

**UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA**

RENATA DORNELLES MORGENTAL

**AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA
DE SOLUÇÕES IRRIGADORAS ENDODÔNTICAS E ASSOCIAÇÕES**

ARARAQUARA

2010

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

RENATA DORNELLES MORGENTAL

AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA
DE SOLUÇÕES IRRIGADORAS ENDODÔNTICAS E ASSOCIAÇÕES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

ARARAQUARA

2010

Morgental, Renata Dornelles

Avaliação físico-química e da atividade antibacteriana de soluções irrigadoras endodônticas e associações / Renata Dornelles Morgental. – Araraquara: [s.n.], 2010.

78 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora : Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

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

RENATA DORNELLES MORGENTAL

**AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA
DE SOLUÇÕES IRRIGADORAS ENDODÔNTICAS E ASSOCIAÇÕES**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

2º Examinador: Prof. Dr. Evandro Watanabe

3º Examinador: Prof. Dr. Milton Carlos Kuga

Araraquara, 25 de março de 2010.

DADOS CURRICULARES

RENATA DORNELLES MORGENTAL

NASCIMENTO	09.05.1980 – São Paulo/SP
FILIAÇÃO	Antonio Morgental Sonia Regina Dornelles Morgental
1998 – 2002	Curso de Graduação em Odontologia na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)
2002 – 2003	Curso de Aperfeiçoamento em Endodontia na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
2005 – 2007	Curso de Especialização em Endodontia na Associação Brasileira de Odontologia Seção Rio Grande do Sul (ABO/RS)
2008 – 2010	Curso de Pós-Graduação em Endodontia, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOAr/UNESP)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por me acompanhar nesta jornada, sempre me iluminando e protegendo.

À minha família, pelo apoio e amor incondicional. Agradeço pelo incentivo, pelos conselhos, enfim, por serem meu porto seguro e exemplo de vida.

Ao meu namorado, Rafael, pelo amor, paciência e tolerância. Agradeço por me fazer sorrir mesmo nos momentos difíceis e apesar da distância.

À minha orientadora, Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru, pela paciência, confiança e orientação durante a realização deste trabalho. Obrigada pelos ensinamentos e disponibilidade ao longo destes dois anos de convivência.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), na pessoa de seu Magnífico Reitor Prof. Dr. Herman Jacobus Cornelis Voorwald e vice-reitor Prof. Dr. Julio Cezar Durigan.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, na pessoa de seu Diretor Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla e vice-diretora Profa. Dra. Andréia Affonso Barreto Montandon.

Ao Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representado pelo Chefe de Departamento Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Júnior e vice-chefe Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Endodontia, coordenado pelo Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho, o qual colaborou imensamente na realização deste trabalho. Agradeço pelo seu exemplo de amor e dedicação à pesquisa endodôntica.

Aos demais docentes da Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert, Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho, Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo e Prof. Dr. Roberto Miranda Esberard, pela convivência agradável e contribuição à minha formação profissional durante as aulas, seminários e clínicas.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. Todos sempre foram educados, solícitos e atenciosos.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, especialmente a Sra. Mara Cândida Munhoz do Amaral, pela ajuda e disposição em todos os momentos que necessitei.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, pelo auxílio nas pesquisas bibliográficas e revisões da presente dissertação.

Aos colegas de Pós-Graduação (Nível Mestrado), Ana Carolina, Ana Livia, Carolina, Geraldine, Naiana, Paula, Roberta e Santiago, pela amizade, companheirismo e ajuda durante esta caminhada. Cada um de vocês, com suas peculiaridades, conquistaram um lugar especial em meu coração.

Aos colegas de Pós-Graduação (Nível Doutorado), Adriana, Arnaldo, Érica, Guilherme, Louise, Norberto, Rodrigo, Regina e Sérgio, pela amizade, atenção e auxílio no período em que convivemos.

Aos alunos de Pós-Graduação do Instituto de Química de Araraquara – UNESP, Danilo e Fabrícia, pela colaboração e paciência durante a execução das análises químicas presentes neste trabalho. Agradeço igualmente ao seu orientador, Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira, por disponibilizar o laboratório e os aparelhos utilizados em tais análises.

A CAPES pela concessão de bolsa de estudos no primeiro semestre do Curso de Mestrado e à FAPESP pela concessão de bolsa nos semestres seguintes. Sem o apoio financeiro destas instituições, não seria possível a concretização deste sonho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	08
ABSTRACT.....	11
INTRODUÇÃO.....	14
PROPOSIÇÃO.....	20
CAPÍTULO 1.....	22
CAPÍTULO 2.....	39
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
REFERÊNCIAS.....	64
ANEXOS.....	72

Resumo

Morgental RD. Avaliação físico-química e da atividade antibacteriana de soluções irrigadoras endodônticas e associações [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.

RESUMO

Este estudo objetivou avaliar o pH, o teor de cloro disponível e a atividade antibacteriana de soluções irrigadoras endodônticas isoladas e associadas frente ao *Enterococcus faecalis* pelo teste de contato direto (in vitro) e em canais radiculares contaminados (ex vivo). A análise de pH foi realizada por meio de pHmetro digital e o teor de cloro pelo método da iodometria. Na metodologia de contato direto, uma suspensão de *E. faecalis* foi exposta aos seguintes irrigantes: GI- Solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5%; GII- NaOCl a 2,5% + ácido cítrico a 10% 7:3 (em volume); GIII- NaOCl a 2,5% + vinagre de maçã 5:5 (em volume); GIV- Ácido cítrico a 10%; GV- Vinagre de maçã. Os períodos de contato foram 30 segundos, 1, 3 e 10 minutos. O número de unidades formadoras de colônia por mililitro de solução (UFC/mL) foi determinado após diluições decimais seriadas e semeadura em placas de *Tryptic Soy Agar* (TSA). Como controle negativo foi utilizado solução fisiológica esterilizada. Em outro experimento, 110 dentes humanos unirradiculados tiveram seus canais radiculares contaminados com *E. faecalis* e incubados a 37°C por 21 dias. As substâncias analisadas foram: GI- NaOCl a 2,5%; GII- NaOCl a 2,5% + ácido cítrico a 10% 7:3 (em volume); GIII- NaOCl a 2,5% + vinagre de maçã 5:5

(em volume); GIV- Vinagre de maçã; GV- Solução de clorexidina a 2%; GVI- Ácido peracético a 1%; GVII- Solução salina fisiológica. Coletas microbiológicas foram realizadas imediatamente após preparo biomecânico e decorrido o período de sete dias. Após diluições decimais seriadas, alíquotas foram semeadas em placas de TSA e a contagem de UFC/mL determinada. Os resultados foram submetidos aos testes ANOVA, Tukey e Bonferroni, com nível de significância de 0,05. A associação do NaOCl a 2,5% com ácido cítrico ou vinagre de maçã promoveu redução de pH e teor de cloro. No teste de contato direto, o NaOCl, isolado ou associado, foi capaz de eliminar *E. faecalis* em 30 segundos. O ácido cítrico somente após 10 minutos. Já o vinagre de maçã não eliminou completamente as bactérias durante o experimento. No estudo ex vivo, para todas as soluções irrigadoras analisadas, houve um número reduzido ou ausência de *E. faecalis* logo após o preparo biomecânico. Porém, todos os espécimes apresentaram aumento na contagem bacteriana após sete dias. Na coleta final, NaOCl a 2,5%, clorexidina a 2% e ácido peracético a 1% apresentaram contagens semelhantes entre si e significativamente menores que os demais grupos ($P < 0,05$). Considerando as metodologias empregadas, pode-se concluir que a associação do NaOCl com soluções ácidas não promoveu melhor efetividade frente ao *E. faecalis*. Nenhuma solução irrigadora analisada foi capaz de eliminar completamente *E. faecalis* do sistema de canais radiculares.

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

Abstract

Morgental RD. Physic-chemical evaluation and antibacterial activity of endodontic irrigants and associations. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.

ABSTRACT

*This study aimed to evaluate the pH, the available chlorine content and the antibacterial activity of endodontic irrigants and associations against *Enterococcus faecalis* by direct exposure test (in vitro) and within infected root canals (ex vivo). The pH was recorded using a digital pH meter and the chlorine content was measured by a standard iodine/thiosulfate titration method. In the direct exposure test, a bacterial suspension was mixed with the following irrigants: GI- 2,5% sodium hypochlorite solution (NaOCl); GII- 2,5% NaOCl + 10% citric acid 7:3 (at volume); GIII- 2,5% NaOCl + apple vinegar 5:5 (at volume); GIV- 10% citric acid; GV- apple vinegar. The contact times were 30 seconds, 1, 3 and 10 minutes. The number of colony-forming units per millilitre (UFC/mL) was calculated after serial 10-fold dilutions and culture in Tryptic Soy Agar (TSA) plates. Sterilized physiologic solution was used as negative control. In another experiment, the root canals of 110 human single-rooted teeth were infected with *E. faecalis* and incubated at 37°C for 21 days. The analysed substances were: GI- 2,5% NaOCl; GII- 2,5% NaOCl + 10% citric acid 7:3 (at volume); GIII- 2,5% NaOCl + apple vinegar 5:5 (at volume); GIV- apple vinegar; GV- 2% chlorhexidine solution; GVI- 1% peracetic acid; GVII-*

physiologic saline solution. Microbiological samples were collected immediately after the biomechanical preparation and after 7 days. After serial 10-fold dilutions and culture in TSA plates, UFC/mL counts were determined. The results were submitted to ANOVA, Tukey and Bonferroni test, with a level of significance established at 0.05. The pH and the chlorine content reduced at associations of 2,5% NaOCl with citric acid or apple vinegar. In the direct exposure test, pure and associated NaOCl were capable of killing E. faecalis after 30 seconds. Citric acid did the same after 10 minutes. Apple vinegar did not completely eliminate bacteria during the experiment. In the ex vivo study, there was a reduced number or absence of E. faecalis just after the biomechanical preparation for all irrigants, but the bacterial counts increased after seven days. At the final sample, 2,5% NaOCl, 2% chlorhexidine and 1% peracetic acid presented similar counts, significantly lower than the other groups ($P < 0,05$). Under the tested conditions, it could be concluded that NaOCl-acid solutions mixtures do not promote better effectiveness against E. faecalis. No irrigant analysed could totally eliminate E. faecalis from the root canal system.

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

Introdução

INTRODUÇÃO

Os microrganismos e seus produtos são considerados a maior causa de alterações pulpares e periapicais, apesar da possibilidade de agressão por agentes físicos e químicos^{5,7,43}. Quando o processo de cárie progride em direção à cavidade pulpar, ocorre a infecção superficial da polpa. Nestes casos, o âmago do tecido pulpar continua com vitalidade e esterilidade, embora apresente inflamação²⁶.

Persistindo a agressão, pode ocorrer a necrose pulpar e, concomitantemente, a invasão microbiana do espaço anteriormente ocupado pela polpa, caracterizando a gangrena pulpar. Quando a infecção se difunde pelo sistema de canais radiculares, instala-se um quadro de reação inflamatória crônica periapical. Nestes casos, o tratamento endodôntico tem como objetivo principal o controle e eliminação da infecção, propiciando condições de reparação aos tecidos periapicais^{26,46}. Diversos autores concordam que menores índices de sucesso são alcançados quando microrganismos viáveis ainda estão presentes na cavidade pulpar no momento da obturação, e que a chave para o reparo reside na remoção dos fatores irritantes^{28,44,47}.

A eliminação da infecção endodôntica, ao contrário de outros tecidos do organismo humano, não ocorre unicamente pela ação do sistema imunológico e de antibióticos administrados por via sistêmica. Devido às características anatômicas e fisiológicas complexas da estrutura dentária e do sistema de canais radiculares, a erradicação desta infecção requer uma intervenção

local, por meio de instrumentação, irrigação, curativo de demora, obturação tridimensional e selamento coronário^{23,45}.

A composição da microbiota presente no sistema de canais radiculares é influenciada por determinantes ecológicos como a presença de oxigênio, disponibilidade de nutrientes, interações bacterianas e do sistema imunológico do hospedeiro⁴⁵. Nos casos de nítida lesão periapical, com infecção endodôntica primária, ocorre o predomínio de microrganismos anaeróbios estritos Gram-negativos^{3,22}. No entanto, em casos de infecção endodôntica secundária ou persistente, a microbiota endodôntica é alterada, prevalecendo microrganismos anaeróbios facultativos^{22,40}.

Enterococcus faecalis é a espécie mais frequentemente isolada em casos de fracasso endodôntico, em culturas mistas ou monoculturas^{21,41}. Além da habilidade de formação de biofilme, *E. faecalis* possui diversos fatores de virulência, tais como: enzimas líticas, substância de agregação, adesinas de superfície, ácido lipoteicoico e produção extracelular de superóxido²⁵. A patogênese desta bactéria está relacionada à sua capacidade de penetrar nos túbulos dentinários e aderir ao colágeno, além de sobreviver a extensos períodos de privação nutricional³⁰. Desta forma, *E. faecalis* tem sido o microrganismo mais utilizado para a realização de testes antimicrobianos in vitro de diferentes soluções irrigadoras, medicamentos e cimentos endodônticos^{18,31,48}.

Conforme Leonardo²⁶ (2005), o preparo biomecânico é uma das fases mais importantes do tratamento endodôntico, englobando recursos químicos (solução irrigadora), físicos (irrigação e aspiração) e mecânicos (instrumentação).

Porém, sabe-se que o preparo biomecânico, por si só, não é capaz de eliminar a infecção endodôntica^{9,14,38}. Assim, diversas pesquisas vêm sendo realizadas na busca por novas soluções irrigadoras e medicamentos, que favoreçam a desinfecção do sistema de canais radiculares, com o intuito de elevar os índices de sucesso da terapia endodôntica.

Devido a uma série de propriedades, como capacidade de dissolução de matéria orgânica, ação lubrificante, neutralização de conteúdo tóxico e amplo espectro antimicrobiano, a solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) é a substância mais utilizada na irrigação dos canais radiculares^{26,33,52}. Sua efetividade pode ser potencializada com o aumento da concentração⁶, mas o efeito irritante sobre os tecidos vivos apicais e periapicais também será maior^{33,50}.

Quando em solução aquosa, o NaOCl origina ácido hipocloroso (HOCl) e hidróxido de sódio (NaOH). O primeiro é um ácido fraco e bastante instável, responsável pela atividade antimicrobiana, enquanto o NaOH é um potente agente hidrolítico, respondendo pela dissolução tecidual do NaOCl¹⁹. Por sua vez, o HOCl dissocia-se parcialmente em ânion hipoclorito (OCl⁻), de acordo com o pH⁴.

O teor de cloro disponível na solução de NaOCl está relacionado à capacidade oxidante do produto e representa a soma das concentrações de HOCl e OCl⁻⁸. Segundo Baker⁴ (1959), em pH 4,5 basicamente todo cloro está na forma de HOCl, já em pH 10 todo cloro disponível está na forma de OCl⁻. Foi demonstrado que o HOCl tem um poder bactericida superior ao OCl⁻^{1,8,36}. Portanto, uma possível abordagem para potencializar o efeito antimicrobiano do

NaOCl é a associação com soluções ácidas para reduzir seu pH^{11,32}. Esta abordagem, no entanto, prejudica sua estabilidade¹¹.

Nas últimas décadas, a clorexidina também vem sendo indicada como solução irrigadora de canais radiculares¹⁵. Além de possuir atividade antimicrobiana de amplo espectro, ela apresenta efeito residual (substantividade) por, pelo menos, 48 horas²⁷. Em relação ao mecanismo de ação, por ser uma molécula catiônica, a clorexidina é atraída e adsorvida à superfície bacteriana, a qual é carregada negativamente. Ela promove uma ruptura da membrana citoplasmática, permitindo a liberação de componentes citoplasmáticos, o que leva à morte celular³⁴.

O vinagre de maçã foi proposto como solução irrigadora por Estrela et al.¹⁶ (2004). Tal substância demonstrou eficácia sobre microrganismos endodônticos em dentes de cães com periodontite apical induzida. Outra propriedade interessante é a sua capacidade de remoção de *smear layer*^{17,51}.

A composição do vinagre de maçã foi analisada por meio de espectroscopia de ressonância magnética nuclear¹⁰, apresentando ácido acético, frutose, ácido málico, etanol, ácido lático, entre outros. Os pesquisadores concluíram que todos os tipos de vinagre analisados eram compostos por uma mistura de vários ácidos e que o ácido acético foi encontrado em maior concentração, variando de 2,85 a 7,09%.

O ácido peracético é um agente químico oxidante, considerado um desinfetante de alto nível, bactericida, fungicida, viruscida e esporicida mesmo em baixas concentrações. Sua decomposição gera ácido acético e oxigênio, não

formando resíduos tóxicos, além de ser efetivo na presença de matéria orgânica²⁰. Na Endodontia, o ácido peracético a 2,25% foi recentemente investigado como solução irrigadora final, em associação ao NaOCl, por Lottanti et al.²⁹ (2009). Tal substância foi capaz de remover a *smear layer* e quelar íons cálcio de forma semelhante ao EDTA a 17%.

Na área médica, o ácido peracético é frequentemente empregado na desinfecção de aparelhos ou dispositivos termossensíveis, como endoscópios⁴². Apresenta ainda resultados promissores para a desinfecção do sistema de água de equipamentos odontológicos³⁵ e na desinfecção de resinas acrílicas quimicamente e termicamente ativadas¹².

O grande número de substâncias analisadas frente ao *E. faecalis* proporciona resultados conflitantes na literatura^{18,34,52}. Este fato justifica a realização de pesquisas adicionais na busca por um agente irrigante capaz de eliminar tal microrganismo dos canais radiculares e túbulos dentinários.

Proposição

PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Avaliar, *in vitro*, o pH, o teor de cloro disponível e a atividade antibacteriana de soluções irrigadoras endodônticas isoladas e associadas frente ao *Enterococcus faecalis* pelo teste de contato direto.
2. Avaliar, *ex vivo*, a atividade antibacteriana de soluções irrigadoras endodônticas isoladas e associadas em canais radiculares contaminados com *E. faecalis*.

**AVALIAÇÃO DO PH, DO TEOR DE CLORO DISPONÍVEL E
DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE SOLUÇÕES
IRRIGADORAS ENDODÔNTICAS E ASSOCIAÇÕES***

Capítulo 1

* Artigo escrito segundo as normas do periódico *Journal of Endodontics*.

RESUMO

Introdução: *Enterococcus faecalis* é frequentemente encontrado em casos de fracasso endodôntico e demonstra resistência a diversos irrigantes e medicamentos utilizados durante o tratamento endodôntico. O objetivo deste estudo foi avaliar, in vitro, o pH, o teor de cloro disponível e a atividade antibacteriana de soluções irrigadoras e associações sobre *E. faecalis*. **Métodos:** O pH e o teor de cloro foram determinados para a solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5% isolada e associada ao ácido cítrico a 10% ou ao vinagre de maçã em diferentes proporções (em volume): 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8. A atividade antibacteriana foi avaliada pelo teste de contato direto para as seguintes substâncias: GI- NaOCl a 2,5%; GII- NaOCl a 2,5% + ácido cítrico a 10% (7:3); GIII- NaOCl a 2,5% + vinagre de maçã (5:5); GIV- Ácido cítrico a 10%; GV- Vinagre de maçã. Solução fisiológica esterilizada foi utilizada como controle negativo. As unidades formadoras de colônias (UFC) foram determinadas após diluições decimais seriadas e semeadura em placas de *Tryptic Soy Agar* (TSA). **Resultados:** As associações do NaOCl a 2,5% com ácido cítrico ou vinagre de maçã reduziram o pH e o teor de cloro. O NaOCl, isolado ou nas associações, foi capaz de eliminar *E. faecalis* em apenas 30 segundos e o ácido cítrico após 10 minutos. O vinagre de maçã promoveu apenas redução (32,20%) após 10 minutos. **Conclusões:** A associação do NaOCl com soluções ácidas reduziu o pH e o teor de cloro, mas não alterou sua atividade antibacteriana.

Palavras-chave: Cloro, *Enterococcus faecalis*, hipoclorito de sódio, pH, soluções irrigadoras.

INTRODUÇÃO

A etiologia microbiana é preponderante nas doenças pulpares e periapicais (1, 2). Portanto, o controle da infecção instalada no sistema de canais radiculares é um dos principais objetivos do tratamento endodôntico, a fim de proporcionar condições para o reparo de lesões periapicais (3). Por outro lado, a persistência de microrganismos na cavidade pulpar representa a principal causa de falha desta terapia (4, 5).

O preparo dos canais radiculares por meio da instrumentação e irrigação, não é capaz de promover a eliminação da infecção endodôntica (6, 7). Tal dificuldade se deve à propagação microbiana para canais laterais, deltas apicais e túbulos dentinários (8, 9), locais inacessíveis ao preparo biomecânico.

A principal solução irrigadora utilizada é o NaOCl, em função de sua atividade antimicrobiana, capacidade de dissolução tecidual, ação detergente e neutralizante de produtos tóxicos (10, 11). Alguns fatores podem interferir na eficácia do NaOCl, incluindo sua concentração (12), temperatura (13) e pH (14, 15).

Com a redução do pH, o cloro disponível na solução de NaOCl predomina na forma de ácido hipocloroso (HOCl), o qual é mais ativo do que o ânion hipoclorito (OCl⁻), que prevalece em pH alcalino (16). O HOCl consegue

penetrar mais facilmente na membrana celular bacteriana, por apresentar característica neutra e molécula com organização espacial semelhante à água. Dentro da célula, o HOCl tem efeito bacteriostático, reagindo com DNA, RNA e outros nucleotídeos, e também bactericida, reagindo com aminoácidos para formar cloraminas (17). Portanto, uma possível abordagem para potencializar o efeito antimicrobiano do NaOCl seria a diminuição de seu pH (14, 15).

O ácido cítrico foi proposto como solução irrigadora por Wayman (18). Ele vem sendo utilizado ao final do preparo biomecânico, com o intuito de remover a *smear layer* (19, 20), podendo ser usado em associação ao NaOCl para redução de seu pH. A irrigação com solução de NaOCl, seguida por ácido cítrico, reduz a microbiota dos canais radiculares (21). O vinagre de maçã, composto basicamente por ácido acético e ácido málico, demonstra capacidade de remoção de *smear layer* (22) e eficácia frente a microrganismos endodônticos (23), podendo também ser usado em associação ao NaOCl.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o pH e o teor de cloro disponível na solução de NaOCl a 2,5% isolada e associada ao ácido cítrico a 10% ou ao vinagre de maçã em diferentes proporções, além de investigar a atividade antibacteriana *in vitro* dessas substâncias, isoladas ou em associação, frente ao *E. faecalis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Mensuração do pH e do teor de cloro disponível

O pH e o teor de cloro foram determinados para a solução de NaOCl a 2,5% (Araquímica, Araraquara, SP, Brasil) isolada e associada ao ácido cítrico a 10% (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil) ou ao vinagre de maçã (Castelo, Jundiaí, SP, Brasil) em diferentes proporções (em volume): 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8.

A mensuração do pH foi realizada por meio de pHmetro DMPH-2 (Digimed, São Paulo, SP, Brasil), em temperatura ambiente - 25°C (Anexo 1, Figura 1A). O teor de cloro foi avaliado pelo método da iodometria, utilizando um titulador potenciométrico automático AT500-N2 (KEM - Kyoto Electronics Manufacturing, Tokyo, Japão). Empregou-se tiosulfato de sódio 0,1 N padronizado, ácido acético a 6% e iodeto de potássio. Todas as análises foram realizadas em triplicata (Anexo 1, Figura 1B).

Atividade antibacteriana frente ao *Enterococcus faecalis*

Os procedimentos microbiológicos foram realizados em ambiente asséptico, dentro de câmara de fluxo laminar (VecoFlow Ltda, Campinas, SP, Brasil). As seguintes soluções e associações foram investigadas: GI- NaOCl a 2,5%; GII- NaOCl a 2,5% + ácido cítrico a 10% na proporção 7:3; GIII- NaOCl a

2,5% + vinagre de maçã na proporção 5:5; GIV- Ácido cítrico a 10%; GV- Vinagre de maçã. Foram selecionadas as associações com pH próximo a 5 (Tabelas 1 e 2), uma vez que os hipocloritos tem maior atividade neste pH (24), quando o cloro disponível está na forma de ácido hipocloroso (16).

Solução fisiológica esterilizada foi empregada como controle negativo. Desta forma, foi possível determinar o número inicial de UFC. A atividade antibacteriana foi avaliada por meio do teste de contato direto, utilizando cepa padrão de *E. faecalis* (ATCC 29212). Para os experimentos, culturas jovens de *E. faecalis* foram obtidas em placas de TSA (*Tryptic Soy Agar*, Difco, Detroit, MI, EUA), por meio de semeadura por esgotamento, 12 horas antes de cada teste. A pureza do inóculo foi observada pela morfologia macroscópica e microscópica (Coloração de Gram).

No momento do teste, foi preparada uma suspensão bacteriana em solução fisiológica esterilizada. O ajuste da concentração bacteriana foi realizado em espectrofotômetro (Modelo 600 Plus, Femto, São Paulo, SP, Brasil). A suspensão bacteriana foi sempre empregada no prazo máximo de 60 minutos após o ajuste e correspondia a 3×10^7 UFC/mL.

Por meio de pipetas automáticas, 1,45 mL de cada solução irrigadora ou associação foram levados a tubos teste (Eppendorf) de 2 mL. A seguir, uma alíquota de 50 µL da suspensão de *E. faecalis* foi adicionada ao tubo e a mistura foi agitada por 30 segundos (Vortex AP 56, Phoenix, Araraquara, SP, Brasil). Os tempos de contato foram 30 segundos, 1, 3 e 10 minutos.

Decorrido esse período, foram realizadas diluições decimais seriadas até 10^{-5} (Anexo 1, Figura 1C). Nesta etapa, alíquotas de 100 μ L da mistura foram transferidas para um segundo tubo teste contendo 0,9 mL de agente neutralizante. Para a solução de NaOCl pura foi utilizado tiossulfato de sódio a 1% e para os demais grupos foi empregado tiossulfato de sódio a 1% + Tween 80 a 1%. O conteúdo da primeira diluição foi homogeneizado e 100 μ L foram transferidos para um terceiro tubo teste idêntico ao anterior, contendo 0,9 mL da solução neutralizante. Os quarto, quinto e sexto tubos continham 0,9 mL de solução fisiológica esterilizada.

Ao final deste processo, alíquotas de 20 μ L de cada uma das diluições foram semeadas em triplicata na superfície de placas de TSA. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas em aerobiose. A leitura dos resultados de cada placa resultou da média do número de UFC das três áreas de crescimento bacteriano, sempre na diluição da amostra com número entre 5 e 50 (Anexo 1, Figura 1D). A partir destas médias foi calculado o número de UFC/mL após cada um dos tempos de contato entre a solução irrigadora e a suspensão bacteriana.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores obtidos foram expressos em porcentagens médias de colônias viáveis após o contato com as soluções irrigadoras em cada período experimental.

RESULTADOS

pH e teor de cloro

A associação da solução de NaOCl a 2,5% com ácido cítrico a 10% reduziu tanto o pH quanto o teor de cloro disponível. Quanto maior a quantidade de ácido na mistura, menores foram os valores encontrados (Tabela 1). Situação similar ocorreu na associação da solução de NaOCl a 2,5% com vinagre de maçã (Tabela 2).

TABELA 1 - Média e desvio-padrão do pH e do teor de cloro na solução de NaOCl a 2,5% isolada e associada ao ácido cítrico a 10%

AMOSTRA	pH	TEOR DE CLORO (%)
NaOCl a 2,5%	11,75 ± 0	2,52 ± 0,02
NaOCl a 2,5% + ácido cítrico a 10% - 8:2	6,415 ± 0,035	2,085 ± 0,005
NaOCl a 2,5% + ácido cítrico a 10% - 7:3	4,82 ± 0,04	1,815 ± 0,005
NaOCl a 2,5% + ácido cítrico a 10% - 6:4	3,79 ± 0,08	1,555 ± 0,005
NaOCl a 2,5% + ácido cítrico a 10% - 5:5	3,08 ± 0,02	1,30 ± 0,01
NaOCl a 2,5% + ácido cítrico a 10% - 4:6	2,685 ± 0,005	1,045 ± 0,005
NaOCl a 2,5% + ácido cítrico a 10% - 3:7	2,40 ± 0,01	0,785 ± 0,005
NaOCl a 2,5% + ácido cítrico a 10% - 2:8	2,125 ± 0,045	0,53 ± 0
Ácido cítrico a 10%	1,51 ± 0,01	---

TABELA 2 - Média e desvio-padrão do pH e do teor de cloro na solução de NaOCl a 2,5% isolada e associada ao vinagre de maçã

AMOSTRA	pH	TEOR DE CLORO (%)
NaOCl a 2,5%	11,75 ± 0	2,52 ± 0,02
NaOCl a 2,5% + vinagre de maçã - 8:2	7,365 ± 0,045	2,07 ± 0
NaOCl a 2,5% + vinagre de maçã - 7:3	6,565 ± 0,055	1,805 ± 0,005
NaOCl a 2,5% + vinagre de maçã - 6:4	5,43 ± 0,02	1,545 ± 0,005
NaOCl a 2,5% + vinagre de maçã - 5:5	4,69 ± 0,01	1,285 ± 0,005
NaOCl a 2,5% + vinagre de maçã - 4:6	4,345 ± 0,035	1,035 ± 0,005
NaOCl a 2,5% + vinagre de maçã - 3:7	4,03 ± 0,02	0,775 ± 0,005
NaOCl a 2,5% + vinagre de maçã - 2:8	3,76 ± 0,04	0,52 ± 0
Vinagre de maçã	2,76 ± 0,01	---

Atividade antibacteriana

As soluções de NaOCl a 2,5% pura, associada ao ácido cítrico a 10% e associada ao vinagre de maçã (GI, GII e GIII) eliminaram completamente *E. faecalis* após 30 segundos de contato. O ácido cítrico a 10% puro (GIV) eliminou *E. faecalis* após 10 minutos. O vinagre de maçã puro (GV) promoveu apenas uma redução de 32,20% nas células viáveis ao final do experimento, conforme demonstra a Tabela 3.

TABELA 3 - Percentual de células de *E. faecalis* viáveis após exposição às soluções e associações

GRUPOS	Percentual (%) de células viáveis			
	30 s	1 min	3 min	10 min
GI- NaOCl a 2,5%	0	0	0	0
GII- NaOCl a 2,5% + ácido cítrico a 10% (7:3)	0	0	0	0
GIII- NaOCl a 2,5% + vinagre de maçã (5:5)	0	0	0	0
GIV- Ácido cítrico a 10%	4	4	2,30	0
GV- Vinagre de maçã	97,80	93,60	88	67,80
Controle negativo	100	100	100	100

DISCUSSÃO

Investigações sobre a influência do pH na atividade antibacteriana do NaOCl foram descritas por alguns autores (14, 15, 25). A bactéria escolhida neste estudo foi *E. faecalis*, em função de sua alta prevalência em casos de insucesso endodôntico (26), a qual pode estar relacionada à capacidade de invadir os túbulos dentinários e aderir ao colágeno (27).

Dentre as substâncias possíveis para ajuste do pH da solução de NaOCl, já foram analisados o ácido clorídrico (14) e o ácido acético (15). O ácido cítrico é mais utilizado na Endodontia como agente irrigante final (19, 21) e o vinagre de maçã tem demonstrado atuação frente à microbiota endodôntica (23).

Ambos são capazes de remover *smear layer*, portanto, além de reduzir o pH, poderiam melhorar a capacidade de limpeza das paredes dentinárias.

Em estudo piloto, foi analisada redução significativa no teor de cloro disponível nas associações de NaOCl com soluções ácidas em função do tempo (avaliação imediata, após 10 e 30 minutos). Diante de tais resultados, o preparo das misturas foi realizado apenas no momento do uso, tanto para as análises físico-químicas quanto microbiológicas.

Ainda, foi observado previamente o efeito *carry-over* das soluções irrigadoras testadas. Assim, no teste de contato direto, o primeiro e segundo tubos da diluição seriada continham solução neutralizante, evitando que vestígios do irrigante fossem transferidos para o meio de cultura e interferissem no crescimento bacteriano por um tempo maior do que o período experimental estabelecido (28).

A associação de NaOCl a 2,5% com ácido cítrico a 10% demonstrou diminuição gradativa no pH e teor de cloro da proporção 8:2 à proporção 2:8. De forma semelhante, Zehnder et al. (29) misturaram NaOCl a 1% com ácido cítrico a 10% em diferentes proporções e observaram que o cloro disponível estava ausente já no primeiro minuto da análise. Uma possível explicação para este fato seria a evaporação do cloro na forma de gás durante a interação das duas substâncias, conforme comprovado por Baumgartner e Ibay (30).

Resultados semelhantes foram observados na mistura de NaOCl com vinagre de maçã. Assim, a interação clínica deveria ocorrer no interior do

canal radicular, pela irrigação inicial com a solução ácida seguida pelo NaOCl, diminuindo a perda de cloro que ocorreria se misturados na seringa.

De acordo com Hugo e Russel (24), a solução de NaOCl apresentou maior atividade antimicrobiana em pH próximo a 5, correspondendo à proporção 7:3 na associação do NaOCl com ácido cítrico e 5:5 na associação do NaOCl com vinagre de maçã. Desta forma, estas proporções foram avaliadas no teste de contato direto. Nestas proporções os teores de cloro disponível estavam reduzidos: 1,815 e 1,285, respectivamente. É importante salientar que o fator determinante na atividade antibacteriana do NaOCl é a quantidade de cloro disponível na forma de HOCl e não apenas o teor de cloro total.

Camps et al. (14) e Mercade et al. (15), utilizando dentes humanos, demonstraram que a solução de NaOCl com pH neutro apresenta melhor atividade antibacteriana frente ao *E. faecalis* do que a solução convencional com pH=12. No presente estudo, a solução de NaOCl foi associada a soluções ácidas, em pH próximo a 5, apresentando atividade antibacteriana similar à solução pura com pH alcalino. Todas as soluções foram capazes de eliminar *E. faecalis* no tempo mínimo avaliado de 30 segundos. É possível sugerir que um tempo menor poderia promover diferença entre as soluções analisadas, sendo questionável a relevância clínica deste fato. In vitro, a solução de NaOCl a 2,5% pura apresentou eficiência na eliminação de *E. faecalis* e a alteração do pH pode ser desnecessária. Por sua vez, o ácido cítrico e o vinagre de maçã puro foram menos eficientes.

O teste de contato direto, apesar de não reproduzir totalmente as condições encontradas em infecções endodônticas, nos fornece subsídios para a

comparação entre diferentes substâncias, sem a interferência de fatores extrínsecos que poderiam reduzir ou aumentar a ação antimicrobiana das mesmas. Testes ex vivo e in vivo são necessários para investigar o efeito da dentina e do sistema de canais radiculares na atuação destas soluções isoladas e associadas. Estudos de Haapasalo et al. (31) e Portenier et al. (32) têm demonstrado que diferentes componentes dentários como a dentina, o colágeno e outras proteínas apresentam efeito inibitório frente a medicamentos e desinfetantes comumente utilizados no tratamento endodôntico.

Além disso, pesquisas adicionais que esclareçam as interações físico-químicas do NaOCl com diferentes tipos de ácidos são necessárias para a escolha de uma substância ideal para ajuste de seu pH e possível aumento da sua atividade antimicrobiana.

CONCLUSÕES

Considerando a metodologia empregada e resultados obtidos, pode-se concluir que a associação da solução de NaOCl a 2,5% com ácido cítrico a 10% ou vinagre de maçã reduziu o pH, o teor de cloro e não interferiu na atividade antibacteriana da solução pura. O ácido cítrico puro e o vinagre de maçã mostraram menor eficiência na eliminação de *E. faecalis*.

REFERÊNCIAS

1. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965; 20:340-9.
2. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod* 1992; 18:427-30.
3. Ricucci D, Lin LM, Spangberg LS. Wound healing of apical tissues after root canal therapy: a long-term clinical, radiographic, and histopathologic observation study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 108:609-21.
4. Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1997; 30:297-306.
5. Siqueira Jr JF. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J* 2001; 34:1-10.
6. Byström A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J* 1985; 18:35-40.
7. Dalton BC, Orstavik D, Phillips C, Pettiette M, Trope M. Bacterial reduction with nickel-titanium instrumentation. *J Endod* 1998; 24:763-7.
8. Sen BH, Piskin B, Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. *Endod Dent Traumatol* 1995; 11:6-9.

9. Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 99:231-52.
10. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod* 2006; 32:389-98.
11. Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *Int Dent J* 2008; 58:329-41.
12. Berber VB, Gomes BPFA, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CCR, Zaia AA, et al. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canal and dentinal tubules. *Int Endod J* 2006; 39:10-7.
13. Sirtes G, Waltimo T, Schaetzle M, Zehnder M. The effects of temperature on sodium hypochlorite short-term stability, pulp dissolution capacity, and antimicrobial efficacy. *J Endod* 2005; 31:669-71.
14. 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-e73.
15. Mercade M, Duran-Sindreu F, Kuttler S, Roig M, Durany N. Antimicrobial efficacy of 4.2% sodium hypochlorite adjusted to pH 12, 7.5 and 6.5 in infected human root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 107:295-8.

16. Baker RJ. Types and significance of chlorine residuals. *J Am Water Works Assoc* 1959; 51:1185-90.
17. Hawkins CL, Davies MJ. Hypochlorite-induced damage to DNA, RNA and polynucleotides: formation of chloramines and nitrogen-centered radicals. *Chem Res Toxicol* 2002; 15:83-92.
18. Wayman B, Kopp WM, Pinero GJ, Lazzari EP. Citric and lactic acids as root canal irrigants in vitro. *J Endod* 1979; 5:258-64.
19. Baumgartner JC, Brown CM, Mader CL, Peters DD, Shulman JD. A scanning electron microscopic evaluation of root canal debridement using saline, sodium hypochlorite, and citric acid. *J Endod* 1984; 10:525-31.
20. Torabinejad M, Handysides R, Khademi AA, Bakland LK. Clinical implications of the smear layer in endodontics: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 94:658-66.
21. Siqueira Jr JF, Roças IN, Santos SRLD, Lima KC, Magalhães FAC, Uzeda M. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimes in reducing the bacterial population within root canals. *J Endod* 2002; 28:181-4.
22. Zandim DL, Côrrea FOB, Sampaio JEC, Rossa Jr C. The influence of vinegars on exposure of dentinal tubules: a SEM evaluation. *Braz Oral Res* 2004; 18:63-8.
23. Estrela C, Holland R, Bernabe PFE, Souza V, Estrela CRA. Antimicrobial potencial of medicaments used in healing process in dog's teeth with apical periodontitis. *Braz Dent J* 2004; 15:181-5.

24. Hugo WB, Russel AD. *Pharmaceutical Microbiology*. 3th ed. Oxford: Blackwell Sciense; 1983. p. 223-4.
25. Bloomfield SF, Miles GA. The antibacterial properties of sodium dichloroisocyanurate and sodium hypochlorite formulations. *J Appl Bacteriol* 1979; 46:65-73.
26. Stuart CH, Schwartz AS, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 2006; 32:93-8.
27. Love RM. *Enterococcus faecalis*: a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001; 34:399-405.
28. Zhang H, Shen Y, Ruse ND, Haapasalo M. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact against *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2009; 35:1051-5.
29. Zehnder M, Schmidlin P, Sener B. Chelation in root canal therapy reconsidered. *J Endod* 2005; 31:817-20.
30. Baumgartner JC, Ibay AC. The chemical reactions of irrigants used for root canal debridement. *J Endod* 1987; 13:47-51.
31. Haapasalo HK, Siren EK, Waltimo TM, Ørstavik D, Haapasalo MP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an *in vitro* study. *Int Endod J* 2000; 33:126-31.
32. Portenier I, Haapasalo HK, Rye A, Waltimo TM, Ørstavik D, Haapasalo MP. Inactivation of root canal medicaments by dentine, hydroxylapatite and bovine serum albumin. *Int Endod J* 2001; 34:184-8.

**EFETIVIDADE ANTIBACTERIANA DE SOLUÇÕES
IRRIGADORAS ENDODÔNTICAS E ASSOCIAÇÕES EM
CANAIS RADICULARES CONTAMINADOS COM
*ENTEROCOCCUS FAECALIS****

Capítulo 2

* Artigo escrito segundo as normas do periódico Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a efetividade antibacteriana de soluções irrigadoras endodônticas e associações. **Design do estudo:** Foram utilizados 110 dentes humanos unirradiculados, inoculados com *E. faecalis* e incubados a 37°C por 21 dias. Os dentes foram divididos de acordo com o irrigante: GI- Solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5%; GII- NaOCl a 2,5% + ácido cítrico a 10% (7:3); GIII- NaOCl a 2,5% + vinagre de maçã (5:5); GIV- Vinagre de maçã; GV- Solução de clorexidina a 2%; GVI- Ácido peracético a 1%; GVII- Solução fisiológica. Foram realizadas coletas microbiológicas imediatamente após preparo biomecânico e após sete dias. Os resultados foram submetidos aos testes ANOVA, Tukey e Bonferroni, com 5% de significância. **Resultados:** Todas as soluções promoveram redução ou eliminação de *E. faecalis* após a instrumentação. Porém, apresentaram aumento na contagem bacteriana na coleta final. GI, GV e GVI apresentaram contagens menores do que os demais grupos ($P < 0,05$). **Conclusão:** Nenhuma solução irrigadora analisada foi capaz de erradicar *E. faecalis* do sistema de canais radiculares, sendo as soluções de hipoclorito de sódio, clorexidina e ácido peracético as mais efetivas.

INTRODUÇÃO

Os microrganismos e seus produtos têm importância fundamental no desenvolvimento de patologias pulpares e periapicais.^{1,2} Além disso, a persistência de infecção no sistema de canais radiculares é determinante nos insucessos do tratamento endodôntico.^{3,4} Desta forma, a desinfecção da cavidade pulpar, por meio de soluções irrigadoras, complementada pela medicação intracanal, tem como objetivo promover um ambiente favorável para o reparo dos tecidos periapicais.

Com os avanços nas técnicas microbiológicas de cultura e identificação, ocorridos nas últimas décadas, mais de 150 espécies microbianas foram detectadas no interior dos canais radiculares.^{5,6} Dentre elas, destaca-se *E. faecalis*, uma bactéria anaeróbia facultativa Gram-positiva, que apresenta capacidade de invadir os túbulos dentinários e aderir ao colágeno,⁷ mostrando resistência à diversas soluções irrigadoras e medicamentos empregados na Endodontia.⁸

A solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) é o agente irrigante mais utilizado universalmente, destacando-se por sua ampla atividade antimicrobiana e capacidade de dissolução tecidual.^{9,10} Alguns fatores podem interferir em sua eficácia, incluindo concentração,¹¹ temperatura¹² e pH.^{13,14} Com a redução do pH, o cloro disponível na solução de NaOCl predomina na forma de ácido hipocloroso (HOCl), o qual é mais ativo do que o ânion hipoclorito (OCl⁻), prevalecendo em pH alcalino.^{15,16} Desta forma, a associação do NaOCl com

soluções ácidas pode potencializar seu efeito antimicrobiano, apesar de prejudicar a estabilidade da solução.¹³

A clorexidina é um potente antisséptico, largamente empregado no controle químico da placa dental, e também como solução irrigadora endodôntica, em função do seu amplo espectro antimicrobiano e substantividade.¹⁷⁻¹⁹ Porém, sua principal desvantagem é a incapacidade de dissolver matéria orgânica,²⁰ prejudicando sua capacidade de limpeza.²¹

Algumas soluções irrigadoras alternativas têm sido investigadas, apresentando além de atividade antibacteriana, boa propriedade de limpeza das paredes dentinárias. O vinagre de maçã, composto basicamente por ácido acético e ácido málico, demonstra eficácia sobre microrganismos endodônticos²² e capacidade de remoção de *smear layer*.²³ Porém, seu uso como agente irrigante requer maiores estudos.

O ácido peracético é um desinfetante amplamente utilizado em hospitais e na indústria de alimentos.²⁴ Ele foi recentemente investigado para uso endodôntico e também demonstra capacidade de remoção de *smear layer*.²⁵ Suas excelentes propriedades antimicrobianas e seu poder de ação na presença de matéria orgânica, comprovados em outras aplicações, como desinfecção do sistema de água de equipamentos odontológicos²⁶ e de resinas acrílicas,²⁷ justificam a avaliação deste produto como solução irrigadora.

Um grande número de substâncias tem sido avaliado quanto à sua atuação frente ao *E. faecalis*.^{8,28,29} A busca por um agente irrigante ou associações capazes de eliminar microrganismos resistentes continua intensa. Portanto, este

estudo ex vivo tem como objetivo avaliar a efetividade de soluções irrigadoras endodônticas e associações frente ao *E. faecalis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Padronização dos espécimes

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Anexo 2). Cento e dez dentes unirradiculados humanos com canal radicular único e reto, recentemente extraídos, foram selecionados. Os mesmos foram imersos em solução de hipoclorito de sódio a 1% e armazenados em água destilada sob refrigeração. As coroas dentais foram seccionadas em máquina de corte de precisão Isomet 1000 (Buehler Ltda, Lake Bluff, IL, EUA), padronizando o tamanho dos espécimes em 15 mm.

A fresa de Gates Glidden #3 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) foi utilizada para o preparo dos 3 mm cervicais dos canais radiculares. A lima K #20 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) foi utilizada para padronização do diâmetro foraminal. A seguir, os canais radiculares foram instrumentados 1 mm aquém do comprimento dental até lima K #35, sendo a irrigação realizada com 2 mL de solução fisiológica a cada troca de instrumento. Os canais radiculares foram preenchidos com EDTA trissódico a 17%

(Biodinâmica, Ibitiporã, PR, Brasil) por 3 minutos, sendo então irrigados com 5 mL de solução fisiológica.

Posteriormente, foi realizado o vedamento da região apical radicular com resina composta fotopolimerizável Opallis (FGM Produtos Odontológicos Ltda, Joinville, SC, Brasil) e as superfícies radiculares foram impermeabilizadas externamente com duas camadas de adesivo epóxi Araldite (Brascola Ltda, Taboão da Serra, SP, Brasil), exceto a região da abertura cervical.

Os espécimes foram distribuídos aleatoriamente em oito microplacas de cultura celular de 24 poços (Corning Incorporated, Corning, NY, EUA), sendo sete delas com 15 dentes em cada (Anexo 3, Figura 3A) e uma microplaca controle com cinco dentes, fixados nos poços externos com resina acrílica quimicamente ativada (Clássico Artigos Odontológicos, São Paulo, SP, Brasil). Estas microplacas foram embaladas e submetidas à esterilização em radiação gama com cobalto 60 (EMBRARAD, Cotia, SP, Brasil).

Contaminação com *E. faecalis*

Os procedimentos microbiológicos foram realizados em ambiente asséptico, dentro de câmara de fluxo laminar (VecoFlow Ltda, Campinas, SP, Brasil). Culturas puras de *E. faecalis* (ATCC 29212) foram reativadas em *Tryptic Soy Broth* - TSb (Difco, Detroit, MI, EUA) por 48 horas. As bactérias foram inoculadas em placas de *Tryptic Soy Agar* - TSa (Difco, Detroit, MI, EUA) e incubadas em microaerofilia a 37°C por outras 48 horas. Uma suspensão

bacteriana foi preparada em solução fisiológica esterilizada, com concentração equivalente a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC) por mL. O ajuste da densidade óptica da suspensão foi feito em espectrofotômetro (Modelo 600 Plus, Femto, São Paulo, SP, Brasil), com comprimento de onda de 600 nm.

O meio de cultura (TSb) foi misturado com a suspensão bacteriana na proporção de 1:1 e os canais radiculares foram contaminados, por meio de micropipetas, com 20 μ L desta mistura. Uma mecha de algodão esterilizada foi umedecida em TSb e colocada na entrada dos canais radiculares. As microplacas contendo os espécimes foram mantidas em ambiente microaerófilo a 37°C e umidade relativa. O período de contaminação foi de 21 dias, sendo adicionado TSb esterilizado no interior dos canais radiculares a cada dois dias, utilizando seringa de insulina de 0,5 mL (Becton Dickinson, Curitiba, PR, Brasil), conforme Cardoso et al.²⁹

Após este período, foi realizada coleta de todos os canais radiculares para a confirmação da contaminação (coleta inicial). Foram utilizados três cones de papel absorvente esterilizados #35 (Tanari Industrial Ltda, São Paulo, SP, Brasil) por espécime, mantidos nos canais radiculares por 1 minuto e transferidos para tubos teste (Eppendorf) contendo 1 mL de solução fisiológica esterilizada. Os tubos foram agitados por 30 segundos (Vortex AP 56, Phoenix, Araraquara, SP, Brasil). A seguir, foram realizadas diluições decimais seriadas e alíquotas de 20 μ L foram semeadas em triplicata em placas de Petri contendo meio TSa. As placas foram incubadas em microaerofilia a 37°C por 48 horas. O

crescimento bacteriano foi determinado pela contagem do número de UFC/mL de *E. faecalis* (Anexo 3, Figura 3B).

Divisão dos grupos experimentais

As microplacas contendo as raízes fixadas foram aleatoriamente divididas em sete grupos experimentais (n=15), de acordo com a solução irrigadora utilizada:

- GI- Solução de NaOCl a 2,5% (Araquímica, Araraquara, SP, Brasil)
- GII- Solução de NaOCl a 2,5% + ácido cítrico a 10% (Dinâmica Química Contemporânea, Diadema, SP, Brasil) na proporção 7:3
- GIII- Solução de NaOCl a 2,5% + vinagre de maçã (Castelo Alimentos SA, Jundiaí, SP, Brasil) na proporção 5:5
- GIV- Vinagre de maçã (Castelo Alimentos SA, Jundiaí, SP, Brasil)
- GV- Solução de clorexidina a 2% (Farmácia de Manipulação Arte & Ciência, Araraquara, SP, Brasil)
- GVI- Ácido peracético a 1% (Dinâmica Química Contemporânea, Diadema, SP, Brasil)
- GVII- Solução salina fisiológica a 0,85% (Dinâmica Química Contemporânea, Diadema, SP, Brasil).

Nos grupos II e III, a associação das soluções foi realizada no momento da utilização. A proporção de cada solução na mistura foi escolhida por

meio de análise do pH, sendo selecionadas as proporções com pH próximo a 5, considerando a melhor atividade antimicrobiana da solução de NaOCl neste pH,³⁰ devido a maior disponibilidade de cloro na forma de HOCl,¹⁵ possibilitando penetração na membrana celular bacteriana, com ação bacteriostática e bactericida.¹³ Além disso, em cinco espécimes (grupo controle), não foi realizado preparo biomecânico.

Todos os canais radiculares foram preparados até a lima K #50 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça), utilizando a respectiva solução irrigadora. Em seguida foi realizado preparo escalonado programado até a lima K #70. Foram utilizados 2 mL de solução a cada troca de instrumento (Anexo 3, Figura 3C). O tempo total de preparo e manutenção da solução irrigadora foi padronizado em 10 minutos por espécime.

A seguir, foi realizada irrigação com 2 mL de um agente neutralizante, conforme a solução irrigadora utilizada. Para o grupo I foi empregado tiosulfato de sódio a 1%. Para os grupos II, III, IV e VI foi utilizado tiosulfato de sódio a 1% + Tween 80 a 1%. Já para o grupo V foi usada lecitina a 0,5% + Tween 80 a 1%. Por fim, os canais radiculares foram irrigados com solução fisiológica esterilizada.

Coletas e análise microbiológica

Imediatamente após o preparo biomecânico, foi realizada uma coleta microbiológica (coleta pós-preparo). Para tanto foram utilizados cones de

papel absorvente esterilizados #50, seguindo os mesmos procedimentos descritos na coleta inicial. A seguir, os canais radiculares foram preenchidos com solução fisiológica esterilizada e uma mecha de algodão estéril foi colocada na entrada dos canais radiculares. As microplacas contendo os espécimes foram fechadas e novamente incubadas em microaerofilia a 37°C e umidade relativa.

Após sete dias, outra coleta microbiológica foi realizada da mesma forma (coleta final). As coletas do grupo controle (sem preparo biomecânico) foram realizadas nos mesmos períodos. Os procedimentos experimentais estão representados no Anexo 3, Figura 3D.

Análise estatística

Os resultados foram submetidos à transformação logarítmica e analisados por meio do programa GraphPad Prism 3.0 (San Diego, CA, EUA). Na comparação entre os grupos experimentais, foram aplicados ANOVA e Teste de Comparações Múltiplas de Tukey. Já na comparação entre as coletas microbiológicas, dentro de cada grupo, foram utilizados ANOVA de Medidas Repetidas e Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni. O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

A metodologia de contaminação deste estudo foi comprovada por meio da recuperação de culturas puras de *E. faecalis* em todos os dentes na coleta inicial, 21 dias após incubação dos espécimes, com contagens de UFC/mL semelhantes em todos os grupos (Tabela 1).

TABELA 1 - Comparação entre grupos nas coletas inicial, pós-preparo e final (média e desvio-padrão de UFC/mL log)

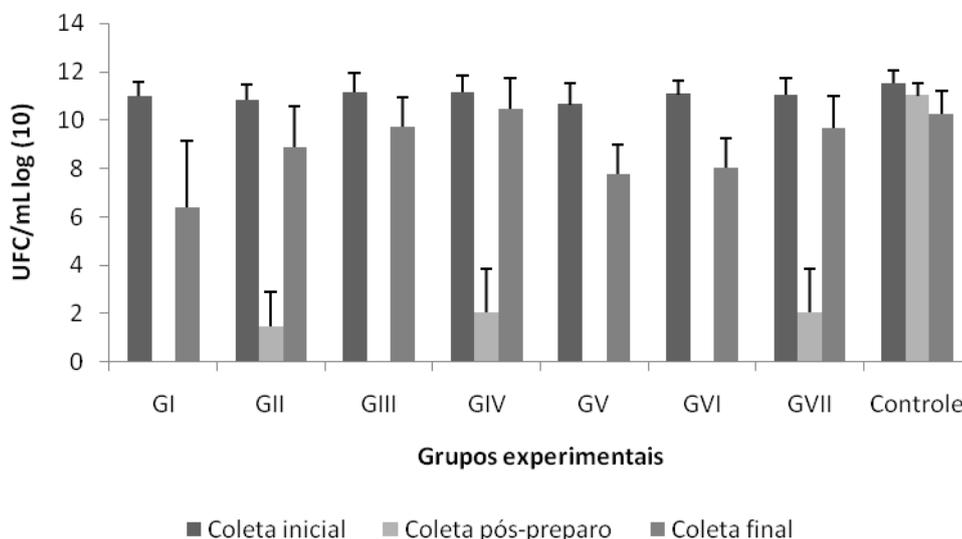
Grupo	Inicial	Pós-preparo	Final
GI - NaOCl 2,5%	11,00 (\pm 0,59) ^a	0,00 (\pm 0,00) ^a	6,40 (\pm 2,75) ^a
GII - NaOCl 2,5% + AC 10%	10,85 (\pm 0,64) ^a	1,47 (\pm 1,45) ^b	8,89 (\pm 1,69) ^{b, c}
GIII - NaOCl 2,5% + VM	11,15 (\pm 0,80) ^a	0,00 (\pm 0,00) ^a	9,71 (\pm 1,21) ^{b, d}
GIV - Vinagre de maçã	11,13 (\pm 0,73) ^a	2,06 (\pm 1,78) ^b	10,47 (\pm 1,28) ^b
GV- Clorexidina 2%	10,65 (\pm 0,89) ^a	0,00 (\pm 0,00) ^a	7,77 (\pm 1,23) ^{a, c}
GVI - Ácido Peracético 1%	11,07 (\pm 0,56) ^a	0,00 (\pm 0,00) ^a	8,01 (\pm 1,26) ^{a, c, d}
GVII - Solução Salina	11,03 (\pm 0,70) ^a	2,06 (\pm 1,78) ^b	9,68 (\pm 1,30) ^{b, d}

NaOCl: hipoclorito de sódio; AC: ácido cítrico; VM: vinagre de maçã.

^{a, b, c, d} Letras diferentes representam diferença estatística significativa de acordo com o Teste de Tukey (P<0,05).

Na coleta realizada imediatamente após o preparo biomecânico, todas as soluções irrigadoras utilizadas reduziram significativamente o número de bactérias do interior do canal radicular (Figura 1). NaOCl a 2,5% isolado (GI) ou associado com vinagre de maçã (GIII), clorexidina a 2% (GV) e ácido peracético a 1% (GVI) eliminaram totalmente *E. faecalis* da luz do canal radicular principal, sendo semelhantes entre si e significativamente diferentes dos demais grupos (P<0,05), conforme mostra a Tabela 1.

FIGURA 1 - Comparação entre as coletas inicial, pós-preparo e final em cada grupo (média de UFC/mL log)



Já na coleta final, sete dias após instrumentação e irrigação, houve um aumento na contagem de UFC/mL em todos os grupos (Figura 1). NaOCl a 2,5% (GI), clorexidina a 2% (GV) e ácido peracético a 1% (GVI) apresentaram resultados semelhantes entre si e significativamente menores que os demais grupos ($P < 0,05$), de acordo com a Tabela 1.

Na Tabela 2, verifica-se que em todos os grupos avaliados houve um número reduzido ou ausência de *E. faecalis* logo após o preparo biomecânico. Porém, na coleta final, todos os espécimes apresentaram culturas positivas, sendo que no grupo do vinagre de maçã (GIV), a contagem de UFC/mL foi semelhante à coleta inicial. Os cinco espécimes do grupo controle, que não foram instrumentados após o período de contaminação, comprovaram a viabilidade de *E. faecalis* nas diferentes etapas do experimento.

TABELA 2 - Comparação entre as coletas inicial, pós-preparo e final em cada grupo (média de UFC/mL log)

Coleta	GI	GII	GIII	GIV	GV	GVI	GVII	Controle
Inicial	11,00 ^a	10,85 ^a	11,15 ^a	11,13 ^a	10,65 ^a	11,07 ^a	11,03 ^a	11,51 ^a
Pós-preparo	0,00 ^b	1,47 ^b	0,00 ^b	2,06 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	2,06 ^b	11,02 ^a
Final	6,40 ^c	8,89 ^c	9,71 ^c	10,47 ^a	7,77 ^c	8,01 ^c	9,68 ^c	10,23 ^a

^{a, b, c} Letras diferentes representam diferença estatística significativa de acordo com o Teste de Bonferroni (P<0,05).

DISCUSSÃO

Várias metodologias são empregadas para avaliar o efeito antimicrobiano de soluções irrigadoras. Existem modelos experimentais que permitem o contato direto das substâncias com os microrganismos na forma planctônica ou de biofilme. Estudos que utilizam dentes bovinos ou humanos possibilitam a presença dos microrganismos nos túbulos dentinários, proporcionando condição mais semelhante à situação *in vivo*.³¹

E. faecalis foi escolhido como microrganismo, devido à sua alta prevalência em casos de insucesso endodôntico e capacidade de sobrevivência em monocultura.⁸ O período de contaminação adotado foi de 21 dias para possibilitar que a difusão da suspensão de *E. faecalis* pelos túbulos dentinários, conforme Berber et al.¹¹ e Cardoso et al.²⁹ Foi realizada adição de meio de cultura a cada dois dias, para manutenção das condições favoráveis para o crescimento bacteriano.

Após conclusão do preparo, agentes neutralizantes específicos foram aplicados nos canais radiculares, para impedir que vestígio do irrigante

fosse transferido para o tubo teste, alterando a recuperação bacteriana. Assim, o uso de neutralizante possibilita a avaliação da atuação da solução irrigadora apenas durante os procedimentos de preparo biomecânico.

O método de coleta microbiológica foi realizado por meio de cones de papel, por ser efetivo e de fácil execução, embora limitado a luz do canal radicular principal. Desta forma, sete dias após instrumentação, a segunda coleta foi realizada para verificar a permanência de bactérias viáveis no sistema de canais radiculares.^{29,31,32}

Os resultados deste estudo mostraram que todos os irrigantes empregados, inclusive a solução salina, reduziram significativamente *E. faecalis* imediatamente após o preparo biomecânico. Entretanto, houve um aumento de UFC/mL sete dias após a instrumentação em todos os grupos, destacando a permanência da contaminação no sistema de canais radiculares. Tal fato poderia ser explicado pela: 1) permanência de bactérias na *smear layer*; 2) formação de biofilme, tornando as células bacterianas mais resistentes do que na forma planctônica; 3) persistência de bactérias no interior dos túbulos dentinários e ramificações do canal principal. Tais resultados estão em concordância com os achados de Byström e Sundqvist,³³ os quais demonstraram *in vivo* que bactérias remanescentes ao preparo biomecânico recolonizam os canais radiculares que permanecem sem medicação entre as sessões de tratamento.

A solução de NaOCl foi avaliada na concentração de 2,5%, uma vez que concentrações mais elevadas são irritantes aos tecidos vivos.¹⁰ NaOCl eliminou totalmente *E. faecalis* na coleta logo após a instrumentação, permitindo

o crescimento bacteriano após sete dias de incubação, o que está de acordo com os resultados obtidos por outros autores.^{31,32,34}

A associação NaOCl + ácido cítrico apresentou menor atividade antibacteriana que o NaOCl puro nas duas coletas realizadas. Uma possível explicação para tal fato seria a evaporação de gás cloro durante a interação das duas substâncias, antes da atuação no canal radicular, conforme comprovado por Baumgartner e Ibay.³⁵

Para a associação NaOCl + vinagre de maçã, nenhuma bactéria foi recuperada na coleta realizada logo após o preparo, de forma semelhante ao NaOCl puro. Porém, após sete dias, a contagem de UFC/mL foi superior ao NaOCl. Assim, a associação com soluções ácidas não demonstrou vantagens com relação ao efeito bactericida do NaOCl, ao contrário dos achados de Camps et al.¹³ Entretanto, estes autores partiram de uma solução mais concentrada (NaOCl a 10%) associada ao ácido clorídrico para obter NaOCl a 2,5% com pH neutro, possivelmente potencializando o efeito irritante sobre os tecidos periapicais.

O vinagre de maçã puro proporcionou redução significativa de *E. faecalis* logo após a instrumentação, mas na coleta final o número de bactérias foi semelhante ao da coleta inicial. A motivação para utilizá-lo foi a busca por um produto de baixo custo, biodegradável e de fácil acesso.

Estudos in vitro e in vivo já demonstraram a eficácia da clorexidina a 2% sobre *E. faecalis*.^{34,36} Porém, quando comparada ao NaOCl, resultados contraditórios são encontrados na literatura, dependendo da concentração e metodologia empregada.²⁸ Nossos resultados demonstraram atividade

antibacteriana semelhante para a clorexidina a 2% e o NaOCl a 2,5% nas duas coletas. Isto difere dos achados de Dametto et al.³² que verificaram a ausência de bactérias sete dias após a irrigação com clorexidina, empregando contaminação por sete dias, inferior ao período de 21 dias utilizado no presente estudo, o que pode promover menor penetração de *E. faecalis* nos túbulos dentinários.

O ácido peracético tem sido estudado em concentrações diversas, variando de 0,2 a 10%.^{20,25-27} Lottanti et al.²⁵ empregaram microscopia eletrônica de varredura e verificaram erosão dentinária com ácido peracético a 2,25%, portanto optamos por uma concentração menor. Sua ação sobre *E. faecalis* foi semelhante a do NaOCl e da clorexidina nas duas coletas, sendo superior aos demais grupos.

Este estudo demonstra que nenhum irrigante foi capaz de erradicar *E. faecalis* do sistema de canais radiculares, reforçando a importância do curativo de demora entre sessões. A ação antibacteriana compreende apenas um dos aspectos a serem avaliados para indicação de uma solução irrigadora. Pesquisas referentes à propriedade de dissolução tecidual, limpeza de paredes dentinárias e biocompatibilidade são igualmente importantes na análise de substâncias químicas com potencial de uso na irrigação endodôntica.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP (2008/03298-2) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965; 20:340-9.
2. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod* 1992; 18:427-30.
3. Lin LM, Skribner JE, Gaengler P. Factors associated with endodontic treatment failures. *J Endod* 1992; 18:625-7.
4. Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1997; 30:297-306.
5. Siqueira Jr JF, Rôças IN, Moraes SR, Santos KRN. Direct amplification of rRNA gene sequences for identification of selected oral pathogens in root canal infections. *Int Endod J* 2002; 35:345-51.
6. Schirrmester JF, Liebenow AL, Pelz K, Wittmer A, Serr A, Hellwig E, et al. New bacterial compositions in root-filled teeth with periradicular lesions. *J Endod* 2009; 35:169-74.
7. Love RM. *Enterococcus faecalis*: a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001; 34:399-405.
8. Stuart CH, Schwartz AS, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 2006; 32:93-8.
9. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod*. 2006; 32:389-98.

10. Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *Int Dent J* 2008; 58:329-41.
11. Berber VB, Gomes BPFA, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CCR, Zaia AA, et al. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canal and dentinal tubules. *Int Endod J* 2006; 39:10-7.
12. Sirtes G, Waltimo T, Schaetzle M, Zehnder M. The effects of temperature on sodium hypochlorite short-term stability, pulp dissolution capacity, and antimicrobial efficacy. *J Endod* 2005; 31:669-71.
13. 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-e73.
14. Mercade M, Duran-Sindreu F, Kuttler S, Roig M, Durany N. Antimicrobial efficacy of 4.2% sodium hypochlorite adjusted to pH 12, 7.5 and 6.5 in infected human root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 107:295-8.
15. Baker RJ. Types and significance of chlorine residuals. *J Am Water Works Assoc* 1959; 51:1185-90.
16. Bloomfield SF, Miles GA. The antibacterial properties of sodium dichloroisocyanurate and sodium hypochlorite formulations. *J Appl Bacteriol* 1979; 46:65-73.

17. Delany GM, Patterson SS, Miller CH, Newton CW. The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1982; 53:518-23.
18. Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LAB, Nelson Filho P, Bonifácio KC, Koga-Ito IY. *In vivo* antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *J Endod* 1999; 25:167-71.
19. Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J* 2009; 42:288-302.
20. Naenni N, Thoma K, Zehnder M. Soft Tissue Dissolution Capacity of Currently used and Potential Endodontic Irrigant. *J Endod* 2004; 30:785-7.
21. Yamashita JC, Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Rossi MA, Silva LAB. Scanning electron microscopic study of the cleaning ability of chlorhexidine as a root-canal irrigant. *Int Endod J* 2003; 36:391-4.
22. Estrela C, Holland R, Bernabe PFE, Souza V, Estrela CRA. Antimicrobial potencial of medicaments used in healing process in dog's teeth with apical periodontitis. *Braz Dent J* 2004; 15:181-5.
23. Zandim DL, Côrrea FOB, Sampaio JEC, Rossa Jr C. The influence of vinegars on exposure of dentinal tubules: a SEM evaluation. *Braz Oral Res* 2004; 18:63-8.
24. Rutala WA, Weber DJ. Clinical effectiveness of low-temperature sterilization technologies. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998; 19:789-804.

25. Lottanti S, Gautschi H, Sener B, Zehnder M. Effects of ethylenediaminetetraacetic, etidronic and peracetic acid irrigation on human root dentine and the smear layer. *Int Endod J* 2009; 42:335-43.
26. Montebugnoli L, Cherson S, Prati C, Dolci G. A between-patient disinfection method to control water line contamination and biofilm inside dental units. *J Hosp Infect* 2004; 56:297-304.
27. Chassot ALC, Poisl MI, Samuel SMW. *In vivo* and *in vitro* evaluation of the efficacy of a peracetic acid-based disinfectant for decontamination of acrylic resins. *Braz Dent J* 2006; 17:117-21.
28. Estrela C, Silva JA, Alencar AHG, Leles CR, Decurcio DA. Efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* – a systematic review. *J Appl Oral Sci* 2008; 16:364-8.
29. Cardoso MG, Oliveira LD, Koga-Ito CY, Jorge AO. Effectiveness of ozonated water on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, and endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 105: 85-91.
30. Hugo WB, Russel AD. *Pharmaceutical Microbiology*. 3th ed. Oxford: Blackwell Science; 1983. p. 223-4.
31. Menezes MM, Valera MC, Jorge AOC, Koga-Ito CY, Camargo CHR, Mancini MNG. *In vitro* evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Int Endod J* 2004; 37:311-9.

32. Dametto FR, Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *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 2005; 99:768-72.
33. Byström A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. Int Endod J 1985; 18:35-40.
34. Oliveira DP, Barbizam JVB, Trope M, Teixeira FB. *In vitro* antibacterial efficacy of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2007; 103:702-6.
35. Baumgartner JC, Ibay AC. The chemical reactions of irrigants used for root canal debridement. J Endod 1987; 13:47-51.
36. Cook J, Nandakumar R, Fouad AF. Molecular- and culture-based comparison of the effects of antimicrobial agents on bacterial survival in infected dentinal tubules. J Endod 2007; 33:690-2.

Considerações finais

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tema deste estudo foi escolhido em função da importância dos microrganismos e seus produtos na etiologia das doenças pulpares e periapicais^{24,49}, além de estarem diretamente relacionados com o insucesso do tratamento endodôntico^{28,44}. Pesquisas onde canais radiculares infectados foram instrumentados e irrigados com solução fisiológica demonstram apenas uma redução na microbiota, sendo necessário o uso de soluções desinfetantes para que um maior percentual de microrganismos seja eliminado^{14,31}. Desta forma, estudar a ação de novas substâncias químicas que atuem sobre a microbiota endodôntica é fundamental para o sucesso desta terapia.

Atualmente, o NaOCl é a solução irrigadora mais difundida em todo o mundo, mas não há um consenso quanto à escolha de sua concentração. Alguns estudos já demonstraram que quanto maior a concentração da solução, maior seu poder de dissolução tecidual e ação bactericida^{2,6,39}. No entanto, quanto mais concentrada a solução de NaOCl, maior será seu efeito irritante quando em contato com os tecidos vivos apicais e periapicais^{33,50}. Portanto, a Faculdade de Odontologia de Araraquara tem indicado a solução de NaOCl a 2,5% para casos de necrose pulpar com lesão periapical e casos de retratamento endodôntico.

Surgiu, desta forma, o interesse em avaliar a possibilidade de potencializar a atividade antimicrobiana do NaOCl a 2,5%, alterando seu pH, sem precisar aumentar sua concentração. A influência do pH sobre a efetividade desta substância foi recentemente comprovada por Camps et al.¹¹ (2009) e Mercade et

al.³² (2009). Porém, nossos resultados *in vitro* e *ex vivo* não demonstraram vantagem ao associar NaOCl com ácido cítrico ou vinagre de maçã, quando o pH foi reduzido para 5. Portanto, pesquisas adicionais que esclareçam as interações químicas de NaOCl com diferentes tipos de ácidos são necessárias para a escolha de uma substância ideal para ajuste de seu pH e possível aumento de sua atividade antimicrobiana, não somente sobre *E. faecalis*, mas também sobre outras espécies.

O vinagre de maçã puro não apresentou bons resultados nos estudos *in vitro* e *ex vivo*, portanto não parece ser indicado como solução irrigadora isoladamente. No entanto, alguns autores já demonstraram sua capacidade de remoção da *smear layer*^{17,51}. Então, por se tratar de uma substância biodegradável e de baixo custo, acreditamos serem válidos mais estudos com o vinagre de maçã utilizado ao final do preparo biomecânico.

A solução de clorexidina a 2% apresentou efetividade sobre *E. faecalis* da mesma forma que o NaOCl a 2,5% nas coletas realizadas logo após a instrumentação e após sete dias (estudo *ex vivo*). Nos casos onde estejam presentes remanescentes teciduais, o NaOCl parece ser a melhor opção devido à sua capacidade de dissolução de matéria orgânica, não demonstrada pela clorexidina^{34,37}.

O ácido peracético a 1% demonstrou a mesma efetividade do NaOCl a 2,5% no estudo *ex vivo*. Assim como a clorexidina, ele não tem a propriedade de dissolução tecidual³⁷, mas já se mostrou capaz de remover a *smear layer*²⁹. Desta forma, parece importante o estudo de sua atuação quando utilizado ao final do preparo biomecânico, após o uso do NaOCl, possivelmente

complementando a desinfecção dos canais radiculares e auxiliando na limpeza das paredes dentinárias. Sua biocompatibilidade também necessita maiores investigações.

Outro aspecto importante, que deve ser futuramente estudado, é a atuação destas soluções irrigadoras e associações sobre *E. faecalis* na forma de biofilme, utilizando técnicas de microscopia. O biofilme bacteriano pode ser definido como uma comunidade estruturada de células envolvidas por uma matriz de polissacarídeos, sempre aderida a um substrato sólido úmido ou meio líquido, do qual elas podem retirar seus nutrientes, constituindo uma forma de proteção ao desenvolvimento bacteriano¹³.

Nossos resultados demonstraram que nenhum dos irrigantes testados foi capaz de erradicar *E. faecalis* do sistema de canais radiculares, pois apesar de encontrarmos contagens nulas logo após a instrumentação, após sete dias houve a recolonização do canal radicular principal, provavelmente por bactérias provenientes de suas ramificações e dos túbulos dentinários. Tais dados reforçam a importância do curativo de demora entre sessões, atuando na massa dentinária, canais laterais e deltas apicais, ou seja, áreas que estão fora do alcance das soluções irrigadoras e instrumentos endodônticos.

Referências

REFERÊNCIAS*

1. Abiclor. Associação Brasileira da Indústria de Álcalis e Cloro Derivados. Manual de hipoclorito de sódio. São Paulo: [s. n.]; 1993. 32 p.
2. Abou-Rass M, Oglesby SW. The effects of temperature, concentration, and tissue type on the solvent ability of sodium hypochlorite. J Endod. 1981; 7: 376-7.
3. Assed S, Ito IY, Leonardo MR, Silva LAB, Lopatin DE. Anaerobic microorganisms of human teeth with chronic apical periodontitis detected by indirect immunofluorescence. Endod Dent Traumatol. 1996; 12: 66-9.
4. Baker RJ. Types and significance of chlorine residuals. J Am Water Works Assoc. 1959; 51: 1185-90.
5. Baumgartner JC. Microbiologic aspects of endodontic infections. J Calif Dent Assoc. 2004; 32: 459-68.
6. Berber VB, Gomes BPFA, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CCR, Zaia AA, et al. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canal and dentinal tubules. Int Endod J. 2006; 39: 10-7.
7. Bergenholtz G. Pathogenic mechanisms in pulpal disease. J Endod. 1990; 16: 98-101.

* Estilo Vancouver. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

8. Bloomfield SF, Miles GA. The antibacterial properties of sodium dichloroisocyanurate and sodium hypochlorite formulations. *J Appl Bacteriol.* 1979; 46: 65-73.
9. Byström A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J.* 1985; 18: 35-40.
10. Caligiani A, Acquotti D, Palla G, Bocchi V. Identification and quantification of the main organic components of vinegars by high resolution ¹H NMR spectroscopy. *Anal Chim Acta.* 2007; 585: 110-9.
11. 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-e73.
12. Chassot ALC, Poisl MI, Samuel SMW. *In vivo* and *in vitro* evaluation of the efficacy of a peracetic acid-based disinfectant for decontamination of acrylic resins. *Braz Dent J.* 2006; 17: 117-21.
13. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318-22.
14. Dalton BC, Orstavik D, Phillips C, Pettiette M, Trope M. Bacterial reduction with nickel-titanium instrumentation. *J Endod.* 1998; 24: 763-7.

15. Delany GM, Patterson SS, Miller CH, Newton CW. The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1982; 53: 518-23.
16. Estrela C, Holland R, Bernabe PFE, Souza V, Estrela CRA. Antimicrobial potencial of medicaments used in healing process in dog's teeth with apical periodontitis. *Braz Dent J.* 2004; 15: 181-5.
17. Estrela C, Lopes HP, Elias CN, Leles CR, Pécora JD. Limpeza da superfície do canal radicular pelo vinagre de maçã, hipoclorito de sódio, clorexidina e EDTA. *Rev Assoc Paul Cir Dent.* 2007; 61: 117-22.
18. Estrela C, Silva JA, Alencar AHG, Leles CR, Decurcio DA. Efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* – a systematic review. *J Appl Oral Sci.* 2008; 16: 364-8.
19. Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spanó JC, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J.* 2002; 13: 113-7.
20. Ferreira EL, Ferreira IRC, Sanmartin JA, Verotti MP, Martins ST. Fluxo e processamento de artigos. In: Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Serviços odontológicos: prevenção e controle de riscos. Brasília: Editora ANVISA; 2007. p. 75-87.
21. Gomes BPFA, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *J Endod.* 2008; 34: 537-40.

22. Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol*. 2004; 19: 71-6.
23. Haapasalo M, Udnaes T, Endal U. Persistent, recurrent and acquired infection of the root canal system post-treatment. *Endod Topics*. 2003; 6: 29-56.
24. 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.
25. Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004; 15: 308-20.
26. Leonardo MR. Endodontia: tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos. São Paulo: Artes Médicas; 2005. 1491 p.
27. Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LAB, Nelson Filho P, Bonifácio KC, Koga-Ito IY. *In vivo* antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *J Endod*. 1999; 25: 167-71.
28. Lin LM, Skribner JE, Gaengler P. Factors associated with endodontic treatment failures. *J Endod*. 1992; 18: 625-7.
29. Lottanti S, Gautschi H, Sener B, Zehnder M. Effects of ethylenediaminetetraacetic, etidronic and peracetic acid irrigation on human root dentine and the smear layer. *Int Endod J*. 2009; 42: 335-43.

30. Love RM. *Enterococcus faecalis*: a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J*. 2001; 34: 399-405.
31. Menezes MM, Valera MC, Jorge AOC, Koga-Ito CY, Camargo CHR, Mancini MNG. *In vitro* evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Int Endod J*. 2004; 37: 311-9.
32. Mercade M, Duran-Sindreu F, Kuttler S, Roig M, Durany N. Antimicrobial efficacy of 4.2% sodium hypochlorite adjusted to pH 12, 7.5 and 6.5 in infected human root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 107: 295-8.
33. Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *Int Dent J*. 2008; 58: 329-41.
34. Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J*. 2009; 42: 288-302.
35. Montebugnoli L, Cherson S, Prati C, Dolci G. A between-patient disinfection method to control water line contamination and biofilm inside dental units. *J Hosp Infect*. 2004; 56: 297-304.
36. Morris JC. Future of chlorination. *J Am Water Works Assoc* 1966; 58: 1475-82.
37. Naenni N, Thoma K, Zehnder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigant. *J Endod*. 2004; 30: 785-7.

38. Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 99: 231-52.
39. Oliveira DP, Barbizam JVB, Trope M, Teixeira FB. *In vitro* antibacterial efficacy of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 103: 702-6.
40. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 2003; 36: 1-11.
41. Roças IN, Siqueira Jr JF, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod.* 2004; 30: 315-20.
42. Rutala WA, Weber DJ. Clinical effectiveness of low-temperature sterilization technologies. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1998; 19: 789-804.
43. Seltzer S, Farber PA. Microbiologic factors in endodontology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994; 78: 634-45.
44. Siqueira Jr JF. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J.* 2001; 34: 1-10.
45. Siqueira Jr JF. Tratamento das infecções endodônticas. Rio de Janeiro: medsi; 1997. 196 p.

46. Siqueira Jr JF, Roças IN. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Braz Dent J.* 2007; 18: 267-80.
47. Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1997; 30: 297-306.
48. Stuart CH, Schwartz AS, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.* 2006; 32: 93-8.
49. Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps [dissertation]. Umea, Sweden: Umea University Odontological; 1976.
50. Yesilsoy C, Whitaker E, Cleveland D, Phillips E, Trope M. Antimicrobial and toxic effects of established and potencial root canal irrigants. *J Endod.* 1995; 21: 513-15.
51. Zandim DL, Côrrea FOB, Sampaio JEC, Rossa Jr C. The influence of vinegars on exposure of dentinal tubules: a SEM evaluation. *Braz Oral Res.* 2004; 18: 63-8.
52. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod.* 2006; 32: 389-98.

Anexos

ANEXO 1

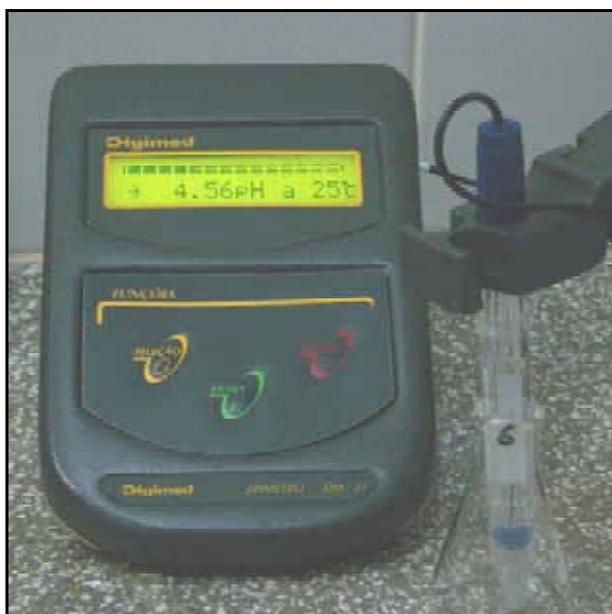


FIGURA 1A - pHmetro digital.



FIGURA 1B - Titulador potenciométrico automático.

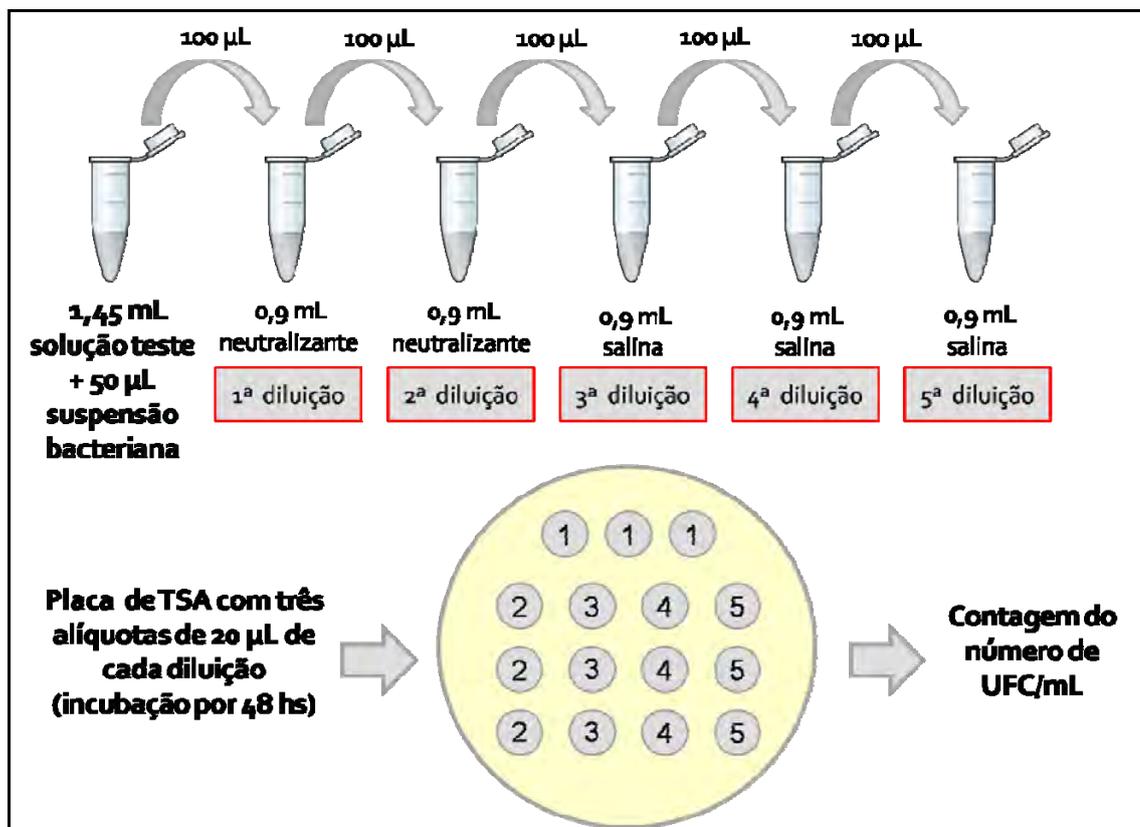


FIGURA 1C – Fluxograma da técnica de contato direto.

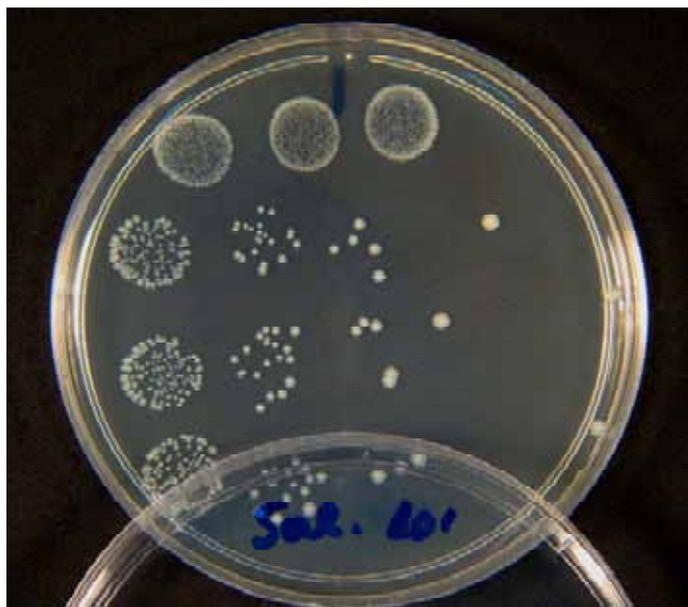
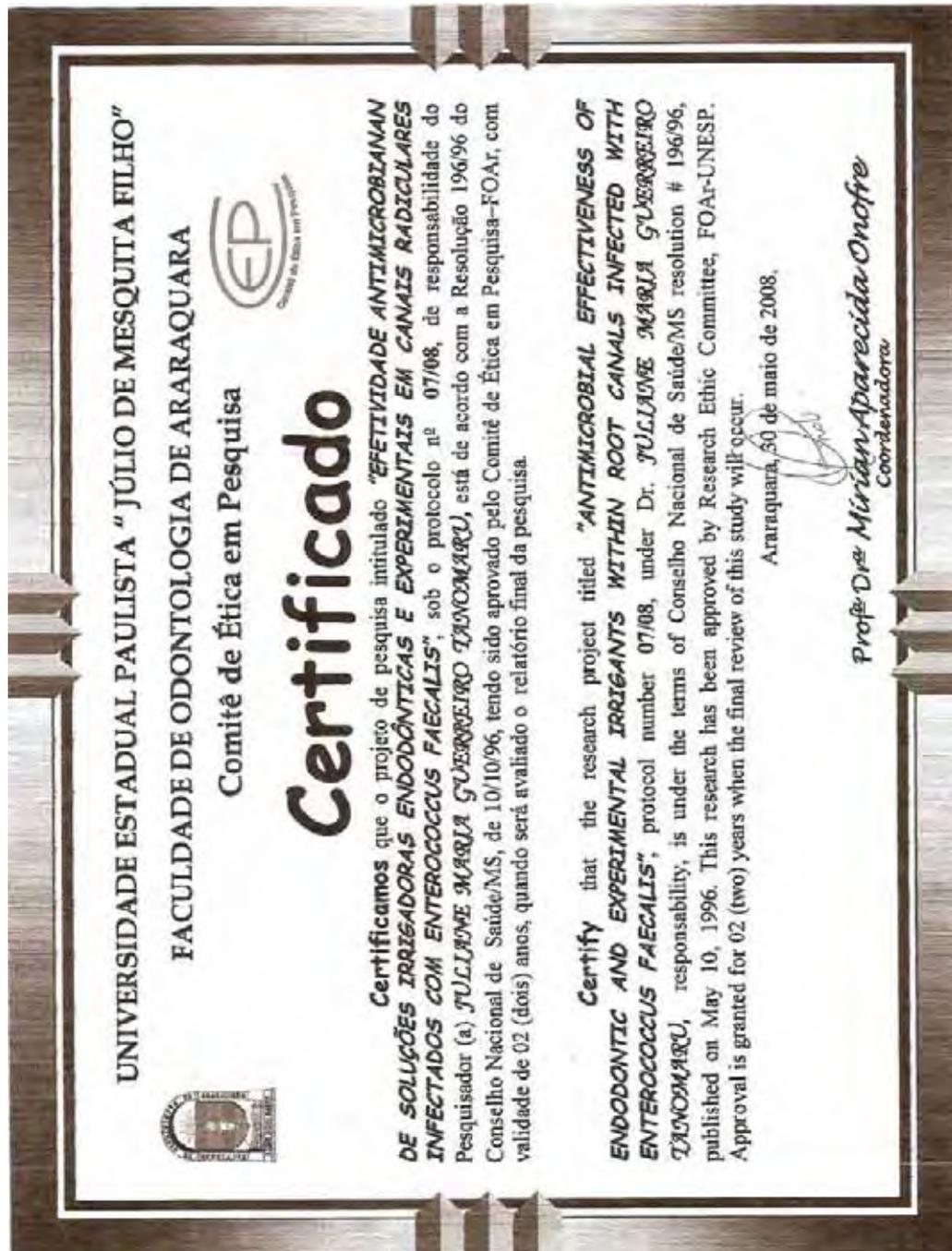


FIGURA 1D - Crescimento bacteriano em meio TSa (solução salina).

ANEXO 2

Certificado de aprovação no Comitê de Ética



ANEXO 3

FIGURA 3A - Espécimes fixados com resina acrílica em microplaca.



FIGURA 3B - *E. faecalis* em placas de Petri com TSa (grupo controle).



FIGURA 3C - Irrigação e aspiração dos canais radiculares.

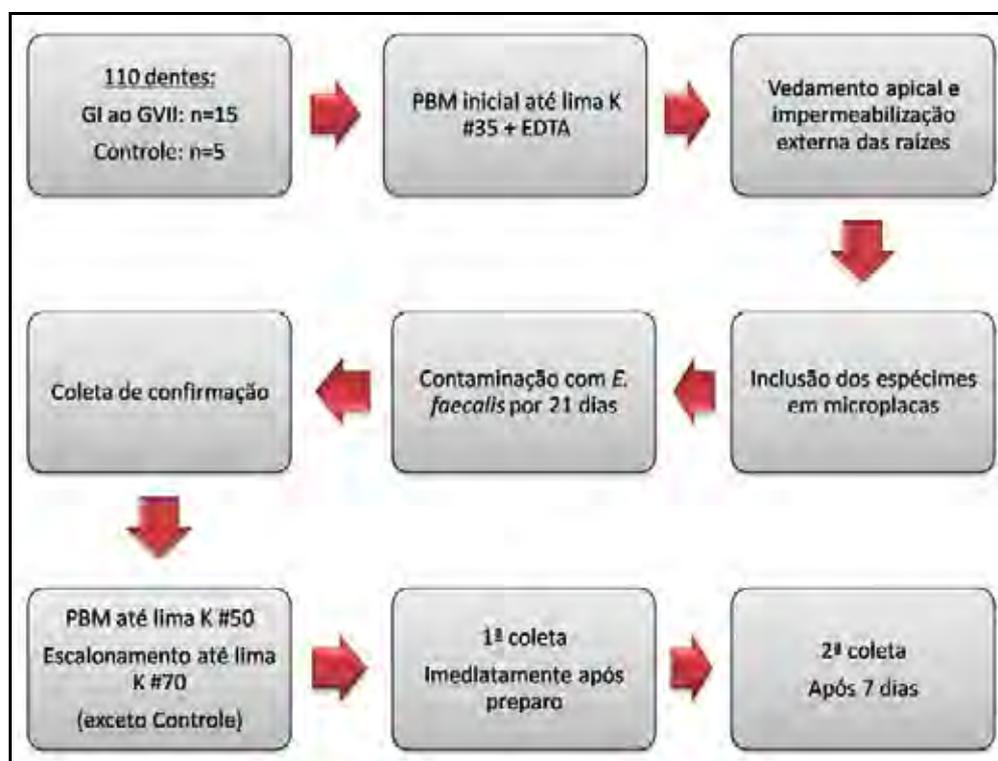


FIGURA 3D - Fluxograma da metodologia.

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

Araraquara, 25 de março de 2010.

RENATA DORNELLES MORGENTAL