



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Aluno(a): Priscila Mayra Fortes

Orientador(a): Profa Brenda Paula Figueredo de Almeida

Gomes

Ano de Conclusão do Curso: 2007

TCC 410

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'B. P. Figueredo'.

Assinatura do(a) Orientador(a)

Priscila Mayra Fortes

Análise in vitro da ação antimicrobiana residual de diferentes substâncias químicas auxiliares liberadas pelos tecidos pulpar e dentinário frente a patógenos endodônticos

Monografia apresentada ao curso de Odontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, para obtenção do Diploma de Cirurgião Dentista.

Orientadora: Profa Dra Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

**UNICAMP / FOP
BIBLIOTECA**

Piracicaba
2007

Unidade FOP/UNICAMP
N. Chamada
F776a
Vol. Ex.
Tombo BC/

C.T. 780418

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª / 6159

F776a Fortes, Priscila Mayra.
Análise in vitro da ação antimicrobiana residual de diferentes substâncias químicas auxiliares liberadas pelos tecidos pulpar e dentinário frente a patógenos endodônticos. / Priscila Mayra Fortes. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2007.
31f. : il.

Orientador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.
Monografia (Graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Endodontia. 2. Clorexidina. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Dedico este trabalho à minha **Família** que me apoiou em todos os momentos, me dando sustento físico e moral e as minhas **Amigas** de faculdade que fizeram desta jornada inesquecível.

Agradecimentos

À **Profa Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes**, pela dedicação, habilidade e competência com que orientou nosso trabalho.

Ao Mestrando **Francisco Montagner**, pelo companheirismo, colaboração e paciência.

A todos os **Professores, Doutorandos, Mestrandos, Estagiários e Funcionários** do Departamento de Odontologia Restauradora - Área de Endodontia.

A todos os **Professores da Faculdade de Odontologia de Piracicaba** que com seu conhecimento, dedicação e entusiasmo contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

Às minhas amigas **Andressa Gomes, Sarina**

Mastrofrancisco, Milena Pazin, Marina Ganine e Juliana

Marcassa que me fizeram entender o real valor da palavra

Amizade, e que para sempre estarão em minhas

memórias.

Sumário

Lista de Ilustrações.....	01
Resumo.....	03
Introdução.....	04
Objetivo.....	05
Materiais e Métodos.....	06
Estudo Piloto.....	10
Resultados.....	12
Discussão.....	25
Conclusão.....	28
Referências Bibliográficas.....	29

Lista de Ilustrações

Tabela 1. Valores de transmitância para o grupo padrão (PAD) no período de 1 a 18 horas.	10
Tabela 2. Média dos valores de transmitância para os grupos de tecido pulpar frente ao <i>E. faecalis</i> no período de 1 a 18 horas.	13
Tabela 3. Média dos valores de transmitância para os grupos de tecido dentinário frente ao <i>E. faecalis</i> no período de 1 a 18 horas.	16
Tabela 4. Média dos valores de transmitância para os grupos de tecido pulpar frente a <i>C.albicans</i> no período de 1 a 11 horas.	20
Tabela 5. Média dos valores de transmitância para os grupos de tecido dentinário frente a <i>C.albicans</i> no período de 1 a 11 horas.	23
Figura 1. Gráfico dos valores de transmitância para o grupo padrão (PAD) no período de 1 a 18 horas.	11
Figura 2. Gráfico dos valores de transmitância para cada grupo de tecido pulpar frente ao <i>E. faecalis</i> no período de 1 a 18 horas.	13
Figura 3. Gráfico dos valores de transmitância para os grupos de tecido dentinário frente ao <i>E. faecalis</i> avaliados no período de 1 a 18 horas.	16
Figura 4. Gráfico dos valores de transmitância para os grupos de tecido pulpar frente a <i>C.albicans</i> avaliados no período de 1 a 11 horas.	20
Figura 5. Gráfico dos valores de transmitância para os grupos de tecido dentinário frente a <i>C.albicans</i> avaliados no período de 1 a 11 horas.	23

RESUMO

A ação mecânica dos instrumentos endodônticos é incapaz de promover uma completa sanificação do sistema de canais radiculares devido as suas complexidades anatômicas. As substâncias químicas auxiliares são empregadas com o intuito de promover uma significativa redução dos depósitos bacterianos nos canais radiculares, pois auxiliarão na lubrificação do canal radicular durante a ação de corte dos instrumentos, na remoção de *smear layer*, na desinfecção, dissolução do exsudato, dissolução do tecido pulpar necrosante e pré-dentina. O objetivo deste trabalho foi verificar, *in vitro*, a capacidade de adsorção e liberação de substâncias químicas auxiliares aos tecidos pulpar e dentinário bovinos através de sua ação antimicrobiana residual frente à patógenos encontrados no canal radicular. Os resultados demonstraram uma capacidade de adsorção e liberação de substâncias químicas auxiliares do grupo da clorexidina pelos tecidos pulpar e dentinário. Confirmaram a ação antimicrobiana das substâncias químicas auxiliares, clorexidina 2% gel e líquida e hipoclorito de sódio (NaOCl) 5.25%, frente aos patógenos *E.faecalis* e *C. albicans*. Mostraram que a atividade antimicrobiana residual da clorexidina 2% (gel e líquida) é superior a do hipoclorito de sódio 5.25%. Foi concluído que a clorexidina 2% líquida e gel têm uma ação residual mais efetiva nos tecidos pulpares e periapicais que NaOCl 5,2%, frente aos patógenos testados.

INTRODUÇÃO

Mais de 300 espécies bacterianas são reconhecidas atualmente na microbiota normal da cavidade oral, sendo potenciais infestantes dos canais radiculares. Entretanto, apenas um grupo restrito de espécies coloniza o canal radicular (Gomes 1995).

As bactérias anaeróbicas produtoras de pigmento negro, tais como *Porphyromonas gingivalis*, são freqüentemente isoladas de canais radiculares infectados, estando relacionada a casos sintomáticos onde havia presença de exsudato purulento e dor à palpação (Jacinto *et al* 2006). Os anaeróbios facultativos *Enterococcus faecalis* são capazes de causar e manter infecções de difícil tratamento e são resistentes a uma ampla variedade de agentes antimicrobianos (Pinheiro *et al* 2003).

Polpas vitais não são facilmente invadidas por microrganismos, pois a presença de fluido dentinário, lâmina limitante, fibras colágenas, prolongamentos odontoblásticos podem servir como defesa contra essa invasão. Devido ao seu diâmetro reduzido e a sua capacidade de penetração, os microrganismos têm acesso facilitado ao interior da dentina. Este ambiente fornece condições favoráveis à multiplicação e crescimento bacteriano (Love *et al* 1996).

Mesmo em casos de canais radiculares bem tratados, algumas bactérias podem permanecer vivas, devido às complexidades anatômicas do sistema de canais radiculares (Ida & Gutmann, 1995). Bactérias presentes em regiões de istmos, ramificações, reentrâncias, túbulos dentinários e reabsorções radiculares externas podem não ser afetadas pelas medidas usadas no controle da infecção endodôntica (Nair *et al* 1999).

A limpeza e a modelagem do conduto radicular seguida de uma obturação são alguns dos fatores importantes para a determinação do sucesso do tratamento endodôntico (Schilder, 1974). A ação mecânica dos instrumentos endodônticos é incapaz de promover uma completa sanificação do sistema de canais radiculares devido as suas complexidades anatômicas. As substâncias químicas auxiliares são empregadas com o intuito de promover uma significativa redução dos depósitos bacterianos nos canais radiculares, pois auxiliarão na lubrificação do canal radicular durante a ação de corte dos instrumentos, na remoção de *smear layer*, na desinfecção, dissolução do exsudato, dissolução do tecido pulpar necrosante e pré-dentina (Byström & Sundqvist, 1983).

Atualmente a clorexidina, nas formas líquida e gel (Gomes *et al* 2001), tem sido empregada como substância química auxiliar no tratamento endodôntico. Apresenta amplo espectro antimicrobiano, além de ter a capacidade de se adsorver ao tecido dentinário, sendo gradualmente liberada (Dametto *et al* 2005). O hipoclorito de sódio é a solução química auxiliar mais empregada no tratamento de canais radiculares, tanto como irrigante como agente de desinfecção de cones de guta-percha e diques de borracha. A ação antimicrobiana destas substâncias está relacionada ao tipo, concentração, forma de apresentação e à susceptibilidade microbiana (Vianna *et al* 2004). Tanto o hipoclorito de sódio 5,25% quanto a clorexidina gel 2% foram capazes de eliminar microrganismos na forma vegetativa em um curto período de tempo (Gomes *et al* 2005). No entanto, quando comparado ao hipoclorito de sódio, o digluconato de clorexidina mostra-se incapaz de dissolver fragmentos pulpare (Siqueira *et al* 2004).

OBJETIVO

Verificar, *in vitro*, a capacidade de adsorção e liberação de substâncias químicas auxiliares (hipoclorito de sódio 5,25%, clorexidina 2% gel e líquida) aos tecidos pulpar e dentinário bovinos através de sua ação antimicrobiana residual frente a patógenos encontrados no canal radicular.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção e Preparo das Amostras

Foram empregados 40 dentes bovinos recém-extraídos e mantidos sob refrigeração em freezer a -20°C em solução fisiológica. A polpa radicular foi removida após a separação da coroa dental e raiz por meio de cinzel biselado e martelo cirúrgico. Sulcos de orientação foram confeccionados com broca esférica 1016 (KG Sorensen, São Paulo, SP, Brasil) no limite esmalte-cemento e no centro dos flancos mesial e distal da superfície radicular. As amostras de polpa bovina tiveram seu comprimento padronizado em 10 mm, através de secção com lâmina de bisturi número 11, com orientação de um paquímetro digital. O peso das mesmas foi verificado em balança de precisão. Os fragmentos pulpares foram então armazenados em tubos de ensaio contendo 5 mL de solução fisiológica.

Blocos de dentina radicular foram produzidos com um disco de corte diamantado (KG Sorensen Ind. Com. Ltda., Barueri, SP) sob refrigeração e tamanho padronizado de 3mm x 3mm x 3mm. A *smear layer* formada foi removida lavando-se os dentes em EDTA 17% por 10 minutos, em NaOCl 5,25% por mais 10 minutos sob agitação constante (Agitador-Aquecedor FANEM, São Paulo, Brasil). As amostras foram submetidas a uma lavagem com água corrente por 1 hora para a remoção dos possíveis resíduos de EDTA e NaOCl (Ferraz *et al.* 2001). Os fragmentos de dentina bovina foram autoclavados por 30 minutos a 121°C e 1 atm, em grupos de 5 unidades cada,

dispostos em frascos de vidro com tampas rosqueáveis contendo 5 mL de água destilada.

As amostras foram divididas em grupos de acordo com as substâncias químicas auxiliares. Os tecidos foram imersos por um período de cinco minutos. Após o tempo de imersão, as amostras foram lavadas três vezes em 1,5 mL de solução fisiológica estéril acondicionada em tubos tipo eppendorf estéreis.

GRUPO	N	BACTÉRIA	TECIDO	SUBSTÂNCIA QUÍMICA
C1	3	<i>E. faecalis</i>	ausente	ausente
C2	3	<i>P. gingivalis</i>	ausente	ausente
C3	3	<i>E. faecalis</i>	Polpa	ausente
C4	3	<i>P. gingivalis</i>	Polpa	ausente
C5	3	<i>E. faecalis</i>	Dentina	ausente
C6	3	<i>P. gingivalis</i>	Dentina	ausente
G1	9	<i>E. faecalis</i>	Polpa	Soro Fisiológico
G2	9	<i>E. faecalis</i>	Polpa	Hipoclorito de sódio 5,25%
G3	9	<i>E. faecalis</i>	Polpa	Clorexidina líquida 2%
G4	9	<i>E. faecalis</i>	Polpa	Clorexidina gel 2%
G5	9	<i>E. faecalis</i>	Dentina	Soro Fisiológico
G6	9	<i>E. faecalis</i>	Dentina	Hipoclorito de sódio 5,25%
G7	9	<i>E. faecalis</i>	Dentina	Clorexidina líquida 2%
G8	9	<i>E. faecalis</i>	Dentina	Clorexidina gel 2%

G9	9	<i>P. gingivalis</i>	Polpa	Soro Fisiológico
G10	9	<i>P. gingivalis</i>	Polpa	Hipoclorito de sódio 5,25%
G11	9	<i>P. gingivalis</i>	Polpa	Clorexidina líquida 2%
G12	9	<i>P. gingivalis</i>	Polpa	Clorexidina gel 2%
G13	9	<i>P. gingivalis</i>	Dentina	Soro Fisiológico
G14	9	<i>P. gingivalis</i>	Dentina	Hipoclorito de sódio 5,25%
G15	9	<i>P. gingivalis</i>	Dentina	Clorexidina líquida 2%
G16	9	<i>P. gingivalis</i>	Dentina	Clorexidina gel 2%

Método do contato direto em meio líquido, através da observação da curva de crescimento microbiano

Para a padronização do inóculo foi utilizada a metodologia empregada por Gomes *et al* (2001).

Cultura pura de *E. faecalis* (ATCC 29212) em caldo de Brain Heart Infusion Broth (BHI) foram subcultivados em placas de Brain Heart Infusion Agar (BHIA) + 5% de sangue de carneiro desfibrinado (EBEFARMA, Araras, SP) e incubadas por 24/48 horas a 37°C em atmosfera de CO₂.

Cultura pura de *P. gingivalis* (ATCC PG W83) em Fastidious Anaerobe Broth (FAB) foram subcultivados em placas de Fastidious Anaerobe Agar (FAA) FAA + 5% sangue de carneiro desfibrinado (EBEFARMA, Araras, SP) e incubado em câmara de anaerobiose (Don Whitley Scientific, Bradford, UK) em atmosfera anaeróbia de 80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂ por 7 dias.

Após crescimento em meio sólido, colônias isoladas de cada bactéria foram suspensas em tubos contendo 5mL dos respectivos meios de cultura

líquidos. Após a agitação mecânica em vórtex, a suspensão foi ajustada no espectrofotômetro com absorvância de 800nm, até atingir a concentração equivalente a 0.5 (transmitância 90) da escala de McFarland para as bactérias anaeróbias facultativas e 1.0 (transmitância 80) da escala de McFarland para as bactérias anaeróbias estritas.

Leitura da curva de crescimento em BHI Caldo e em FAB Caldo

Nos frascos que continha a união BHI caldo + inóculo + polpa, BHI caldo + inóculo + dentina, FAB caldo + inóculo + polpa, e FAB caldo + inóculo + dentina foram agitados em vórtex e feitas as leituras no espectrofotômetro de hora em hora, incluindo o tempo imediato até a décima oitava hora. Nos intervalos de leitura, o conjunto foi mantido em condições gasosas específicas. Procedimentos semelhantes de leitura foram realizados com frascos que contenham BHI+inóculo, FAB+inóculo, BHI+polpa, BHI+dentina, FAB+polpa, FAB+dentina.

Confirmação do crescimento bacteriano

Aliquotas de 25µL foram retiradas dos frascos contendo inóculo de *E. faecalis* e plaqueadas em BHI Agar contendo 5% de sangue de carneiro desfibrinado a cada hora, durante 18 horas. As placas foram incubadas a 37°C para permitir o crescimento microbiano por 48 horas em estufa de CO₂. O número de unidades formadoras de colônias formadas (CFU) foi calculado. O mesmo procedimento foi realizado para a bactéria *P. gingivalis*, no entanto as

placas foram em câmara de anaerobiose (Dom Whitley Scientific, Bradford, UK) em atmosfera anaeróbia de 80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂ por 7 dias.

ESTUDO PILOTO - VERIFICAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO

PADRÃO DE *E. faecalis*

A curva de crescimento padrão da bactéria *E. faecalis* foi averiguada em estudo piloto. Para isso, o caldo de cultura turvado com a bactéria ao grau 0,5 McFarland (correspondente ao valor 90,0 de transmitância) contido em um tubo de ensaio teve seus valores de transmitância avaliados no período de 18 horas. Os resultados estão expressos na tabela e ilustrados no gráfico, e correspondem ao grupo padrão (PAD).

Tabela 1 – Valores de transmitância para o grupo padrão (PAD) no período de 1 a 18 horas.

	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h	9 h	10 h	11 h	12 h	13 h	14 h	15 h	16 h	17 h	18 h
PAD	79,1	45,4	19,3	16,4	15,7	16,4	16,6	17,8	16,6	15,7	16	16	13,5	12,3	10,8	13,2	14,4	14,3

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

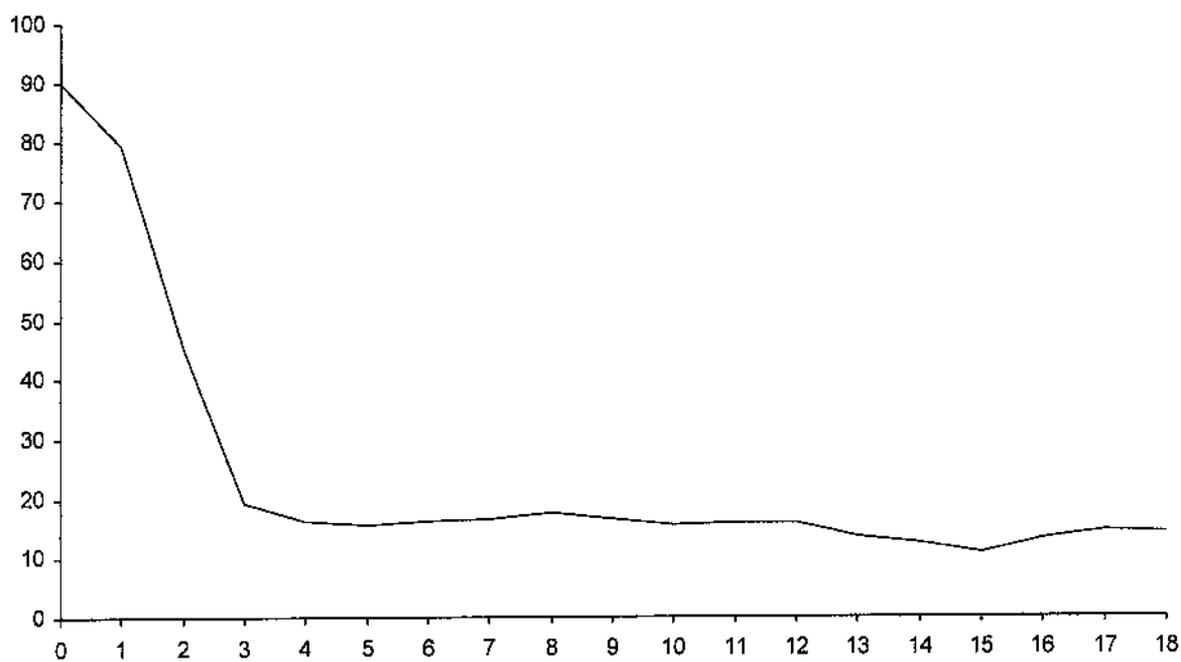


Figura 1 – Gráfico dos valores de transmitância para o grupo padrão (PAD) no período de 1 a 18 horas.

**AVALIAÇÃO DO EFEITO RESIDUAL DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS
AUXILIARES EM POLPA BOVINA FRENTE AO *E. faecalis***

A metodologia empregada está de acordo com aquela descrita previamente e confirmada na execução do experimento-piloto. Para esta etapa, as amostras foram divididas em cinco grupos, sendo dois grupos controle e três grupos de teste, de acordo com o quadro abaixo.

Grupo	Amostras (n)	Bactéria	Tecido	Substância Química Auxiliar
CEP1	3	<i>E. faecalis</i>	Pulpar	Ausente
CEP2	3	<i>E. faecalis</i>	Pulpar	Soro Fisiológico
GEP1	9	<i>E. faecalis</i>	Pulpar	Hipoclorito de Sódio 5,25%
GEP2	9	<i>E. faecalis</i>	Pulpar	Clorexidina Líquida 2%
GEP3	9	<i>E. faecalis</i>	Pulpar	Clorexidina Gel 2%

Foram feitas leituras no espectrofotômetro de hora em hora, incluindo o tempo imediato até a décima oitava hora. Nos intervalos de leitura, o conjunto foi mantido em condições gasosas específicas.

Tabela 2 – Média dos valores de transmitância para os grupos de teste no período de 1 a 18 horas.

	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h	9 h	10 h	11 h	12 h	13 h	14 h	15 h	16 h	17 h	18 h
CEP1	83	70,8	30,2	19,4	18,2	18,8	18,4	19,6	19	18,3	18,5	17,1	16,7	17,2	18,5	16,7	16,5	16,6
CEP2	82,9	60	29,4	18,6	17	17,1	16,7	17,2	18,5	16,7	16,5	16,6	16,1	16,4	16,2	16,8	17,1	17
EP1	80,8	52,1	24,5	19,7	19,3	18,8	18,4	19,6	19	18,8	18,9	19	18,5	18,6	19,3	19,8	20	19,9
GEP2	88,4	88,7	88,6	87,7	88,3	88,5	88	88,4	89,1	89,5	88,2	88	87,5	87,4	87,3	87	86,9	87
GEP3	88,8	88,7	89,4	89,3	88,9	88,6	89	90,5	90,7	90,2	89,4	89,6	88,3	89	87,5	88,1	89,3	89

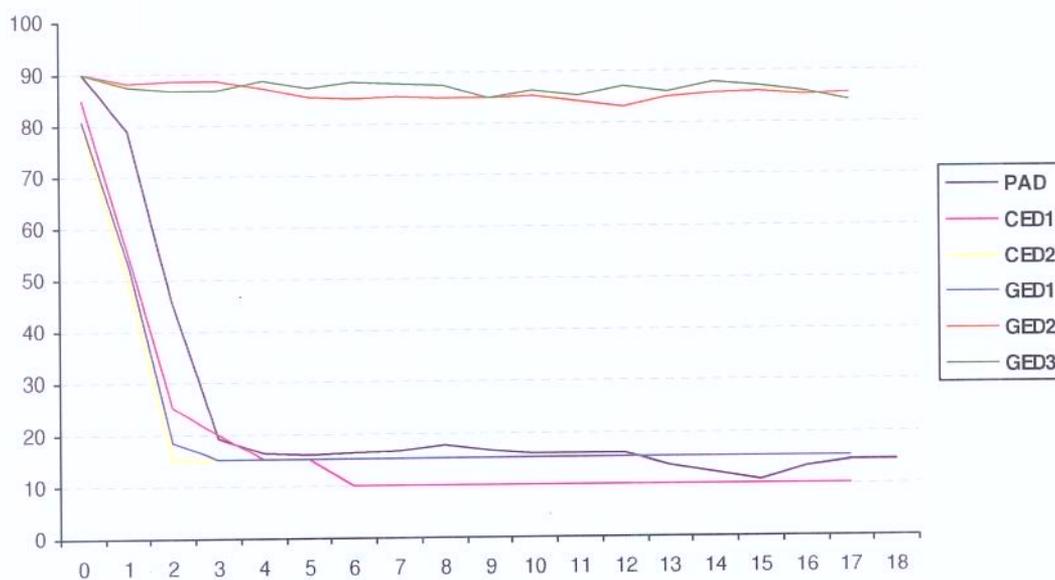


Figura 2 – Gráfico dos valores de transmitância para os grupos avaliados no período de 1 a 18 horas.

Observou-se que em CEP1 o crescimento microbiano no meio de cultura líquido não foi influenciado pela presença do tecido pulpar. Demonstrou-se que a imersão em soro fisiológico por 5 minutos não foi capaz de retardar o crescimento de *E. faecalis*, demonstrado pela rápida turvação do caldo de cultura nas primeiras 3 horas de avaliação. A configuração gráfica das curvas de crescimento bacteriano em CEP1 e CEP2 foi similar à curva de crescimento padrão (PAD).

As amostras imersas em hipoclorito de sódio 5,25% (GEP1) não demonstraram ação antimicrobiana residual, pois a curva de crescimento microbiana foi similar às obtidas em PAD, CEP1 e CEP2. Para os grupos GEP2 e GEP3 não se observou alteração significativa nos padrões de turvação do meio de cultura, o que indica uma possível inibição do crescimento bacteriano, promovido pela ação residual da clorexidina 2%, tanto nas formas líquida quanto gel.

**AVALIAÇÃO DO EFEITO RESIDUAL DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS
AUXILIARES EM DENTINA BOVINA, FRENTE AO *E. faecalis***

A metodologia empregada está de acordo com aquela descrita previamente e confirmada na execução do experimento-piloto. Para esta etapa, as amostras foram divididas em cinco grupos, sendo dois grupos controle e três grupos de teste, de acordo com o quadro abaixo.

Grupo	Amostras (n)	Bactéria	Tecido	Substância Química Auxiliar
CED1	3	<i>E. faecalis</i>	Dentinário	Ausente
CED2	3	<i>E. faecalis</i>	Dentinário	Soro Fisiológico
GED1	9	<i>E. faecalis</i>	Dentinário	Hipoclorito de Sódio 5,25%
GED2	9	<i>E. faecalis</i>	Dentinário	Clorexidina Líquida 2%
GED3	9	<i>E. faecalis</i>	Dentinário	Clorexidina Gel 2%

Foram feitas leituras no espectrofotômetro de hora em hora, incluindo o tempo imediato até a décima oitava hora. Nos intervalos de leitura, o conjunto foi mantido em condições gasosas específicas.

Tabela 3 – Média dos valores de transmitância para os grupos avaliados no período de 1 a 18 horas.

	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h	9 h	10 h	11 h	12 h	13 h	14 h	15 h	16 h	17 h	18 h
PAD	79,1	45,4	19,3	16,4	15,7	16,4	16,6	17,8	16,6	15,7	16	16	13,5	12,3	10,8	13,2	14,4	14,3
CED1	85,0	55,0	25,0	20,0	15,0	15,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
CED2	80,0	50,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
GED1	80,8	53,3	18,3	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
GED2	90,0	88,3	88,5	88,5	87,2	85,3	85,0	85,1	84,9	84,7	85,1	84,2	83,1	85,0	85,7	86,0	85,3	85,6
GED3	90,0	87,5	86,6	86,6	88,4	87,0	88,1	88,0	87,3	85,0	86,4	85,2	87,0	86,0	88,0	87,0	86,0	84,0

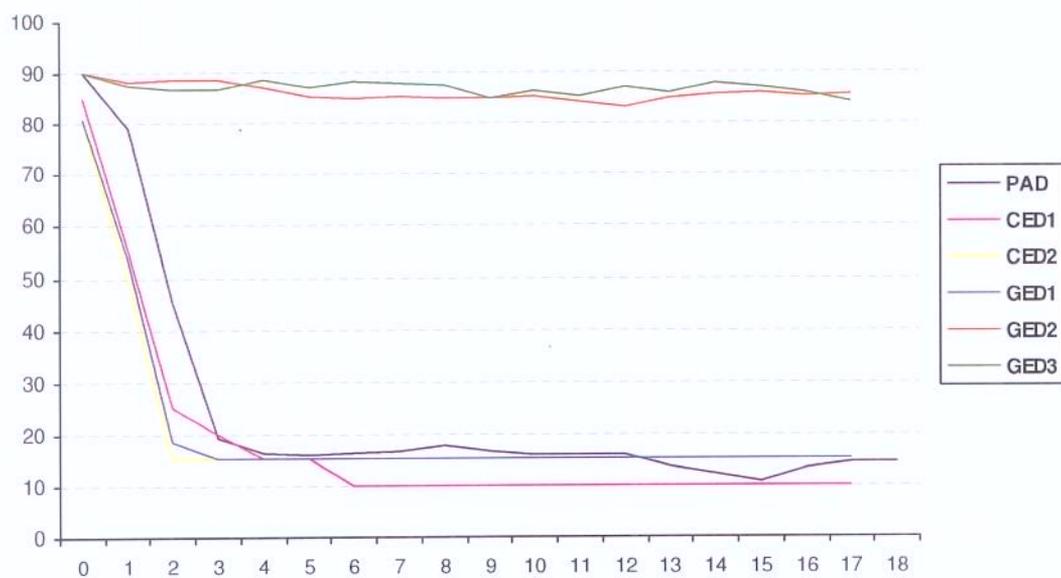


Figura 3 – Gráfico dos valores de transmitância para cada grupo no período de 1 a 18 horas.

Observou-se que em CED1 que o crescimento microbiano não foi influenciado pela presença do tecido dentinário. Demonstrou-se que a imersão em soro fisiológico por 5 minutos não foi capaz de retardar o crescimento de *E. faecalis*, demonstrado pela rápida turvação do caldo de cultura nas primeiras 3 horas de avaliação.

As amostras imersas em hipoclorito de sódio 5,25% (GED1) não demonstraram ação antimicrobiana residual, pois a curva de crescimento microbiana foi similar às obtidas em PAD, CED1 e CED2. Para os grupos GED2 e GED3 não se observou alteração significativa nos padrões de turvação do meio de cultura, o que indica uma possível inibição do crescimento bacteriano, promovido pela ação residual da clorexidina 2%.

A partir dos resultados percebeu-se uma inibição do crescimento bacteriano para os grupos testes GEP2, GEP3, GED2 e GED3, onde o digluconato de clorexidina 2% nas formas líquida e gel retardaram a turvação do caldo.

Conforme o cronograma das atividades da aluna bolsista, a segunda etapa do projeto consistia na avaliação da ação antimicrobiana residual das substâncias químicas auxiliares em dentina e polpa bovinas frente a bactéria anaeróbica estrita *Porphyromonas gingivalis*, porém foi realizada a substituição da bactéria anaeróbica estrita *P. gingivalis* pelo fungo *C. albicans* devido a dificuldade de padronização do inóculo e da manutenção da anaerobiose, crescimento irregular, lento e tardio, o que prolongava o tempo de testes, e sendo esta muito sensível ao oxigênio, em decorrente da metodologia do estudo, inviabilizava a execução do projeto proposto. Houve várias tentativas

para a obtenção da curva de crescimento, porém esta não foi obtida com sucesso, em consequência das características do microrganismo anaeróbio estrito.

A obtenção e preparo das amostras de tecidos pulpar e dentinário foram os mesmos descritos para o estudo em *E. faecalis*. Foi empregado o método do contato direto em meio líquido, através da observação da curva de crescimento microbiano, a padronização do inóculo seguiu a técnica descrita por Gomes *et al* (2001). A suspensão foi ajustada no espectrofotômetro com absorvância de 800nm, até atingir a concentração equivalente a 0.5 (transmitância 90) da escala de MacFarland, realizando a leitura da curva de crescimento em Meio Líquido YPD (Yest Peptone Dextrose).

**AVALIAÇÃO DO EFEITO RESIDUAL DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS
AUXILIARES EM POLPA BOVINA FRENTE A *C. albicans***

A metodologia empregada está de acordo com aquela descrita previamente no projeto de pesquisa e confirmada na execução do experimento-piloto. Para esta etapa, as amostras foram divididas em cinco grupos, sendo dois grupos controle e três grupos de teste, de acordo com o quadro abaixo.

Grupo	Amostras (n)	Bactéria	Tecido	Substância Química Auxiliar
CEP1	3	<i>C. albicans</i>	Pulpar	Ausente
CEP2	3	<i>C. albicans</i>	Pulpar	Soro Fisiológico
GEP1	9	<i>C. albicans</i>	Pulpar	Hipoclorito de Sódio 5,25%
GEP2	9	<i>C. albicans</i>	Pulpar	Clorexidina Líquida 2%
GEP3	9	<i>C. albicans</i>	Pulpar	Clorexidina Gel 2%

Foram feitas leituras no espectrofotômetro de hora em hora, incluindo o tempo imediato até a décima primeira hora. A partir deste período, observou-se estabilização do crescimento do fungo. Nos intervalos de leitura, o conjunto foi mantido em condições gasosas específicas.

Tabela 4 – Média dos valores de transmitância para os grupos de teste no período de 1 a 11 horas.

	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h	9h	10h	11h
CEP1	89,9	87,9	88,7	72,8	66	50,8	47,6	25,2	19,8	20	16,2
CEP2	90,6	89,3	84	75,3	70,3	53,7	39,7	28,9	26,5	19,3	13,9
GEP1	94,5	89,8	87,2	84,2	78,5	67,6	51,4	40,4	32,4	25,9	17,8
GEP2	93,8	85,5	76,8	80,5	80,3	80,3	80,6	78,4	78,7	78,6	77,3
GEP3	90,1	82,3	81,7	82,4	81,2	79,1	79,7	79,3	77,9	78,6	79,3

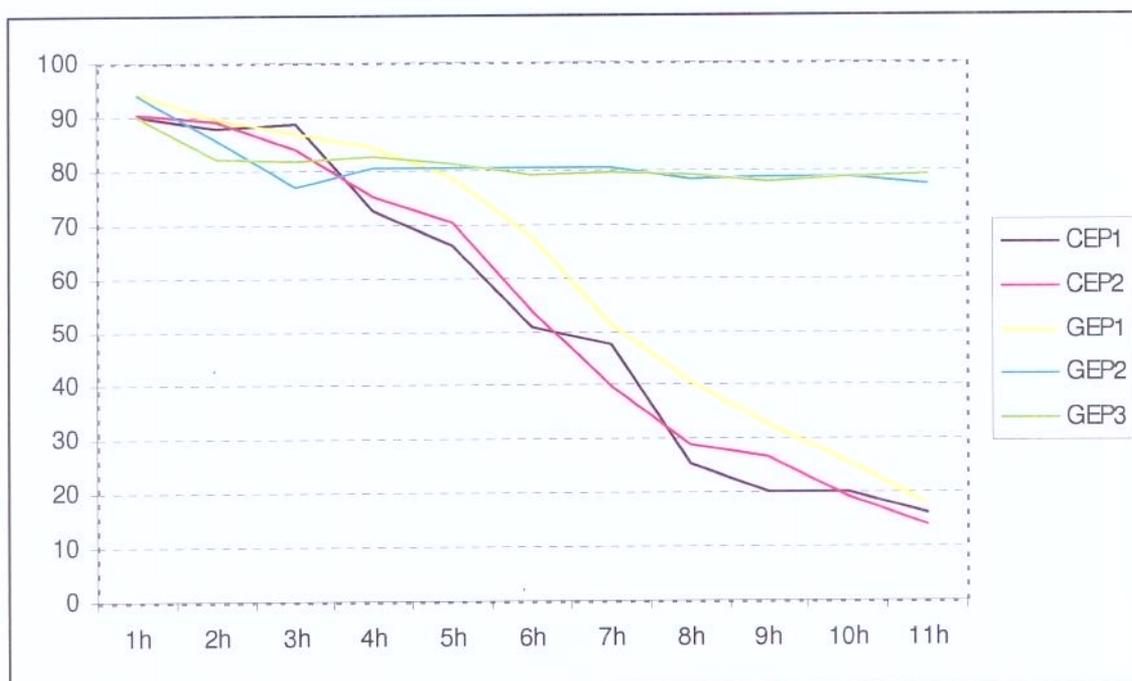


Figura 4 – Gráfico dos valores de transmitância para os grupos avaliados no período de 1 a 11 horas

Observou-se em CEP1 que o crescimento microbiano não foi influenciado pela presença do tecido pulpar.

A rápida turvação de CEP2 demonstrou que a imersão em soro fisiológico por 5 minutos não foi capaz de retardar o crescimento de *C. albicans*.

As amostras imersas em hipoclorito de sódio 5,25% (GEP1) não demonstraram ação antimicrobiana residual, tendo apenas um efeito retardador nas primeiras 3 horas, pois a curva de crescimento microbiana foi similar às obtidas em CEP1 e CEP2.

Para os grupos GED2 e GED3 não se observou alteração significativa nos padrões de turvação do meio de cultura, conseguindo manter altos os valores da transmitância, o que indica uma possível inibição do crescimento bacteriano, promovido pela ação residual da clorexidina 2%, demonstrando que os efeitos da clorexidina gel e líquida são muito semelhantes.

AVALIAÇÃO DO EFEITO RESIDUAL DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS AUXILIARES EM DENTINA BOVINA, FRENTE A *C. albicans*

A metodologia empregada está de acordo com aquela descrita previamente no projeto de pesquisa e confirmada na execução do experimento-piloto. Para esta etapa, as amostras foram divididas em cinco grupos, sendo dois grupos controle e três grupos de teste, de acordo com o quadro abaixo.

Grupo	Amostras (n)	Bactéria	Tecido	Substância Química Auxiliar
CED1	3	<i>C.albicans</i>	Dentinário	Ausente
CED2	3	<i>C.albicans</i>	Dentinário	Soro Fisiológico
GED1	9	<i>C.albicans</i>	Dentinário	Hipoclorito de Sódio 5,25%
GED2	9	<i>C.albicans</i>	Dentinário	Clorexidina Líquida 2%
GED3	9	<i>C.albicans</i>	Dentinário	Clorexidina Gel 2%

Foram feitas leituras no espectrofotômetro de hora em hora, incluindo o tempo imediato até a décima primeira hora. A partir deste período, observou-se estabilização do crescimento do fungo. Nos intervalos de leitura, o conjunto foi mantido em condições gasosas específicas.

Tabela 5 – Média dos valores de transmitância para os grupos de teste no período de 1 a 11 horas.

	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h	9h	10h	11h
GED3	89,8	86,6	81,5	82,4	79,8	76,0	72,2	69,7	63,6	61,2	57,8
GEP2	85,4	82,2	79,4	72,5	70,2	68,8	60,8	49,1	47,2	42,1	38,3
GED1	86,6	85,7	81,0	74,8	66,2	48,8	34,1	24,9	19,0	17,6	12,1
CED1	89,9	87,9	88,7	72,8	66	50,8	47,6	25,2	19,8	20	16,2
CED2	91,1	89	80,7	71	50,9	41,8	34,2	28,2	15,2	10,3	11,6

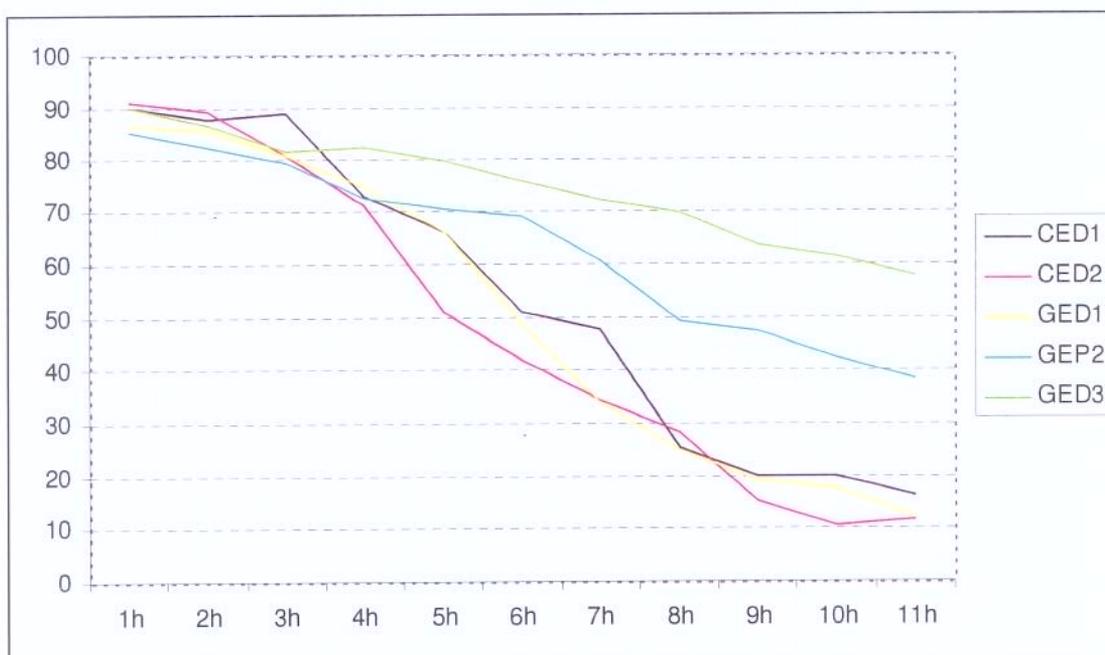


Figura 5 – Gráfico dos valores de transmitância para os grupos avaliados no período de 1 a 11 horas.

Observou-se que em CED1 o crescimento microbiano no meio de cultura líquido não foi influenciado pela presença do tecido dentinário.

A imersão em soro fisiológico por 5 minutos não foi capaz de retardar o crescimento de *C. albicans*, demonstrado pela rápida turvação do caldo de cultura. A configuração gráfica das curvas de crescimento bacteriano em CED1 e CED2 foram similares.

As amostras imersas em hipoclorito de sódio 5,25% (GED1) não demonstraram ação antimicrobiana residual, pois apresentou uma curva de crescimento microbiana bastante acentuada, mostrando que não conseguiu manter sua ação antimicrobiana estável.

Para os grupos GEP2 e GEP3 não se observou alteração significativa nos padrões de turvação do meio de cultura, o que indica uma possível inibição do crescimento bacteriano, promovido pela ação residual da clorexidina 2% tanto nas formas líquida quanto gel, visto que suas curvas de crescimento se mantiveram relativamente estáveis, tanto nas formas líquida quanto gel.

DISCUSSÃO

O principal objetivo do preparo químico mecânico é a remoção de restos pulpares e debris de dentina do interior do sistema de canais radiculares. A fim de alcançar esse objetivo, é essencial a combinação de substâncias químicas e instrumentos durante o preparo do canal radicular. Sem o uso dessas substâncias, grande quantidade de debris e bactérias podem permanecer no interior do sistema de canais radiculares (Spangberg, 1982; Yesilsoy et al, 1995).

Muitos estudos na literatura têm proposto o estudo de infecções dentinárias e pulpares, e a maioria deles utiliza o *E. faecalis* como microrganismo de escolha. *E. faecalis* é um coco anaeróbio facultativo gram-positivo, o qual é mencionado como uma das espécies mais resistentes na cavidade oral e uma possível causa de retratamento radicular (Gomes et al, 1996b).

O fungo mais comumente isolado em canais radiculares e frequentemente associado às bactérias gram-positivas, é *Candida albicans*. A dentina radicular e o tecido pulpar necrótico fornecem condições ideais para a infecção por fungos, o que dificulta a sua erradicação do sistema de canais radiculares. Assim o fungo *C. albicans* tem a capacidade de se adaptar e tolerar as alterações ambientais e nutricionais que se estabelecem durante a terapia endodôntica (Watilmo et al, 2004).

Sabe-se que mesmo em casos de canais radiculares bem tratados, algumas bactérias e fungos podem permanecer vivos, devido às

complexidades anatômicas do sistema de canais radiculares (Ida e Gutmann, 1995).

Devido à permanência de bactérias no complexo radicular, e suas conhecidas conseqüências como por exemplo o insucesso do tratamento endodôntico, este estudo vem propor a verificação, *in vitro*, da capacidade de adsorção e liberação de substâncias químicas auxiliares aos tecidos pulpare e dentinários bovino, através da avaliação da ação antimicrobiana residual. A presença de istmos, ramificações, reentrâncias dos canais radiculares (Nair et al, 1999) e a incapacidade de promover uma completa sanificação do sistema radiculares, permite a presença de tecido pulpar necrótico, facilitando assim a instalação/ ou perpetuação da infecção (Byström e Sundqvist, 1983). A ação antimicrobiana residual das substâncias químicas auxiliares poderia ser um dos principais meios para retardar e principalmente estabilizar o crescimento bacteriano, que foi observado através da curva de crescimento dos microrganismos testados.

Assim o sucesso da terapia endodôntica é dependente da redução e/ou inativação dos microrganismos que perpetuam dentro do sistema de canais radiculares (Möller & Orstavick 1985).

A partir dos resultados obtidos pelo estudo pode-se observar que tanto o *E. faecalis* quanto *C. albicans* são sensíveis às substâncias testadas (clorexidina 2% gel e líquida e hipoclorito de sódio 5.25%). A estabilização da curva de crescimento obtida pela clorexidina 2% (gel e líquida) foi mais satisfatória e linear, do que a obtida com o uso do hipoclorito de sódio 5.25%, frente ao patógeno *E. faecalis* e ao fungo *C. albicans*. Em relação aos dois patógenos, a clorexidina 2% iniciou a estabilização da curva dentro da segunda

e terceira hora, até a décima oitava hora de testes. Já o hipoclorito de sódio 5.25% não conseguiu manter a curva de crescimento regularizada. Ocorreu um rápido turvamento do meio, seguindo o padrão do grupo controle e do soro fisiológico, demonstrando assim sua ineficácia em conseguir manter um efeito residual nos canais radiculares, algo tão importante para a inativação das bactérias sobreviventes e conseqüentemente restabelecimento da integridade dos tecidos periapicais.

Não houve diferença significativa entre os resultados obtidos a partir da adsorção e liberação da clorexidina 2% gel e líquida. O comportamento, frente à adsorção e liberação das substâncias químicas auxiliares dos tecidos pulpar e dentinário não teve diferenças significativas, demonstrando que tais tecidos agem de maneira semelhante frente a ação antimicrobiana residual dos irrigantes.

Todas essas informações científicas devem nos remeter a uma prática endodôntica mais criteriosa, a fim de obtermos sucesso do tratamento. Este deve ser realizado dentro dos princípios de manutenção de uma cadeia asséptica, uso adequado de uma substância química auxiliar com atividade antimicrobiana efetiva, que tenha ação residual; e também através de uma obturação tridimensional dos canais radiculares e de uma restauração definitiva adequada do dente em questão. Isto deve ser feito para se evitar a manutenção da infecção e uma possível re-infecção. A presença de microrganismos nos canais radiculares propicia uma fonte adicional de irritação, que o organismo precisa superar para obter a cura de um processo inflamatório (Weine, 1998).

CONCLUSÃO

Baseado nas condições experimentais utilizadas em nosso estudo e nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- a) As substâncias químicas auxiliares do grupo da clorexidina têm capacidade de adsorção e liberação pelos tecidos pulpar e dentinário;
- b) As substâncias químicas auxiliares, clorexidina 2% gel e líquida e hipoclorito de sódio 5.25%, têm ação antimicrobiana frente aos patógenos *E.faecalis* e *C. albicans*;
- c) A atividade antimicrobiana residual da clorexidina 2% (gel e líquida) é superior a do hipoclorito de sódio 5.25%.

BIBLIOGRAFIA

1. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983; 55: 307-12.
2. 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.
3. Gomes BPFA. An investigation into the root canal microflora [thesis] Manchester – UK: UDHM; 1995.
4. Gomes BPFA, Ferraz CCR, Viana ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2001; 34: 424-8.
5. Gomes BP, Lilley JD, Drucker DB. Associations of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. *Int Endod J* 1996; 29: 69-75.
6. Gomes BPFA, Vianna ME, Matsumoto CU, Rossi VPS, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ (2005). Disinfection of gutta-percha cones with chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 100: 512-7.
7. Ida RD, Gutman JL. Importance of anatomic variables in endodontic treatment outcomes: case report. *Endod Dent Traumatol.* 1995; 11: 199-203.

8. Jacinto RC, Gomes BPFA, Shah HN, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Incidence and antimicrobial susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* isolated from mixed endodontic infections. *Int Endod J.* 2006; 39:62-70.
9. Love MR. Regional variation in root dentinal tubule infection by *Streptococcus gordonii*. *J. Endod.* 1996; 22:290-3.
10. Möller B, Orstavik D. Influence of antiseptic storage solutions on physical properties of endodontic gutta-percha points. *Scand J Dent Res* 1985; 93: 158-61.
11. Nair PNR, Sjögren U, Fidgor D, Sundqvist G. Persistent periapical radiolucences of root-filled human teeth, failed endodontic treatments, and periapical scars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1999; 87: 617-27.
12. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int End J.* 2003; 36:1-11.
13. Schilder H. Cleaning and shaping the root canal. *Dent. Clin. Nort. Am.* 1974; 18:269-96.
14. Siqueira EL, Okino IA, Santos M, Bombana AC, Figueiredo JPA. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine gel. *Int. Endod. J.* 2004; 37: 38-41.
15. Spangberg L.S.W. Endodontic medicaments. In: Smith Dc & Williams DF, eds. *Biocompatibility of dental materials*. Boca Raton, USA: CRC press, 223- 57, 1982.
16. Yesilsoy C, Whitaker E, Cleveland D, Phillips E, Trope M. Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. *J Endod* 1995; 10: 513-5.

17. Weine, F.S. Tratamento Endodôntico, 5 ed, São Paulo: Santos, 1998.

