinas, SP, Brasil). Para a formação do biofilme foi empregada uma cepa padrão de *E. faecalis* (ATCC 29212) reativada em caldo de BHI estéril e mantida em estufa a 37°C, durante 12 horas. Após este período, a densidade óptica do meio foi medida em espectrofotômetro (Modelo 600 Plus, Femto, SP, Brasil), com comprimento de onda de 600nm, e a densidade celular foi de $3,2 \times 10^7$ UFC/mL. Em seguida, uma alíquota equivalente a 1% do volume utilizado para contaminação dos espécimes foi adicionada ao meio de cultura estéril, realizando homogeneização e posteriormente a contaminação dos espécimes com 2mL do inóculo, em uma placa

de cultura celular de 24 poços. Uma das faces foi marcada com um traço de lápis e esta ficou voltada para a superfície da placa, enquanto a face não marcada ficou em contato com o biofilme em crescimento (Apêndice A – Fig. B1). As placas foram colocadas em uma incubadora de bancada com agitação orbital em ambiente microaerófilo a 37°C durante 15 dias e o meio de cultura BHI de cada espécime foi trocado três vezes por semana proporcionando nutrientes para as células bacterianas. A confirmação da formação de biofilme da cepa de *E. faecalis* foi feita por meio da coloração de Gram e morfologia das colônias.

Foram utilizados 48 corpos-de-prova, divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais e um grupo controle (n=12), 6 corpos-de-prova para cada tempo de contato (1 e 3 minutos), segundo [Tabela 1](#).

TABELA 1. Divisão dos grupos experimentais e controle

<i>Grupos</i>	<i>n</i>	<i>1 min.</i>	<i>3 min.</i>	<i>Neutralizante</i>
G1- MTAD	12	06	06	Tiosulfato de sódio a 1%
G2- Chlor-XTRA	12	06	06	Tiosulfato de sódio a 1%
G3- CHX-Plus	12	06	06	Lecitina 0,7% + Tween 80 a 1%
G4- Controle (SS)	12	06	06	SS a 0,85%

G, grupo; SS, solução salina; n, número de corpos-de-prova.

Os corpos-de-prova com o biofilme formado foram expostos às soluções irrigadoras avaliadas (Apêndice B – Fig. B2) em uma placa de cultura de 24 poços esterilizada. O grupo controle, com solução salina, foi usado para comparação dos resultados. Em seguida, os corpos-de-prova com o biofilme remanescente após o

contato com as soluções irrigadoras foram lavados com solução fisiológica e colocados em tubos contendo pérolas de vidro e 1mL de solução neutralizante correspondente (Tabela 1) e posteriormente, foram agitadas para suspensão das bactérias.

A avaliação foi realizada por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) para cada período. Foram realizadas semeaduras em triplicata das diluições decimais seriadas em placas de Petri contendo o meio de cultura m-Enterococcus Ágar (Difco Laboratories, Becton Dickinson and Company, USA). As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. A leitura dos resultados de cada placa resultou da média do número de UFC das áreas de crescimento bacteriano (Apêndice B – Fig. B3). A partir destas médias foi calculado o número de UFC/mL após cada um dos tempos de contato entre os irrigantes e os corpos-de-prova com biofilme.

Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelos testes de ANOVA e Tukey para a comparação entre as soluções irrigadoras e o teste *t* - pareado para comparação entre os tempos de contato em cada grupo. O critério para a significância estatística foi definido como $p < 0,05$.

RESULTADOS

Os resultados estão representados na [Figura 1](#). No G2, Chlor-XTRA foi capaz de eliminar *E. faecalis* após 1 e 3 minutos de contato, com diferença estatística significativa entre os demais grupos ($p < 0,05$). MTAD Biopure (G1) não eliminou esta cepa bacteriana em nenhum dos tempos de contato, sem diferença estatística quando comparado ao grupo controle (G4) ($p > 0,05$). No G3, CHX-Plus teve uma relativa atividade antibacteriana, com melhores resultados em comparação ao G1, houve diferença estatística significativa com o G1 e o grupo controle nos dois tempos de contato ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística entre os tempos de contato de 1 e 3 minutos em cada grupo ($p > 0,05$) ([Fig 1](#)).

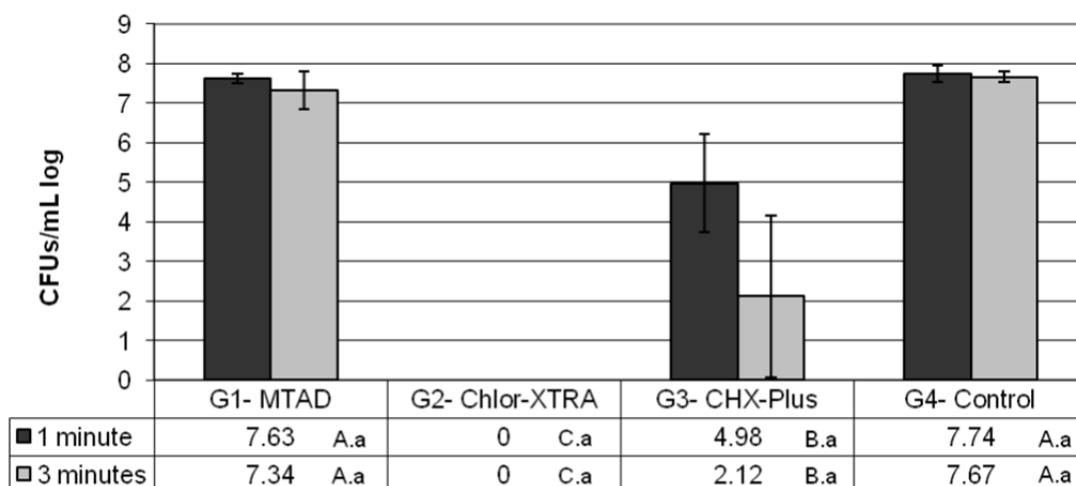


FIGURA 1. Comparação entre grupos nos tempos de contato de 1 e 3 minutos e entre os tempos de contato em cada grupo (média de UFC/mL em log₁₀). Letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam valores de médias estatisticamente similares ($p > 0,05$).

DISCUSSÃO

O teste antibacteriano de contato direto sobre biofilme é um método quantitativo e reprodutível que simula o contato do micro-organismo avaliado com as soluções irrigadoras no sistema de canais radiculares (SCR). Por meio deste teste é possível quantificar o efeito bactericida dos irrigantes e o número de bactérias sobreviventes após cada tempo de contato (18-20). A utilização de agentes neutralizantes específicos é de importância para poder inibir a ação do irrigante e não ser transferido ao meio de cultura, como realizado em estudos prévios (19-21). Estudos que induzem a formação de biofilme utilizam diversos tipos de substratos, tais como: dentina humana (4, 16, 22), dentina bovina (20), membranas de acetato de celulose (23) e hidroxiapatita (9, 17, 24). No presente estudo, foi utilizada dentina bovina como substrato para formação do biofilme, sendo que este modelo experimental tem demonstrado ser eficaz porque permite uma padronização das amostras e pode ser reproduzível (20). Além disso, os dentes bovinos são obtidos facilmente e a sua morfologia e densidade são similares aos dentes humanos, assim como o tamanho dos túbulos dentinários (25).

Diversos estudos utilizando o teste de contato direto sobre biofilme para avaliação antibacteriana de soluções irrigadoras foram publicados na literatura nos últimos anos, com uma ampla variedade de metodologias, que incluem diferentes

substratos, tempo de incubação e os micro-organismos usados, permitindo desta maneira uma correta execução dos métodos.

Retamozo et al. (20) determinaram o tempo de contato e a concentração mínima necessária de NaOCl para eliminar a infecção de cilindros de dentina bovina contaminados com *E. faecalis* (ATCC 4082) e incubados por 3 semanas. Foram utilizados 450 cilindros de dentina (5mm de diâmetro e 4mm de altura) com uma luz de 2-3mm, o cimento e a pré-dentina foram removidos. Os espécimes foram divididos em três grupos (n=150) de acordo com a concentração do NaOCl (1,3%, 2,5% ou 5,25%) e os tempos de contato foram de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 minutos, totalizando 24 subgrupos (n=15) e dois controles. No controle positivo foi usada água destilada (n=15) e no controle negativo os espécimes estavam autoclavados (n=15). Foi utilizado o tiosulfato de sódio a 5% para neutralizar a ação do NaOCl antes de obter as amostras para análise microbiológica. Cada amostra foi incubada em 2mL de caldo de BHI por 72 horas. Todas as amostras que apresentaram turbidez do meio de cultura foram semeadas em placas de Petri com BHI onde foi confirmada a presença da bactéria, por meio da análise morfológica das colônias e da coloração de Gram (*E. faecalis*). O grupo que apresentou a maior atividade antibacteriana foi o NaOCl a 5,25% no período de 40 minutos, entretanto as concentrações de 1,3% e 2,5% no mesmo período de contato não foi efetivo na eliminação desta cepa. Os autores concluíram que é necessário uma alta concentração e um tempo de exposição prolongado de NaOCl para a eliminação de *E. faecalis* da dentina contaminada.

Prabhakar et al. (16) avaliaram a atividade antibacteriana de *Triphala* (formulação à base de uma mistura de ervas medicinais), polifenóis do chá verde (GTP), MTAD e NaOCl a 5% sobre biofilme de *E. faecalis* (ATCC 29212) induzido em dentina humana, num tempo de contato de 10 minutos. Foram usadas as raízes de 75 pré-molares inferiores unirradiculados padronizadas em 8mm, que foram instrumentadas até a lima F3 do sistema ProTaper. Posteriormente, todos os espécimes foram seccionados verticalmente, a superfície côncava foi planificada para permitir a colocação nos poços da placa de cultura celular com a superfície do canal radicular exposta para a formação do biofilme. Os espécimes foram divididos em 5 grupos (n=15): G1- *Triphala*, G2- GTP, G3- MTAD, G4- NaOCl a 5% e G5- solução salina. Em seguida, os espécimes foram colocados na placa de cultura celular de 24 poços e submetidos à esterilização em raios gama. Os poços, com os espécimes foram inoculados com 2mL da suspensão bacteriana e incubados a 37°C, o meio de cultura foi substituído a cada dois dias. Ao final da terceira semana, todos os grupos foram tratados durante 10 minutos pelas substâncias avaliadas e depois foi removido o biofilme remanescente dos espécimes por grupo (n=5) e inoculados em placas de Petri com ágar BHI que foram incubadas a 37°C por 24 horas para posterior análise qualitativa e quantitativa por meio do método de diluições seriadas e contagem das UFCs/mL. Os mesmos procedimentos foram realizados para todos os grupos ao final da sexta semana, onde foi avaliado o restante dos espécimes (n=10 por grupo) em forma qualitativa e quantitativa. Os resultados obtidos mostraram que NaOCl a 5% apresentou maior atividade antibacteriana sobre biofilme tanto em 3 como em 6

semanas, entretanto as outras substâncias, *Triphala*, GTP e MTAD apenas mostraram atividade antibacteriana significativa sobre o biofilme de 3 semanas.

A metodologia aplicada neste estudo é muito similar a utilizada pelo estudo de Prabhakar et al. (16). Foi usada a mesma cepa padrão de *E. faecalis* (ATCC 29212) e os espécimes foram colocados em placas de cultura celular, tanto para induzir a formação do biofilme como para o teste de contato direto com as soluções avaliadas. O meio de cultura esterilizado foi substituído para evitar a falta de nutrientes. No entanto, uma diferença é o substrato utilizado para a formação do biofilme. Neste estudo foi usada a dentina bovina por ser um modelo experimental também consagrado na literatura e pela facilidade de obtenção dos dentes. O tempo para a formação de biofilme foi de 15 dias, permitindo um biofilme consistente para os períodos de contato de 1 e 3 minutos com as substâncias a serem avaliadas, sendo incluído também um grupo controle com solução salina para futuras comparações.

Em estudo recente, Ordinola-Zapata et al. (21) avaliaram a atividade antibacteriana de diferentes soluções irrigadoras, entre elas, NaOCl a 1% e CHX a 2%, sendo o tempo de contato de 5 minutos e a análise foi realizada por meio de microscopia confocal à laser. Concluíram que o NaOCl a 1% mostrou-se mais eficaz removendo 90% do volume total do biofilme.

Os resultados obtidos neste estudo concordam com os achados de Dunavant et al. (18) e Williamson et al. (2), os quais concluíram que MTAD não foi eficaz contra biofilme de *E. faecalis*, quando comparado à solução de NaOCl a

1% e 6% após 1 minuto de contato direto (18) e que Chlor-XTRA foi significativamente superior à CHX-Plus, tanto em 1 e 3 minutos de tempo de contato (2). No entanto, discordamos com os achados de Newberry et al. (15), que demonstraram que MTAD inibe o crescimento bacteriano sobre sete cepas de *E. faecalis* quando foram expostos durante 5 minutos.

MTAD Biopure, que não foi significativamente eficaz na eliminação de *E. faecalis*, é uma mistura de doxiciclina, ácido cítrico e um detergente, contudo nenhuma dessas substâncias tem ação bactericida. A doxiciclina é um antibiótico bacteriostático, que impede a multiplicação das bactérias susceptíveis e desta maneira não seria eficaz como solução irrigadora se usada isoladamente, sabendo que esta espécie bacteriana possui uma resistência a uma grande variedade de antimicrobianos (18). Por outro lado, Chlor-XTRA foi a substância que mostrou os melhores resultados, removendo completamente o biofilme de *E. faecalis* nos tempos de contato avaliados. Sendo uma associação de NaOCl a 5,8% e um agente surfactante, esta solução irrigadora pode ser eficaz no tratamento endodôntico pelas conhecidas propriedades do NaOCl em diferentes concentrações (26-29), de igual maneira tem sido publicados inúmeros estudos onde revelam a atividade antimicrobiana do NaOCl sobre biofilmes usando como substrato dentina humana e bovina (16, 21, 26, 30, 31). A adição de um agente surfactante diminui a tensão superficial da solução e desta forma melhora a capacidade do NaOCl em difundir na dentina e assim aumentar sua ação antimicrobiana dentro dos túbulos dentinários (10), além disso, menciona-se que

os surfactantes são eficazes em desagregar o biofilme tendo uma propriedade bactericida e fungicida (18).

O modelo experimental utilizado neste estudo foi eficiente na determinação da atividade antibiofilme in vitro das soluções irrigadoras avaliadas sobre biofilme de *E. faecalis* em dentina bovina. Em conclusão, os resultados mostraram que MTAD Biopure apresenta menor atividade antibacteriana quando comparado às soluções de Chlor-XTRA e CHX-Plus. Chlor-XTRA foi o único irrigante que mostrou ação efetiva na eliminação de células bacterianas do biofilme de *E. faecalis*.

REFERÊNCIAS

1. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 2002;35:221-228.
2. Williamson AE, Cardon JW, Drake DR. Antimicrobial susceptibility of monoculture biofilms of a clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2009;35:95-97.
3. 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;32:93-98.

4. Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, Gonzalez-Rodriguez MP, Ferrer-Luque CM. Residual and antimicrobial activity of final irrigation protocols on *Enterococcus faecalis* biofilm in dentin. J Endod 2011;37:363-366.
5. Love RM. *Enterococcus faecalis*--a mechanism for its role in endodontic failure. Int Endod J 2001;34:399-405.
6. Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-Garcia M, Baca P. *Enterococcus faecalis* biofilms eradication by root canal irrigants. J Endod 2009;35:711-714.
7. Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K. An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. Int Endod J 2001;34:300-307.
8. Johnson EM, Flannagan SE, Sedgley CM. Coaggregation interactions between oral and endodontic *Enterococcus faecalis* and bacterial species isolated from persistent apical periodontitis. J Endod 2006;32:946-950.
9. Shen Y, Stojicic S, Qian W, Olsen I, Haapasalo M. The synergistic antimicrobial effect by mechanical agitation and two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria. J Endod 2010;36:100-104.
10. Palazzi F, Morra M, Mohammadi Z, Grandini S, Giardino L. Comparison of the surface tension of 5.25% sodium hypochlorite solution with three new sodium hypochlorite-based endodontic irrigants. Int Endod J 2011.
11. Shen Y, Qian W, Chung C, Olsen I, Haapasalo M. Evaluation of the effect of two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria in vitro: a three-dimensional quantitative analysis. Journal of Endodontics 2009;35:981-985.

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;29:170-175.
13. Singla MG, Garg A, Gupta S. MTAD in endodontics: an update review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;112:e70-76.
14. Torabinejad M, Shabahang S, Aprecio RM, Kettering JD. The antimicrobial effect of MTAD: an in vitro investigation. *J Endod* 2003;29:400-403.
15. Newberry BM, Shabahang S, Johnson N, Aprecio RM, Torabinejad M. The antimicrobial effect of biopure MTAD on eight strains of *Enterococcus faecalis*: an in vitro investigation. *J Endod* 2007;33:1352-1354.
16. Prabhakar J, Senthilkumar M, Priya MS, Mahalakshmi K, Sehgal PK, Sukumaran VG. Evaluation of antimicrobial efficacy of herbal alternatives (Triphala and green tea polyphenols), MTAD, and 5% sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilm formed on tooth substrate: an in vitro study. *J Endod* 2010;36:83-86.
17. Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. *J Endod* 2011;37:657-661.
18. Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod* 2006;32:527-531.
19. Guerreiro-Tanomaru JM, Morgental RD, Flumignan DL, Gasparini F, Oliveira JE, Tanomaru-Filho M. Evaluation of pH, available chlorine content, and

- antibacterial activity of endodontic irrigants and their combinations against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;112:132-135.
20. Retamozo B, Shabahang S, Johnson N, Aprecio RM, Torabinejad M. Minimum contact time and concentration of sodium hypochlorite required to eliminate *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2010;36:520-523.
21. Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Cavenago B, Graeff MS, Gomes de Moraes I, Marciano M, et al. Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. *Int Endod J* 2011.
22. Kishen A, Sum CP, Mathew S, Lim CT. Influence of irrigation regimens on the adherence of *Enterococcus faecalis* to root canal dentin. *J Endod* 2008;34:850-854.
23. Larsen T. Susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* in biofilms to amoxicillin, doxycycline and metronidazole. *Oral Microbiol Immunol* 2002;17:267-271.
24. 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;43:528-535.
25. Hals E, Cato Olsen H. Scanning electron and incident light microscopy of giant tubules in red deer dentin. *Scand J Dent Res* 1984;92:269-274.
26. Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. *J Endod* 2006;32:434-437.

27. Estrela CR, Estrela C, Reis C, Bammann LL, Pecora JD. Control of microorganisms in vitro by endodontic irrigants. *Braz Dent J* 2003;14:187-192.
28. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod* 2006;32:389-398.
29. Camps J, Pommel L, Aubut V, Verhille B, Satoshi F, Lascola B, et al. Shelf life, dissolving action, and antibacterial activity of a neutralized 2.5% sodium hypochlorite solution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108:e66-73.
30. 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;33:126-131.
31. Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, 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;34:424-428.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A etiologia da patologia pulpar e a sua repercussão nos tecidos periapicais é a presença de bactérias no sistema de canais radiculares (SCR)⁸. O sucesso do tratamento endodôntico depende da eliminação ou redução significativa de micro-organismos^{5, 11}.

Diversos estudos tem associado *E. faecalis* com o fracasso do tratamento de canais radiculares^{6, 20}. Sua prevalência oscila entre 44 e 77% dos fracassos, atribuindo sua virulência à capacidade de invadir os túbulos dentinários e sobreviver em períodos prolongados de ausência de nutrientes^{4, 6, 20}.

A forma de colonização desta espécie é em biofilme, o que torna difícil sua erradicação, já que é sabido que isto facilita sua coagregação com outras espécies bacterianas e por tanto sua resistência aos irrigantes e medicamentos intracanalais^{1, 7}. O hipoclorito de sódio (NaOCl) é o irrigante mais utilizado na terapia endodôntica, demonstrando em diversos estudos sua ação antimicrobiana contra bactérias tanto em forma planctônica como sobre biofilme¹.

No entanto tem surgido outros métodos de desinfecção e soluções irrigadoras como alternativas ao emprego de NaOCl. O sistema Endox Plus (Anfratron Technologies GmbH, Wasserburg, Germany) é uma nova versão do modelo anterior do sistema Endox (Lysis Srl, Nova Milanese, Itália) que foi

desenvolvido com o objetivo de atuar na desinfecção do SCR. Seu funcionamento está baseado na corrente de alta frequência alternada².

MTAD BioPure (Dentsply, Tulsa Dental, OK) é um irrigante usado em canais radiculares que foi desenvolvido na Universidade de Loma Linda Califórnia - USA por Torabinajead e Johnson²¹ em 2003. É uma associação de um antibiótico (doxiciclina a 3%), ácido cítrico a 4.25% e um detergente (Tween 80)^{18, 22}. Diversos estudos publicados tem demonstrado sua ação antibacteriana, mostrando efetividade na eliminação de *E. faecalis*, tanto em forma planctônica como em biofilme^{10, 12, 22}.

CHX-Plus (Vista Dental Products, Racine, WI) é uma substância usada em Endodontia como solução irrigadora de canais radiculares. Está composta por gluconato de clorexidina (CHX) a 2% em solução associada a um surfactante não iônico (Triton-X®), com o objetivo de diminuir a tensão superficial facilitando assim sua penetração nos túbulos dentinários^{11, 15, 16}.

Chlor-XTRA (Vista Dental Products, Racine, WI) é um irrigante de canais radiculares que contem na sua formulação a solução de NaOCl a 5,8% associado a um agente modificador da superfície (Triton-X®), em forma similar como no CHX-Plus.

Existem poucos estudos publicados sobre estas novas soluções irrigadoras, demonstrando uma superior efetividade antibacteriana quando comparados com as soluções de NaOCl e CHX a 2% sobre biofilme de *E. faecalis*²³ e de outras espécies microbianas^{17, 18}, avaliada por meio do teste de

contato direto e analisadas em MEV, microscopia confocal a laser ou pela contagem de UFCs/mL.

No primeiro capítulo deste estudo, o Sistema Endox Plus apresentou a menor efetividade antibacteriana quando foi comparado com as soluções de NaOCl a 2,5% associado a MTAD ou EDTA e todos os procedimentos avaliados permitiram a recuperação das bactérias após 7 dias, demonstrando a permanência da infecção no SCR.

No segundo capítulo, os resultados obtidos concordam com os achados de outros autores, quem concluíram que MTAD não foi eficaz contra biofilme de *E. faecalis* quando comparado à solução de NaOCl, após 1 minuto de contato direto⁵ e que Chlor-XTRA foi significativamente superior à CHX-Plus, tanto em 1 e 3 minutos de tempo de contato²³. Não entanto, existem trabalhos que discordam com nossos achados, demonstrando que MTAD inibe o crescimento bacteriano sobre outras cepas de *E. faecalis* quando foram expostos durante 5 minutos¹⁰.

A adição de um agente surfactante diminui a tensão superficial da solução e desta forma melhora a capacidade do NaOCl em penetrar na dentina e assim aumentar sua ação antimicrobiana dentro dos túbulos dentinários¹¹, além disso, se menciona que os surfactantes são eficazes em desagregar o biofilme tendo uma propriedade bactericida e fungicida⁵.

São necessárias mais pesquisas demonstrando a atividade antimicrobiana das diferentes soluciones irrigadoras avaliadas, principalmente das

associações que procuram melhorar as propriedades das soluções irrigadoras comumente utilizadas em Endodontia, como é o caso do Chlor-XTRA e CHX-Plus que apresentam poucos estudos na literatura, da mesma maneira do sistema Endox Plus.

REFERÊNCIAS*

1. Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-Garcia M, Baca P. *Enterococcus faecalis* biofilms eradication by root canal irrigants. J Endod. 2009; 35: 711-4.
2. Cassanelli C, Marchese A, Cagnacci S, Debbia EA. Alteration of membrane permeability of bacteria and yeast by high frequency alternating current (HFAC). Open Microbiol J. 2008; 2: 32-7.
3. Davis JM, Maki J, Bahcall JK. An in vitro comparison of the antimicrobial effects of various endodontic medicaments on *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2007; 33: 567-9.
4. Dornelles-Morgental R, Guerreiro-Tanomaru JM, de Faria-Junior NB, Hungaro-Duarte MA, Kuga MC, Tanomaru-Filho M. Antibacterial efficacy of endodontic irrigating solutions and their combinations in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011; 112: 396-400.

*De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

5. 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.
6. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. Int Endod J. 2002; 35: 221-8.
7. Johnson EM, Flannagan SE, Sedgley CM. Coaggregation interactions between oral and endodontic *Enterococcus faecalis* and bacterial species isolated from persistent apical periodontitis. J Endod. 2006; 32: 946-50.
8. 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.
9. Lendini M, Alemanno E, Migliaretti G, Berutti E. The effect of high-frequency electrical pulses on organic tissue in root canals. Int Endod J. 2005; 38: 531-8.

10. Newberry BM, Shabahang S, Johnson N, Aprecio RM, Torabinejad M. The antimicrobial effect of biopure MTAD on eight strains of *Enterococcus faecalis*: an in vitro investigation. J Endod. 2007; 33: 1352-4.
11. Palazzi F, Morra M, Mohammadi Z, Grandini S, Giardino L. Comparison of the surface tension of 5.25% sodium hypochlorite solution with three new sodium hypochlorite-based endodontic irrigants. Int Endod J. 2012; 45: 129-135.
12. Prabhakar J, Senthilkumar M, Priya MS, Mahalakshmi K, Sehgal PK, Sukumaran VG. Evaluation of antimicrobial efficacy of herbal alternatives (Triphala and green tea polyphenols), MTAD, and 5% sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilm formed on tooth substrate: an in vitro study. J Endod. 2010; 36: 83-6.
13. Retamozo B, Shabahang S, Johnson N, Aprecio RM, Torabinejad M. Minimum contact time and concentration of sodium hypochlorite required to eliminate *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2010; 36: 520-3.
14. Shabahang S, Aslanyan J, Torabinejad M. The substitution of chlorhexidine for doxycycline in MTAD: the antibacterial efficacy against a strain of *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2008; 34: 288-90.

15. Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. *J Endod.* 2011; 37: 657-61.
16. Shen Y, Qian W, Chung C, Olsen I, Haapasalo M. Evaluation of the effect of two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria in vitro: a three-dimensional quantitative analysis. *J Endod.* 2009; 35: 981-5.
17. Shen Y, Stojicic S, Qian W, Olsen I, Haapasalo M. The synergistic antimicrobial effect by mechanical agitation and two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria. *J Endod.* 2010; 36: 100-4.
18. Singla MG, Garg A, Gupta S. MTAD in endodontics: an update review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 112: e70-6.
19. Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K. An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *Int Endod J.* 2001; 34: 300-7.
20. 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.

21. 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.
22. Torabinejad M, Shabahang S, Aprecio RM, Kettering JD. The antimicrobial effect of MTAD: an in vitro investigation. J Endod. 2003; 29: 400-3.
23. Williamson AE, Cardon JW, Drake DR. Antimicrobial susceptibility of monoculture biofilms of a clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2009; 35: 95-7.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Figuras do Capítulo 1



FIGURA A1- Raízes vedadas e impermeabilizadas incluídas em placa de cultura celular



FIGURA A2 - Sistema Endox Plus (Anfratron Technologies GmbH, Germany)

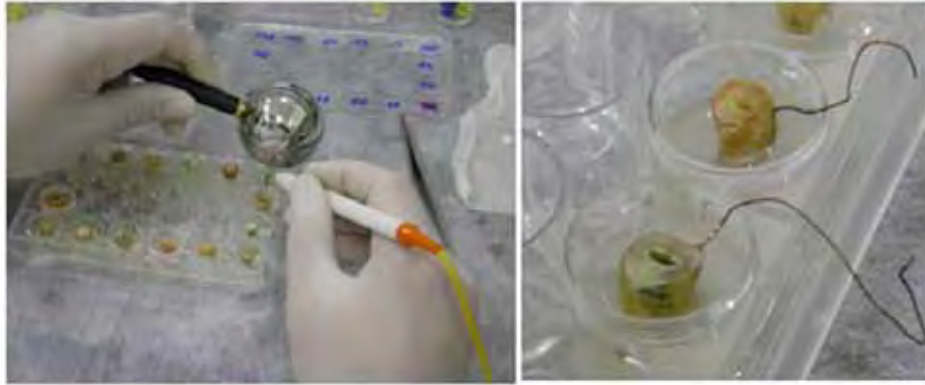


FIGURA A3 - Dispositivo elaborado para o funcionamento do Sistema Endox Plus

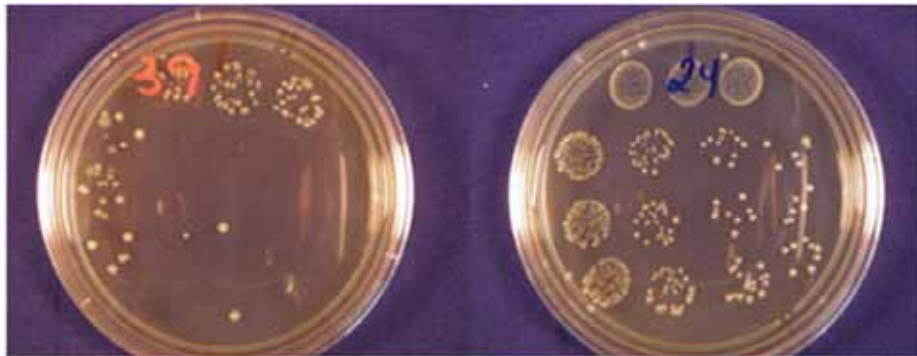


FIGURA A4 – Crescimento bacteriano em placas de Petri

APÊNDICE B – Figuras do Capítulo 2

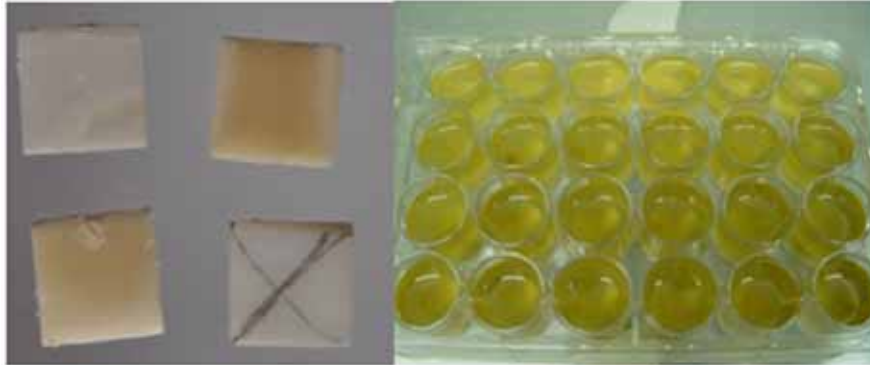


FIGURA B1 – Corpos-de-prova em placa de cultura celular



FIGURA B2 – Soluções irrigadoras avaliadas



FIGURA B3 – Crescimento bacteriano em placas de Petri

ANEXO

Anexo A - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (Protocolo nº 18/11)



Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 13 de fevereiro de 2012

ARTURO JAVIER ARANDA GARCIA