

ROSEMARY SOARES DE SANTANA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA AÇÃO DE SUBSTÂNCIAS
QUÍMICAS AUXILIARES, CLOREXIDINA E MEDICAÇÕES
INTRACANAIS SOBRE *Candida albicans*, *Enterococcus
faecalis*, *Escherichia coli* E SUA ENDOTOXINA EM CANAIS
RADICULARES**



2011

ROSEMARY SOARES DE SANTANA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA AÇÃO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS
AUXILIARES, CLOREXIDINA E MEDICAÇÕES INTRACANAIS SOBRE
Candida albicans, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* E SUA
ENDOTOXINA EM CANAIS RADICULARES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Universidade Estadual Paulista, como parte das exigências para a obtenção do grau de CIRURGIÃO-DENTISTA.

Orientadora: Profa. Tit. Márcia Carneiro Valera

São José dos Campos
2011

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 26 de Agosto de 2011.

Rosemary Soares de Santana

Email: roseskema@hotmail.com

BANCA EXAMINADORA

Profª Tit. Márcia Carneiro Valera

Departamento de Odontologia Restauradora

Profª. Adj. Ana Paula Martins Gomes

Departamento de Odontologia Restauradora

Prof. Adj. José Benedito Oliveira Amorim

Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal

São José dos Campos, 26 de Agosto de 2011.

DEDICATÓRIA

Dedico não apenas este trabalho como toda a minha graduação e muito do que serei profissionalmente a uma pessoa muito especial que me ensinou o primeiro passo nesta sublime arte que é a odontologia, Dra. Cleide Regina Raimondi a qual espero que onde quer que esteja receba este carinho e homenagem, pois se um dia eu conseguir ser um pouco do que ela foi, serei uma pessoa muito feliz.

Obrigada pelo carinho, atenção e amizade dedicados a mim, e principalmente por acreditar em minha capacidade mesmo quando até eu duvidava ser.

Que Deus esteja contigo sempre.

AGRADECIMENTOS

Não conseguiria nada na vida sem a presença eterna e paterna de um Deus tão bom e maravilhoso que tudo sabe, tudo vê e tudo faz. Minha vida e meu agradecimento inicial com certeza a Ele, pois não seria o que sou se assim não o fosse permitido e esperado.

Agradeço à minha família, meus pais, meus irmãos, meu cunhado e meu sobrinho, por toda atenção e paciência, carinho e amor, dedicação e auxílio, pois amo a todos e sou muito grata por fazerem parte da minha vida. Com certeza são os responsáveis pelo que sou e são meu maior motivo para crescer e buscar cumprir meus objetivos na vida.

À Prof^a Márcia Carneiro Valera que me ensinou muito na odontologia, mas principalmente, me ensinou que valores e ética não se perde e não se trai. São a base do nosso caráter e assim nos torna muito mais dignos do amor do Nosso Deus. És muito especial e abençoada.

Obrigada ao Prof^o José Benedito Oliveira Amorim e a Prof^a Ana Paula Martins Gomes pelo carinho, atenção durante minha graduação, por aceitarem fazer parte da minha banca e por mais uma vez contribuírem com meu aprendizado nesse momento tão importante. Que Deus os abençoe sempre e que seus ensinamentos sejam fecundados em muitos mais corações.

Não posso deixar de agradecer à Adriana Chung e Flávia G. Rosa Cardoso que me ajudaram no desenvolver de todo este trabalho, pois são muito atenciosas, cuidadosas e me ensinaram o quão importante e o quanto torna mais fácil o nosso trabalho quando se tem organização e colaboração. E com certeza devo agradecer a FAPESP que me deu a possibilidade de realizar este trabalho com seu literal “pai-trocínio”.

E por fim, mas muito importante, agradecer a todos os meus amigos de graduação da 8^a Turma Noturno, os quais espero levar como tais por muitos e muitos anos. Fomos mais que uma equipe ao longo desses seis anos, fomos uma família. Foi a participação intensa de vários deles que me mantiveram forte em momentos difíceis pelos quais imaginava não conseguir finalizar. Meu carinho, minha admiração, minha amizade e meu desejo de uma vida plena de sucesso a todos.

Graças vou dou, Senhor, por serdes a fonte de que dimana todo o bem que me sucede. "Os que esperam no Senhor renovam suas forças, sobem com asas de águias, correm e não se cansam, caminham e não se fatigam."

Isaias 40:31

Avaliação *in vitro* da ação de substâncias químicas auxiliares, clorexidina e medicações intracanaís sobre *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e sua endotoxina em canais radiculares*

***In vitro* evaluation of auxiliary chemical substances, chlorhexidine and intracanal medications against *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and its endotoxins in root canals**

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana da clorexidina gel 2%, como substância química auxiliar ao preparo biomecânico e medicação intracanal sobre *C. albicans*, *E. faecalis*, *E. coli* e endotoxinas em canais radiculares. Foram utilizados 48 dentes humanos unirradiculados, divididos em 4 grupos de acordo a medicação intracanal (MIC): 1) Ca(OH)₂ + solução salina fisiológica apirogênica; 2) clorexidina gel 2% (CLX); 3) Ca(OH)₂ + CLX; e 4) solução salina fisiológica apirogênica. Foram realizadas coletas do conteúdo do canal radicular para confirmar a presença dos microrganismos (confirmação), imediatamente após a instrumentação (1ª coleta), após 7 dias do PBM (2ª coleta), após 14 dias da ação da MIC (3ª coleta) e 7 dias após remoção da MIC (4ª coleta). Para todas as coletas foram realizados os testes: a) avaliação da atividade antimicrobiana; b) análise do conteúdo de endotoxinas. Os resultados foram submetidos à análise estatística de Kruskal- Wallis e Dunn com significância de 5%. Verificou-se que a CLX como substância química auxiliar reduziu significativamente microrganismos quando comparados a coleta de confirmação. Quanto à

* Artigo elaborado de acordo com as normas do Periódico **Brazilian Dental Science** (ISSN 2178-

11). neutralização de endotoxinas, verificou-se que na 1ª e 2ª coletas houve redução percentual média de 92,03 e 98,10% respectivamente, quando comparadas à coleta de confirmação. Nas 3ª e 4ª coletas o grupo Ca(OH)₂ + CLX apresentou os melhores resultados. Concluiu-se que o PBM bem como as MIC são capazes de eliminar os microrganismos, entretanto, não são capazes de eliminar completamente endotoxinas do canal radicular.

UNITERMOS

Medicação intracanal; clorexidina; hidróxido de cálcio; endotoxinas; microrganismos.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the antimicrobial activity of chlorhexidine gel 2% as auxiliary chemical substance on the biomechanical preparation (BMP) and medication intracanal (ICM) on *C. albicans*, *E. faecalis*, *E. coli* and their endotoxin in root canals. We used 48 single-rooted human teeth divided into four groups according to dressing ICM: 1) Ca(OH)₂ + pyrogen-free saline solution; 2) 2% chlorhexidine gel (CLX); 3) Ca(OH)₂ + CLX, and; 4) pyrogen-free saline solution (control group). Were collected the contents of root canals to confirm the presence of microorganisms (confirmation), immediately after instrumentation (1st collection), after 7 days of the BMP (2nd collection), after 14 days of the action of ICM (3rd Collection) and 7 days after removal of the ICM (4 th collection). Were performed: the evaluation of antimicrobial activity and the content analysis of endotoxins for all sampling tests. The results were statistically analyzed using Kruskal-Wallis and Dunn tests with a significance of 5%. It was found that the CLX as auxiliary chemical substance has significantly reduced microorganisms confirmation collection when compared. In relation to the neutralization of endotoxin, it was found that the 1st and 2nd collections presented a decrease of

92.03% and 98.10% in mean percentage respectively, when compared to the confirmation collection. In the 3rd and 4th samplings, the Ca (OH)₂ + CLX group showed the best results. It was concluded that the BMP and the ICM were able to eliminate the tested microorganisms, however, they were not able to completely eliminate endotoxins root canal.

UNITERMS

Intracanal medications; chlorhexidine; calcium hydroxide; endotoxins; microorganisms.

INTRODUÇÃO

As infecções endodônticas são consideradas polimicrobianas, sendo que centenas de espécies bacterianas já foram isoladas de canais radiculares infectados. Fungos e bactérias facultativas anaeróbias estão presentes em canais radiculares. Maekawa et al. [1] identificaram que 15,3% dos canais radiculares com necrose pulpar continham leveduras do gênero de *Candida albicans*. Outro microrganismo freqüentemente isolado nos casos de infecção pulpar e infecções persistentes pós-tratamento endodôntico é *Enterococcus faecalis*, pois penetra em profundidade nos túbulos dentinários, sendo de difícil eliminação após preparo biomecânico [2]. Dentre os microrganismos presentes, as bactérias Gram-negativas apresentam grande significância no aparecimento e manutenção de lesões periapicais, uma vez que estas bactérias liberam endotoxinas com potente ação citotóxica durante sua duplicação ou morte celular, levando a uma reação inflamatória, imunológica e reabsorção óssea periapical. Portanto, faz-se necessário o estudo de substâncias químicas utilizadas durante a terapia endodôntica que possam eliminar estes microrganismos e neutralizar estas substâncias flogísticas. Apesar de *Escherichia coli* não ser uma bactéria comumente encontrada em canais radiculares, sua endotoxina apresenta a estrutura que representa o centro ativo responsável pela toxicidade do

LPS. Assim, esta bactéria tem sido utilizada para avaliar substâncias capazes de neutralizar endotoxinas [3]. Nos dias atuais, o tratamento endodôntico de dentes portadores de necrose pulpar e reação periapical crônica, não deve ter como objetivo apenas a eliminação dos microrganismos, mas também a inativação de suas endotoxinas e demais produtos tóxicos. Sabe-se que é objetivo do preparo biomecânico a limpeza e desinfecção do sistema de canais radiculares, acompanhado da preservação da sanificação obtida pela utilização de substâncias químicas auxiliares, medicação intracanal e cimentos obturadores. Durante o preparo biomecânico (PBM), várias substâncias químicas têm sido utilizadas como soluções irrigadoras. Atualmente, a clorexidina 2% (CLX) tem sido utilizada devido aos seus efeitos antimicrobianos, ação residual e biocompatibilidade [4]. Estudos demonstram que o PBM não é capaz de eliminar todos os microrganismos e endotoxinas que podem permanecer no sistema de canais, túbulos dentinários sendo necessária a utilização de substâncias químicas associadas a medicações intracanaís [5]. A importância da eliminação de microrganismos e seus produtos do interior do sistema de canais radiculares em relação ao sucesso do tratamento endodôntico justificam a busca constante de medicamentos capazes de eliminar estes microrganismos. O digluconato de clorexidina tem sido proposto como substância química auxiliar ao preparo biomecânico dos canais radiculares em função de seus efeitos antimicrobianos, capacidade de adsorção [6,7,8,9,10], baixa toxicidade mesmo em maiores concentrações e propriedades de substantividade ou efeito residual [11] o que mostra sua eficácia no tratamento endodôntico, entretanto, não sendo capaz de neutralizar endotoxinas [5]. O hidróxido de cálcio tem sido amplamente utilizado como medicação intracanal devido às suas propriedades antimicrobianas [7], capacidade de induzir a mineralização [10], e principalmente tem demonstrado efetiva ação sobre LPS [12,13], pois promove hidrólise da porção lipídica da endotoxina, neutralizando seus efeitos biológicos. A associação hidróxido de cálcio e clorexidina a

2% vêm sendo utilizada como medicação intracanal com promissoras perspectivas. Estudos mostram que esta associação apresenta satisfatória atividade antimicrobiana e reparadora, além da efetividade sobre endotoxinas presentes no canal radicular [11,14]. Sendo assim, a proposta deste trabalho foi avaliar *in vitro* a ação da clorexidina gel 2% como substância química auxiliar durante o preparo biomecânico, e como medicação intracanal associada ou não ao hidróxido de cálcio sobre *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e sua endotoxina em canais radiculares.

MATERIAL E MÉTODOS

Quadro 1 - Divisão dos grupos experimentais que foram realizados

| Grupos | N | Substância química auxiliar | Medicação intracanal |
|--------|----|-----------------------------|-----------------------------------|
| 1 | 12 | Clorexidina gel 2% | Ca(OH) ₂ + soro |
| 2 | 12 | | Clorexidina gel 2% |
| 3 | 12 | | Ca(OH) ₂ + CLX gel 2 % |
| 4 | 12 | | Solução fisiológica aprotínica |

Seleção dos dentes e preparo dos espécimes

Foram utilizados 48 dentes humanos unirradiculados recém-extraídos de consultórios particulares que, após a exodontia foram limpos e imersos em solução fisiológica até o momento do uso. A seleção dos dentes foi feita baseada nas dimensões e similaridade morfológica da raiz. As coroas foram seccionadas com disco de carborundum, padronizando o comprimento dos espécimes em 16±0,5mm. A

instrumentação inicial dos canais radiculares foi realizada em todas as raízes por toda a sua extensão, desde seu diâmetro anatômico até a lima tipo Kerr nº 30. Os canais foram irrigados com 3 ml de solução salina a cada troca de instrumento. Após o preparo biomecânico, os canais foram preenchidos com EDTA 17% durante 3 minutos e irrigados com 10 ml de solução salina fisiológica. Em seguida, a região apical externa das raízes recebeu o condicionamento com ácido fosfórico 37%, lavagem, aplicação do adesivo e vedamento da região apical com resina composta fotopolimerizável Z-100. Os dentes foram impermeabilizados externamente com duas camadas de adesivo epóxi, exceto a região da abertura cervical. Os espécimes foram distribuídos aleatoriamente em placas de cultura celular de 24 poços, com 12 dentes em cada e fixados com resina acrílica quimicamente ativada (Figura 1).



Figura 1 - Distribuição dos 12 espécimes na placa de cultura de células

As placas foram tampadas e embaladas. Estas placas e todos os materiais utilizados foram esterilizados por radiação gama com cobalto 60 (20 KGy por 6 horas) para neutralizar endotoxinas pré-existentes. Esta esterilização foi realizada pela EMBRARAD (Empresa Brasileira de Radiação, Cotia, São Paulo, Brasil).

Contaminação dos espécimes

Os microrganismos utilizados foram *Candida albicans* (ATCC 18804), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) que foram semeados em placas de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose para *Candida albicans* e ágar infuso-cérebro-coração (BHI) para *E. faecalis* e *E. coli*.

Em seguida, as placas foram incubadas em estufa microbiológica a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas (*C. albicans* e *E. coli*) e 48 horas (*E. faecalis*). A partir do crescimento nas placas, foram preparadas suspensões em solução salina fisiológica estéril e apirogênica contendo 10^6 céls/ml, confirmado por leitura em espectrofotômetro (Figura 2).



Figura 2 – Espectrofotômetro

Em ambiente estéril (câmara de fluxo laminar), todos os canais radiculares foram contaminados com 5 μl de suspensão de *E. coli* e 15 μl de caldo BHI (Figura 3). Na entrada dos canais foi colocada uma bolinha de algodão apirogênica embebida em caldo BHI. Os espécimes foram mantidos em estufa a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, em umidade relativa, por 7 dias, sendo que a cada 2 dias, foi adicionado meio de cultura (caldo BHI) no interior dos canais radiculares. Após 7 dias, foram adicionados aos canais radiculares 5 μl de suspensão de *C. albicans*, 5 μl de suspensão de *E. faecalis* e 10 μl de caldo BHI. Na entrada dos canais foi colocada uma bolinha de algodão apirogênico embebido em caldo BHI. Os espécimes forma mantidos em

estufa a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, em umidade relativa por mais 21 dias sendo que a cada 2 dias foi acrescentado meio de cultura BHI no interior dos canais radiculares [15].



Figura 3 - Contaminação dos espécimes utilizando ponteiras apirogênicas e micropipetas.

Após o período de contaminação (28 dias), foi realizada coleta de todas as amostras dos espécimes para confirmação da contaminação dos canais radiculares.

Coleta de confirmação

Os canais foram preenchidos com solução salina fisiológica estéril e apirogênica e coletados 100 μl do conteúdo do canal radicular com seringas apirogênicas de 1 ml (Figura 4). Esse conteúdo foi colocado em endorffs (Ep) contendo 900 μl de solução fisiológica estéril e apirogênica. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas e semeadura em duplicata em ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol para *Candida albicans*, ágar Enterococcosel para *Enterococcus faecalis* e ágar McConkey para *Escherichia coli*.

Santana, RS.

Avaliação in vitro da ação de substâncias químicas auxiliares, clorexidina e medicações intracanaís sobre C. albicans, E. faecalis, E. coli e sua endotoxina em canais radiculares.



Figura 4 - Coleta do conteúdo radicular. a) preenchimento do canal com solução salina fisiológica estéril e apirogênica; b) coleta do conteúdo.

Preparo biomecânico

Após a confirmação da contaminação os canais de todos os espécimes foram instrumentados pela técnica seriada desde a lima do tipo Kerr nº 35 até a lima tipo Kerr nº 50. Durante a instrumentação os canais foram preenchidos em sua totalidade com a clorexidina e lavados a cada troca de instrumento com 3 ml de solução salina fisiológica apirogênica, sendo a irrigação e aspiração realizada com auxílio de agulhas e seringas apirogênicas de 3 ml e bomba a vácuo (Figura 5).

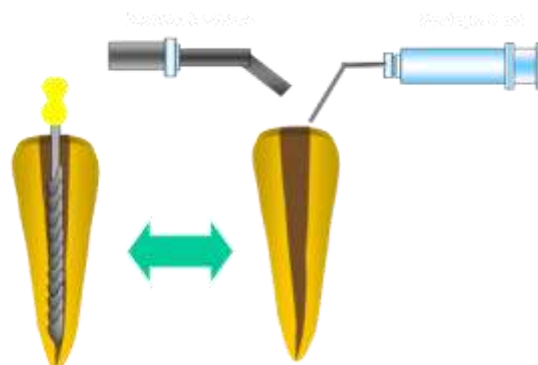


Figura 5 - Instrumentação dos canais seguido de irrigação e aspiração com auxílio de seringas apirogênicas e bomba à vácuo.

1ª coleta (logo após o PBM)

Imediatamente após o PBM, foram coletados 100 µl do conteúdo do canal radicular com seringas apirogênicas de 1 ml, de forma semelhante à coleta de confirmação. Esse conteúdo foi depositado em

ependorffs (Ep) contendo 900µl de solução salina fisiológica estéril e apirogênica para posterior semeadura. Os canais foram preenchidos com solução salina fisiológica estéril e apirogênica e vedados com bolinha de algodão apirogênica. As placas contendo os espécimes foram fechadas, seladas com fita adesiva e mantidas em estufa a temperatura de $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa 100% durante 7 dias.

2ª coleta (7 dias após o PBM)

Sete dias após o PBM, foi realizada a 2ª coleta, de forma semelhante às coletas anteriores: foram coletados 100 µL do conteúdo do canal radicular com seringas apirogênicas de 1 ml. Esse conteúdo foi depositado em ependorffs (Ep) contendo 900µl de solução salina fisiológica estéril e apirogênica cada. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas para posterior semeadura e análise da endotoxina.

Medicação intracanal por 14 dias, 3º e 4º coletas

Previamente à colocação das medicações intracanalais, foi utilizado EDTA durante 3 minutos seguido da irrigação dos canais radiculares com 10 ml de solução salina fisiológica apirogênica.

A associação do hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) com a solução salina foi manipulada em proporções iguais em volume correspondendo a 0,1g de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ para 100 µL de solução salina. A associação clorexidina gel 2% e $\text{Ca}(\text{OH})_2$ foi realizado também na proporção 0,1g de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ para 100 µL de clorexidina. Estas associações foram levadas ao canal radicular com o auxílio de seringas e agulhas (Navitip) (Ultradent Products, Ca, USA) até o completo preenchimento do canal. A clorexidina e a solução fisiológica foram levados ao canal radicular com o auxílio de seringas de 1 ml (tipo insulina) até o completo preenchimento. Após o preenchimento dos canais radiculares com a medicação intracanal, estes foram vedados com bolinhas de algodão apirogênica. Os dentes permaneceram em estufa a 37°C por catorze dias em umidade relativa. Após este período, as medicações foram removidas com auxílio de Lima

tipo Kerr nº 50 e 10 µL de solução salina fisiológica apirogênica. Em seguida foi realizado coleta do conteúdo do canal (3ª coleta).

Os canais foram preenchidos com solução salina fisiológica apirogênica e levados novamente em estufa. Após 7 dias foi realizada outra coleta (4ª coleta). As coletas foram realizadas de forma semelhante e para todas as coletas foram realizados testes microbiológicos e qualificação de endotoxinas.

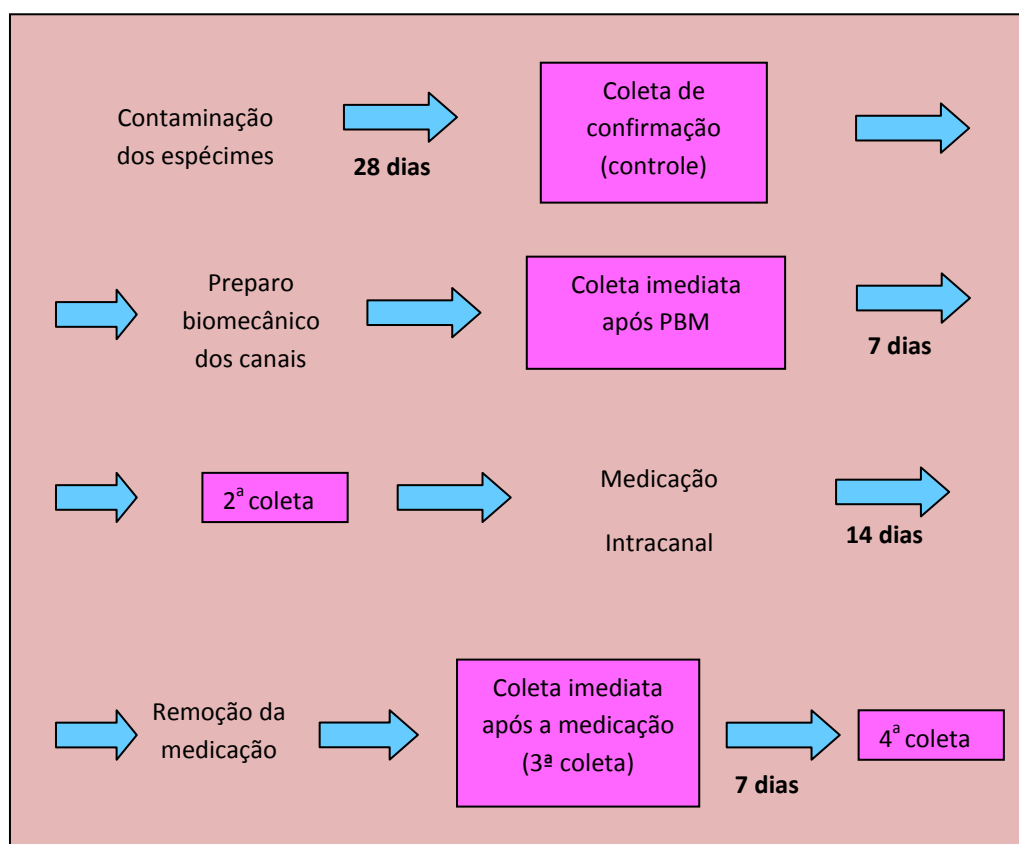


Figura 6 - ilustra a seqüência de contaminação, tratamento e coletas realizadas dos grupos 1, 2, 3 e 4.

Avaliação da atividade antimicrobiana

Para determinar a atividade antimicrobiana foram realizadas diluições seriadas das amostras coletadas do canal radicular e semeadura, em duplicata, em três meios de cultura seletivos para cada microrganismo: ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol para

Candida albicans, ágar Enterococcosel para *Enterococcus faecalis* e ágar McConkey para *Escherichia coli*. As placas foram mantidas em estufa a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, para determinação de UFC/ml. Os resultados foram submetidos à análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis e de Dunn, significância 5%.

Quantificação de endotoxinas

Para verificar a neutralização da endotoxina foi realizado o teste cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (análise quantitativa). Inicialmente foram realizadas diluições da endotoxina padrão de *E. coli* em diferentes concentrações que iriam representar os padrões de comparação das amostras (curva-padrão). Para cada amostra, foi realizado um controle positivo (amostra do conteúdo do canal radicular adicionada de uma quantidade conhecida de endotoxina).

Em uma placa apirogênica de 96 poços, foram adicionados 100 μl de água apirogênica (branco da reação), os padrões de endotoxina, as amostras coletadas do canal radicular e os controles positivos. Os testes foram realizados em duplicata. A placa foi incubada no leitor cinético QCL a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 10 min, o qual estava acoplado a um microcomputador com software Wink QCL específico para gerenciamento, execução e emissão de relatórios. Após, foram adicionados em cada poço da placa 100 μl do reagente cinético cromogênico do LAL, com uma micropipeta multicanal e ponteiras apirogênicas (Figura 7).

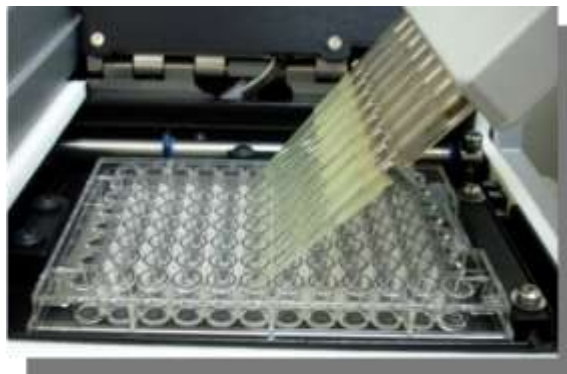


Figura 7 - Placa de 96 poços com multipipeta em leitor cinético cromogênico (Wink KQCL)

Após o início do ensaio cinético, o software da leitora de microplacas monitorou, de forma contínua durante todo o ensaio, a absorbância a 405 nm em cada poço da microplaca. O software WinkQCL automaticamente calculou uma correlação linear log/log do tempo de reação de cada padrão com a concentração de endotoxina correspondente. Os resultados deste teste foram submetidos à análise estatística de Kruskal- Wallis e teste de Dunn, com significância de 5%.

RESULTADOS

Análise microbiológica

A tabela 1 mostra os valores médios de UFC/ml dos microrganismos testados nas diferentes coletas realizadas, e, a tabela 2 mostra o percentual de redução e grupos homogêneos obtidos nas 1ª e 2ª coletas em relação à coleta de confirmação.

Tabela 1 - Valores das médias obtidas de UFC/ml dos microrganismos nas coletas realizadas

(continua)

| | Grupos | Ca(OH) ₂ | CLX | CLX + Ca(OH) ₂ | Salina |
|--------------------|---------------------------|---------------------|----------|---------------------------|---------|
| Confirmação | <i>C. albicans</i> | 459583 | 109183 | 77242 | 11933 |
| | <i>E. faecalis</i> | 12525500 | 5605000 | 12366667 | 6085000 |
| | <i>E. coli</i> | 28510917 | 17434292 | 23493442 | 1900092 |
| 1ª Coleta | <i>C. albicans</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | <i>E. faecalis</i> | 283 | 550 | 825 | 15,5 |
| | <i>E. coli</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2ª Coleta | <i>C. albicans</i> | 0 | 14167 | 0 | 0 |
| | <i>E. faecalis</i> | 0 | 3400 | 317 | 0 |
| | <i>E. coli</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabela 1 - Valores das médias obtidas de UFC/ml dos microrganismos nas coletas realizadas

| | | (conclusão) | | | | |
|------------------|--------------------|-------------|---------------------|-----|---------------------------|--------|
| | | Grupos | Ca(OH) ₂ | CLX | CLX + Ca(OH) ₂ | Salina |
| 3ª Coleta | <i>C. albicans</i> | | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | <i>E. faecalis</i> | | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | <i>E. coli</i> | | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4ª Coleta | <i>C. albicans</i> | | 0 | 0 | 8,33 | 0 |
| | <i>E. faecalis</i> | | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | <i>E. coli</i> | | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabela 2 - Percentuais de redução (média, desvio padrão, mediana em porcentagem referente à diminuição de UFC/mL de *C. albicans*, *E. faecalis*, *E. coli*) obtidos nas 1ª e 2ª coletas em relação à coleta de confirmação e grupos homogêneos

| Reduções | Microrganismo | n | Média | Desvio-padrão | Mediana | Grupos Homogêneos |
|-----------|--------------------|----|--------|---------------|---------|-------------------|
| Col. conf | <i>C. albicans</i> | 48 | 100 | 0 | 100 | A |
| X | <i>E. faecalis</i> | 48 | 99.982 | 0.0653 | 100 | A |
| 1ª col | <i>E. coli</i> | 48 | 100 | 0 | 100 | A |
| Col conf | <i>C. albicans</i> | 48 | 93.81 | 32.19 | 100 | A |
| X | <i>E. faecalis</i> | 48 | 99.927 | 0.35 | 100 | A |
| 2ª col | <i>E. coli</i> | 48 | 100 | 0 | 100 | A |

*letras diferentes significam diferença estatisticamente significantes (p<0,05)

As tabelas 3 e 4 mostram os percentuais de redução (mediana) obtidos nas 3^a e 4^a coletas em relação à coleta de confirmação e grupos homogêneos.

Tabela 3 - Percentuais de redução (mediana em porcentagem referente à diminuição de UFC/mL de *C. albicans*, *E. faecalis*, *E. coli*) obtidos na 3^a coleta em relação à coleta de confirmação e grupos homogêneos

| Grupos | Confirmação X 3 ^a col | | | | | | |
|-------------------------|----------------------------------|---------|-----|--------------------|-----|----------------|-----|
| | <i>C. albicans</i> | | | <i>E. faecalis</i> | | <i>E. coli</i> | |
| | n | Mediana | GH* | Mediana | GH* | Mediana | GH* |
| Ca(OH) ₂ | 12 | 100 | A | 100 | A | 100 | A |
| CLX | 12 | 100 | A | 100 | A | 100 | A |
| CLX+Ca(OH) ₂ | 12 | 100 | A | 100 | A | 100 | A |
| Salina | 12 | 100 | A | 100 | A | 100 | A |

*Grupos homogêneos: letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa (p<0,05)

Tabela 4 - Percentuais de redução (mediana em porcentagem referente à diminuição de UFC/mL de *C. albicans*, *E. faecalis*, *E. coli*) obtidos na 4^a coleta em relação à coleta de confirmação e grupos homogêneos

| Grupos | Confirmação X 4 ^a col | | | | | | |
|-------------------------|----------------------------------|---------|------|--------------------|------|----------------|------|
| | <i>C. albicans</i> | | | <i>E. faecalis</i> | | <i>E. coli</i> | |
| | n | Mediana | GH** | Mediana | GH** | Mediana | GH** |
| Ca(OH) ₂ | 12 | 100 | A | 100 | A | 100 | A |
| CLX | 12 | 100 | A | 100 | A | 100 | A |
| CLX+Ca(OH) ₂ | 12 | 100 | A | 100 | A | 100 | A |
| Salina | 12 | 100 | A | 100 | A | 100 | A |

*Desvio Padrão **Grupos homogêneos: letras diferentes significam diferença estatisticamente significantes (p<0,05)

Análise da quantidade de endotoxinas

As médias obtidas nos testes de quantificação de endotoxinas dos canais radiculares em cada grupo, em todas as coletas estão representados na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultados obtidos: quantidade de endotoxinas de *E. coli* (EU/ml) nos grupos experimentais

| MIC | Confirmação | 1ª coleta | 2ª coleta | 3ª coleta | 4ª coleta |
|---------------------------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Ca(OH) ₂ | 31858 | 939 | 421,9 | 80,4 | 203,6 |
| CLX | 69002 | 6798 | 1120 | 97,7 | 163,5 |
| Ca(OH) ₂ + CLX | 258933 | 605 | 809 | 148,9 | 498 |
| SALINA | 42402 | 1066 | 341 | 4227 | 3279 |

A Tabela 6 mostra a redução percentual de endotoxinas após o preparo dos canais com CLX 2% (1ª coleta) e após 7 dias do preparo dos canais (2ª coleta).

Tabela 6 - Percentuais de redução (média, desvio padrão, mediana em porcentagem referente à diminuição da quantidade de endotoxina, EU/mL) obtidos nas 1ª e 2ª coletas em relação à coleta de confirmação

| Reduções | n | Média | Desvio-padrão | Mediana |
|-------------------|----|--------|---------------|---------|
| Col conf X 1ª col | 48 | 92.03 | 17.84 | 98.37 |
| Col conf X 2ª col | 48 | 98.102 | 3.562 | 99.318 |

As Tabelas 7 e 8 mostram os resultados dos testes estatísticos aplicados aos valores de endotoxinas encontrados após as MIC e catorze dias após a sua remoção em relação à coleta de confirmação e em relação ao PBM, respectivamente.

Tabela 7 - Percentuais de redução (média e mediana em porcentagem referente à diminuição da quantidade de endotoxina, EU/mL) obtidos nas 3^a e 4^a coletas em relação à coleta de confirmação e grupos homogêneos

| Grupos | Confirmação X 3 ^a col | | | | Confirmação X 4 ^a col | | |
|-------------------------|----------------------------------|--------|---------|-----|----------------------------------|---------|-----|
| | N | Média | Mediana | GH* | Média | Mediana | GH* |
| Ca(OH) ₂ | 12 | 99.619 | 99.756 | AB | 99.333 | 99.652 | AB |
| CLX | 12 | 99.704 | 99.927 | A | 99.554 | 99.793 | AB |
| CLX+Ca(OH) ₂ | 12 | 99.928 | 99.976 | A | 99.758 | 99.937 | A |
| Salina | 12 | 55.7 | 98.4 | B | 85.95 | 96.86 | B |

*letras diferentes significam diferença estatisticamente significantes (p<0,05)

Tabela 8 - Percentuais de redução (média e mediana em porcentagem referente à diminuição da quantidade de endotoxina, EU/mL) obtidos nas 3^a e 4^a coletas em relação à 1^a coleta e grupos homogêneos

| Grupos | N | 1 ^a col x 3 ^a col | | | 1 ^a col x 4 ^a col | | |
|--------------------------|----|---|---------|-----|---|---------|-----|
| | | Média | Mediana | GH* | Média | Mediana | GH* |
| Ca(OH) ₂ | 12 | 75.4 | 94.9 | B | 73.10 | 82.52 | AB |
| CLX | 12 | 98.393 | 98.893 | A | 96.22 | 97.47 | A |
| CLX+ Ca(OH) ₂ | 12 | 66.9 | 88.6 | B | 12.3 | 76.6 | B |
| Salina | 12 | -7482 | -310 | B | -7663 | -33 | B |

*letras diferentes significam diferença estatisticamente significantes (p<0,05)

DISCUSSÃO

Para o sucesso do tratamento endodôntico, a desinfecção e limpeza dos canais radiculares deve eliminar microrganismos e inativar produtos tóxicos, especialmente as endotoxinas, presentes na parede celular de bactérias Gram-negativas. Embora muitas substâncias químicas tenham sido efetivas sobre microrganismos, não tem sido demonstrada efetividade sobre a endotoxina, mostrando a necessidade de avaliar outras substâncias que além de propriedades antimicrobianas, ausência de citotoxicidade e capacidade de dissolver tecidos também tenham efeito sobre as endotoxinas. Além disto, estudos demonstram que o PBM não é capaz de eliminar todos os microrganismos e endotoxinas que podem permanecer no sistema de canais, túbulos dentinários sendo necessária a utilização de substâncias químicas associadas a MICs [5]. Neste estudo foi avaliada a clorexidina gel 2% utilizada como substância química auxiliar durante o PBM, seguido do uso de MICs, auxiliando sua atividade antimicrobiana e seu efeito sobre a endotoxina em espécimes contaminados com *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* comparando-os com um grupo controle irrigado com solução fisiológica apirogênica. Verificou-se que a clorexidina foi efetiva como auxiliar no preparo biomecânico. A CLX apresenta em função de seus efeitos antimicrobianos, capacidade de adsorção [6, 7, 8, 9, 10], baixa toxicidade mesmo em maiores concentrações e propriedades de substantividade ou efeito residual [11] o que mostra sua eficácia no tratamento endodôntico. No presente estudo verificou-se diminuição de todos os microrganismos demonstrando a efetividade da CLX como substância irrigadora. Entretanto, sem eliminar completamente *E. faecalis* e *C. albicans*. Como MIC, verificou-se que todas as substâncias testadas foram efetivas, entretanto outros estudos [11, 14] afirmam que a CLX não é uma medicação intracanal muito eficaz, pois a mesma se difunde rapidamente, deixando o canal vazio e com isso, favorecendo a contaminação do canal, especialmente por via coronária. Quanto à ação

dos medicamentos testados sobre endotoxinas, verificou-se redução significativa, entretanto a CLX foi a MIC com a melhor ação sobre endotoxinas. Entretanto, estudos mostram que o hidróxido de cálcio é a MIC mais eficaz sobre endotoxinas uma vez que ele é capaz de inativar a endotoxina (LPS) pela hidrólise do lípide A. Além disto, é capaz de impedir a ação do LPS na produção de TNF – α em monócitos periféricos do sangue [16]. A associação Ca(OH)_2 + CLX como MIC reúne as propriedades antimicrobianas da CLX e potencial de mineralização e de neutralização de endotoxinas do hidróxido de cálcio [11, 14]. Entretanto esta associação oferece dificuldade técnica ao ser colocada em toda a extensão do canal radicular o que pode ter como resultado menor ação antimicrobiana. E, no presente estudo esta associação não foi a MIC com melhores resultados. Estes resultados são diferentes dos estudos de Maekawa [3] e Chung [17], que mostraram que a associação Ca(OH)_2 + CLX foi capaz de eliminar quase a totalidade de endotoxinas dos canais radiculares. O estudo de Souza-Filho et al. [11], concordam com os resultados encontrados na presente pesquisa em relação à associação Ca(OH)_2 + CLX ter apresentado resultados similares a CLX quanto ao percentual de redução de endotoxinas. Assim, é possível dizer que a clorexidina gel 2% é eficaz para eliminar os patógenos endodônticos após o preparo biomecânico. Entretanto, os resultados deste estudo mostram que ainda não existe a substância química ideal para ser utilizada como MIC, uma vez que, a medicação intracanal foi capaz de reduzir a endotoxina, mas não a neutralizou completamente.

CONCLUSÕES

1. O preparo biomecânico utilizando clorexidina gel 2% e as medicações de Ca(OH)_2 , CLX ou associação foram capazes de

eliminar os microrganismos do canal radicular e reduzir significativamente as endotoxinas;

2. As medicações foram eficazes em reduzir a quantidade de endotoxinas, porém não conseguiram eliminá-las completamente.

REFERÊNCIAS

1. Maekawa LE, Lamping R, Maekawa MY, Nassri MRG. Identificação e análise dos microrganismos presentes em canais radiculares com mortificação pulpar. Rev. Paul Odontol. 2006;29(1):38-41.
2. Waltimo TMT, Orstavik D, Siren EK, Haapasalo MP. *In vitro* yeast infection of human dentin. J Endod. 2000; 26(4):207-9.
3. Maekawa LE. Avaliação *in vitro* da ação de substâncias químicas auxiliares e medicações intracanais sobre *Escherichia coli* e sua endotoxina em canais radiculares [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2007.
4. Tanomaru JMG, Rodrigues VMT, Tanomaru Filho M, Spolidorio DMP, Ito IY. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de soluções irrigadoras empregadas em Endodontia. Rev Paul Odontol. 2005;27(1):38-40.
5. Valera MC, Rosa JA, Maekawa LE, Oliveira LD, Carvalho CAT. Action of propolis and medications against *Escherichia coli* and endotoxin in root canals. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010; 110: e70-e74.

6. White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod.* 1997;23(4):229-31.
7. Leonardo MR, Silva LAB, Leonardo RT. Tratamento de canal radicular em sessão única: crença vs. Ciência. In: Feller C; Gorab R. Atualização na Clínica Odontológica. São Paulo: Artes Médicas; 2000. p. 29-57.
8. Ferreira CM, Rosa OPS, Torres AS, Ferreira FBA, Bernardinelli N. Activity of endodontic antibacterial agents against selected anaerobic bacteria. *Braz Dent J.* 2002;13(2):118-22.
9. Weber CD, McClanahan SB, Miller GA, Diener-West M, Johnson JD. The effect of passive ultrasonic activation of 2% chlorhexidine or 5.25% sodium hypochlorite irrigant on residual antimicrobial activity in root canals. *J Endod.* 2003;29(9):562-4.
10. Leonardo MR. Endodontia: tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos. São Paulo: Artes Médicas; 2005.
11. Souza Filho FJ, Soares AJ, Vianna ME, Zaia AA, Ferraz CCR, Gomes BPFA. Antimicrobial effect and pH of chlorhexidine gel and calcium hydroxide alone and associated with other materials. *Braz Dent J.* 2008;19(1):28-33.
12. Silva LAB, Nelson Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin *in vivo*. *J Endod.* 2002;28(2):94-8.
13. Tanomaru JMG, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LAB. Effect of different irrigation solutions. *Int Endod J.* 2003;36(11):733-9.

14. Gomes BPFA, Vianna ME, Sena T, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 2006;102(4):544-550.
15. Menezes MM, Valera MC, 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(5):311-9.
16. Barthel CR, Levin LG, Reisner HM, Trope M. TNF-alpha release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. *Int Endod J.* 1997;30(3):155-9.
17. Chung, A. Ação do detergente derivado do óleo essencial de mamona e medicamentos sobre *Escherichia coli* e sua endotoxina em canais radiculares. Trabalho de iniciação científica financiado pela FAPESP, processo n°. 06/61357-0.

Santana, RS.

Avaliação *in vitro* da ação de substâncias químicas auxiliares, clorexidina e medicações intracanaís sobre *C. albicans*, *E. faecalis*, *E. coli* e sua endotoxina em canais radiculares.

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

| | | |
|---|--|--|
|  | UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS FACULDADE DE ODONTOLOGIA | |
| <small>Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - Rt. São Dimas CEP 12201-970 - F. (12) 3947-9028 Fax (12) 3947-9010 / suely@fosj.unesp.br</small> | | |
| <hr/> CERTIFICADO Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos <hr/> | | |
| <p>CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 06/2008-PH/CEP, sobre “ Avaliação <i>in vitro</i> da ação de medicações intracanaís sobre <i>Candida albicans</i>, <i>Enterococcus faecalis</i>, <i>Escherichia coli</i> e sua endotoxina em canais radiculares.”, sob a responsabilidade de LILIAN EIKO MAEKAWA, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.</p> | | |
| <p>São José dos Campos, 28 de março de 2008.</p> | | |
|  <hr/> Profa. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi Coordenadora do CEP/HUMANOS/FOSJC | | |
| <table border="1"><tr><td>Recebi o original deste documento. em 01/04/08 Ass.: </td></tr></table> | | Recebi o original deste documento. em 01/04/08 Ass.:  |
| Recebi o original deste documento. em 01/04/08 Ass.:  | | |