UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

GLÁUCIA BEATRIZ GONÇALVES

**Influência do soro bovino e pó de dentina na efetividade
antimicrobiana intratubular de soluções de hipoclorito de sódio e
clorexidina**

BAURU
2019

GLÁUCIA BEATRIZ GONÇALVES

Influence of bovine serum and dentin powder on the intratubular antimicrobial effectiveness of sodium hypochlorite and chlorhexidine solutions

Influência do soro bovino e do pó de dentina na efetividade antimicrobiana intratubular de soluções de hipoclorito de sódio e clorexidina

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Endodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Flaviana Bombarda de Andrade

BAURU

2019

Gonçalves, Gláucia Beatriz

Influência do soro bovino e do pó de dentina na
efetividade antimicrobiana intratubular de soluções
de hipoclorito de sódio e clorexidina / Gláucia Beatriz
Gonçalves. – Bauru, 2019

70 p. : il. ; 31cm.

Dissertação de Mestrado – Faculdade de
Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Profa. Dra. Flaviana Bombarda de
Andrade

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos
fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Projeto de pesquisa aprovado pelo
Comitê de Ética em Pesquisa da
Faculdade de Odontologia de Bauru,
Universidade de São Paulo, em 17 de
Dezembro de 2018.

Comitê de Ética da FOB-USP
Registro **CAAE:**
99729818.7.0000.5417

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho às pessoas mais importantes da minha vida, minha mãe **Sebastiana Antônia Blasques** e ao meu amado esposo **Ivan Orsini Martins**.

Primeiramente, **MÃE**, muito obrigada por ser a mulher que você é, por ter me ensinado meus princípios, a sempre ter fé, honestidade, amor, humildade e sempre correr atrás dos meus sonhos. Obrigada por todo carinho, amor e compreensão de todos esses anos. Obrigada por todos os esforços e sacrifícios que fez para que eu e meu irmão pudéssemos ao menos tentar realizar todos os nossos sonhos, sei que nem sempre foi fácil, mas você sempre esteve do nosso lado, não importava o que acontecesse. Peço perdão desde já pela minha ausência, devido a distância, sei que não foi fácil. Desculpa por todas as preocupações que te causei por inúmeros motivos, muito obrigada por sempre acreditar em mim e nunca desistir.

Ivan, obrigada por ser o homem maravilhoso que é, não mudaria nada em você mesmo que eu pudesse. Obrigada por sempre acreditar em mim, por todo o apoio em todas as minhas escolhas e principalmente por **NUNCA** me deixar desistir. Sei que ainda temos um lindo caminho pela frente.

Dedico também, aos meus companheiros de quatro patas **Jack e Jullie**, por todo amor, e alegria principalmente nos dias difíceis, que vocês estavam lá para mudar o meu humor e só dar amor. Hoje apenas a Jullie me espera em casa, mas sei que onde o Jack estiver, ele está feliz por mais essa etapa concluída e sem eles não teria sido possível.

A vocês meus sinceros agradecimentos com todo amor. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

À **Deus** por ter me dado a vida, por ter me proporcionado momentos incríveis nessa caminhada. Obrigada por ter colocado pessoas maravilhosas na minha vida e cada uma delas me ensinado algo especial. Obrigada por estar presente em todos os momentos, e naqueles em que eu me sentia incapaz, o Senhor estava ali para me confortar, acalmar e me mostrar o caminho a seguir. Obrigada por me permitir realizar mais esse sonho, pelas alegrias e tristezas compartilhadas. Obrigada por sempre me guiar, me iluminar e proteger. À Deus, toda honra e toda glória, agora e para sempre, Amém!!!

Ao meu amado irmão, **Éderson André Gonçalves**, por sempre estar presente. Por ser minha referência de pai, irmão, amigo, parceiro. Obrigada por ter feito de mim a mulher que sou hoje, sem você tenho certeza que tudo seria diferente. Obrigada por me amar incondicionalmente, por me apoiar do seu jeito, mas nunca deixou de estar comigo. Por ser extremamente protetor, de ser o irmão mais ciumento, mas sempre buscando o melhor para mim. Tenho muito orgulho em dizer que você é meu pai e sempre será. Orgulhosa de ver o homem que você é e o pai maravilhoso que é para o Miguel.

À minha cunhada **Elaine Melo**, que chegou nas nossas vidas para mudá-las completamente trazendo a alegria da casa, nosso Amado anjinho Miguel. Obrigada por fazer o meu irmão feliz e dar o melhor presente da vida dele.

Ao meu Marido **Ivan**, obrigada por acreditar em mim mesmo quando eu não acreditava. Obrigada, por me fazer feliz, por me apoiar nas decisões mais malucas, por abrir mão de tantas coisas e sonhos, só para que eu pudesse estar realizando esse sonho de ser Mestre em Endodontia pela FOB-USP. Obrigada, por não medir esforços para me fazer feliz, e realizar meus sonhos, por nunca desistir de mim. Obrigada por não surtar, quando eu estou surtando. Agradeço a Deus todos os dias por ter colocado você na minha vida, de uma forma que eu nunca achei que aconteceria. Há 8 anos atrás você bateu na minha porta e mudou a minha vida, literalmente. Obrigada por ter me dado os melhores presentes, que são o Jack e a Jullie, meus companheiros eternos de quatro patas. Obrigada por não ter medido esforços para cuidar do nosso Jack, e estar comigo quando ele nos deixou.

Desculpa pela ausência devido a distância, por estar ausente em algumas datas comemorativas e mesmo assim você entender. Obrigada por cada palavra, por ser meu porto seguro, meu melhor amigo, meu companheiro, meu amor. Sei que não foi fácil, mas você sempre falou que valeria a pena e que tudo é pela nossa família. Obrigada, amo você!

Agradecimento aos professores

A minha querida orientadora **Profª Drª Flaviana Bombarda de Andrade**. Obrigada por todos os ensinamentos e principalmente por ter me apresentado o mundo da microbiologia, o qual hoje sou apaixonada e compreendi a importância desse universo. Obrigada por ter me acolhido da melhor maneira possível, por permitir que o meu sonho da pós-graduação fosse concretizado e ter me ensinado tanto de tantas maneiras diferentes. Obrigada por todo o conhecimento compartilhado, por confiar em mim para realização desse trabalho. A senhora me ensinou muito mais do que possa imaginar. Meu sincero agradecimento por tudo, por cada dia!

Ao **Profº Drº Marco Antonio Hungaro Duarte** por todos os ensinamentos, por cada conhecimento compartilhado da melhor maneira possível. Por toda a ajuda e compreensão, pela humildade de sempre e pelo amor à docência, que nos contagia. Obrigada por ter aceitado de prontidão formar a banca examinadora e contribuir com o nosso trabalho.

Ao **Profº Drº Rodrigo Ricci Vivan** por todos os ensinamentos compartilhados, por toda a ajuda e contribuição para a elaboração deste trabalho.

Ao **Profº Drº Roberto Brandão Garcia** por todos os ensinamentos compartilhados, pelo carinho com os alunos, mas principalmente o amor que o senhor espalha durante sua aula, nunca esquecerei do seu preâmbulo e as conversas durante as aulas, pois sua paixão pela docência e sua aula são fascinantes.

Aos Professores do departamento de Endodontia da FOB-USP; Clóvis Monteiro Bramante, Norberti Bernardineli, por todos os ensinamentos, mas principalmente o amor pela docência.

Ao **Profº Drº Evandro Watanabe** obrigada por ter sido tão acessível e ter aceitado instantaneamente o convite para fazer parte da banca examinadora da minha dissertação, deixando seus afazeres na USP – Ribeirão Preto, para contribuir com o nosso trabalho.

A **Profª Drª Nair Narumi Orita Pavan** que foi minha professora e orientadora de graduação, a pessoa responsável pelo meu amor pela Endodontia, que também espalha amor pela docência e nos faz apaixonar. A senhora me acolheu lá atrás, quando não sabia direito o que eu queria e me mostrou a Endodontia, a qual me apaixonei e não me vejo sem ela na minha vida. A senhora é uma das responsáveis por eu estar concluindo essa etapa. Obrigada por todo o incentivo e ajuda com os estudos, não medindo esforços para que eu pudesse realizar uma boa prova para entrar na pós-graduação. Só tenho a agradecer por tudo. Muito obrigada por também aceitar a formar a minha banca avaliadora e contribuir ainda mais com esse momento tão especial.

A todos os professores que fizeram parte da minha formação, os meus sinceros agradecimentos, sem vocês nada disso seria possível. Agradeço pelos ensinamentos endodônticos dos professores da Universidade Estadual de Maringá, **Profº Drº Carlos Alberto Herrero de Moraes**, **Profº Drº Alfredo Franco Queiroz** e ao **Profº Drº Marcos Sergio Endo** que também é responsável pelo meu amor pela docência, obrigada por cada conselho, conversa e ajuda de sempre, por confiar em mim, e acreditarem que esse sonho era possível. Todos foram fundamentais para a minha chegada até aqui.

Meu muito obrigada aos funcionários do Departamento de Endodontia, **Suely Regina Bettio** e **Edimauro de Andrade**, por sempre estarem a disposição para nos ajudar, pelas brincadeiras para descontrair nosso dia, muito obrigada!

Aos meus amigos da pós-graduação

A **Vanessa Abreu Sanches Marques**, que é uma pessoa maravilhosa e que agradeço todos os dias por ter colocado você na minha vida, uma grande amiga que sei que estará comigo sempre e no que eu precisar. Vanzinha te conheço há sete anos e nunca havia imaginado o quanto as coisas mudaram e nos aproximamos nos últimos três anos e só tenho a agradecer, obrigada por todos os conselhos, todas as

conversas, por todos os choros que você aguentou de mim. Sem você aqui comigo tenho certeza que não teria conseguido e nem chegado onde estou, te admiro muito, sempre amorosa com todos, muito responsável em tudo e com todos. Uma mulher linda, e extremamente dedicada que é meu espelho de profissional, amiga e filha. Obrigada por cada palavra de conforto e apoio sempre. Desejo que você conquiste todos os seus sonhos, que sua caminhada seja repleta de coisas maravilhosas, porque você merece muito. Minha eterna gratidão, você tem um futuro brilhante, amo muito você, estarei aqui para você sempre, você é muito especial, nunca duvide disso.

À **Letícia Citelli Conti**, uma pessoa de uma fé e bondade contagiante, um presente de Deus na minha vida, nos aproximamos em um SbpQQ, alguns anos atrás e fomos como conhecidas e voltei com uma amiga que sabia que poderia contar para sempre. Le, te admiro tanto que você nem imagina, sua força inabalável, sua dedicação, seu amor em tudo que faz. Seu futuro é brilhante, o mundo é seu e você está pronta para alcançá-lo. Nunca deixe que ninguém te fale o contrário, porque não merece ter uma pessoa como você. Muito obrigada por sua preciosa amizade, por todos os ensinamentos e momentos de felicidade e tristeza que compartilhamos. Obrigada por cada conselho, cada palavra amiga e cada gesto de conforto.

Você e a Van, são meus presentes de Deus, sem vocês aqui não sei se teria conseguido. Obrigada por estarem comigo e me ajudarem sem medir esforços quando perdi o meu Jack. Obrigada, amo demais vocês!

À **Maricel Rosario Cardenas Cuéllar**, desde o primeiro dia que cheguei na faculdade você sempre foi tão atenciosa e dedicada, sempre a disposição. Esse trabalho é nosso, pois você contribuiu muito, não só para ele, mas você me acolheu muito bem, me ensinou muito, obrigada por todas as conversas e aprendizados, você é uma pessoa maravilhosa, com um coração enorme e que não vê maldade nas pessoas. Com uma imensa fé, que tem muito a nos ensinar, muito obrigada!

À **Jessica Coelho**, você é uma menina maravilhosa, de um coração imenso, batalhadora, dedicada, com um futuro lindo pela frente. Te admiro muito Jé, você é uma pessoa iluminada e nunca deixe que ninguém apague ou ofusque sua luz. Seu futuro é lindo, desejo que seu caminho seja repleto de coisas maravilhosas.

À **Arthur Lemos**, você é um menino contagiante, uma alegria e humildade que não cabem em você. Aprendi muito com você, mas principalmente que esse mestrado me deu um irmão. Obrigada por todas as conversas, risadas e momentos de conflito e preocupações que passamos juntos, você é muito especial, e sei que seu futuro é lindo, acho que crescemos nesses dois anos. Sua amizade é muito importante. Obrigada por tudo!

À **Pedro Titato**, você é especial, com seu jeitinho meio tímido no começo, mas com coração imenso, muito obrigada por tudo.

À **Vitor Moraes**, você é muito especial Vitão, sempre com seu carisma contagiante, sempre a disposição para nos ajudar em tudo.

Sou muito grata, por ter vocês três como minha turma de mestrado, pois aprendi muito com cada um de vocês, e me acolheram tão bem, mesmo eu sendo a única mulher, muito obrigada por tudo, nunca vou esquecer de tudo que passamos.

À **Renan Furlan**, obrigada por sempre ser o mais gentil e amigável, que me recebeu tão bem, por alegrar por onde passa. Obrigada por tudo, por cada conversa, por cada risada, por cada momento que compartilhamos, você é muito especial!

À **Gislene Vertuan**, você sempre quietinha, mas com uma bondade e uma força que poucas pessoas conhecem, extremamente dedicada e amiga. Obrigada por tudo, por cada palavra de conforto, pelos momentos compartilhados.

À **Murilo Alcalde**, muito obrigada por tudo, obrigada por todos os conselhos, conversas, risadas, puxões de orelha e toda a ajuda que me deu para a conclusão desse trabalho, sem você não teria conseguido. Muito obrigada!

A todos os meus amigos da pós-graduação, **Lyz Cristina Furquin, Rafaela Zancan, Francine Cesário, Gabriela Piai, Pedro Calefi, Melissa Rivera, Jussaro, Talita Tartari, Mariana Borges, Clarissa Teles, Flavia Vivacqua**, obrigada por tudo!

À **Cássia Fiorentini**, minha linda, temos tanto em comum, obrigada por ser do jeitinho que você é. Obrigada por me acompanhar e estar comigo nesses sete anos, uma amizade que surgiu na faculdade e levarei para a vida, obrigada pelas noites de pipoca e brigadeiro, por todos os desabafos e conselhos, você é incrível e o mundo é seu.

À **Siliane Alburquerque**, compartilhamos desse amor pela endodontia, obrigada por tudo, por estar comigo durante esses anos, sempre apoiando. Você é incrível Sili. Muito obrigada!

À **Bruna Gonçalves**, obrigada por todos esses anos de amizade, por estar comigo sempre, sou muito grata por ter vocês. Obrigada por todos as alegrias que compartilhamos.

Ao meu quinteto da faculdade: **Fernanda Andreassen, Isadora Mecca, Jéssica Crispim, Maisa Pereira da Silva**, mesmo estando cada um em um lugar, continuamos juntas, sempre apoiando uma a outra, muito obrigada pela amizade, vocês são especiais demais, amo vocês!

Às minhas amigas e parceiras e promessa **Yasmin Firmino e Izabela Marques Volpato**, por todo o apoio, trocas de conhecimento, parceria em congressos e amizade de todos esse anos.

À **Leya Lopes**, a irmã que Deus me deu, mesmo não sendo de sangue. Obrigada por sempre me apoiar em todas as minhas decisões, mesmo quando todos estão falando que é loucura. Obrigada por ter me dado um dos melhores presentes que é ser madrinha do nosso Caio. Tenho muito orgulho de você, é uma mulher maravilhosa, uma mãe incrível que tem tanto a oferecer ao mundo. Enquanto eu existir, você nunca estará só!

Obrigada a **CAPES**, pela concessão da bolsa de estudos para realização dessa pesquisa.

Sou muito grata a DEUS, por ter colocado cada um de vocês na minha vida, vocês são muito especiais, cada um tem um lugar especial no meu coração!

**“Deus nunca disse que a jornada seria fácil; mas Ele disse
que a chegada valeria a pena”**

Max Lucado

RESUMO

O canal radicular de polpas necrosadas possui uma quantidade abundante de bactérias, que podem causar reações inflamatórias nos tecidos periapicais. Para combater essas bactérias é necessário um tratamento endodôntico de qualidade, no entanto, existe aquelas que são persistentes no canal radicular, como o *Enterococcus faecalis*, que é capaz de penetrar nos túbulos dentinários em profundidade. O tratamento endodôntico é composto por etapas e a irrigação é de grande importância, pois utilizam soluções que apresentam ação antimicrobiana, como o hipoclorito de sódio e clorexidina. Durante a limpeza do canal, as soluções entram em contato com substâncias químicas, que estão presentes no canal radicular contaminado. Frente a isso, o objetivo do estudo é averiguar se há uma diminuição da ação antimicrobiana das soluções irrigadoras utilizadas no tratamento de canais radiculares, na presença de debris dentinários e soro fetal bovino com albumina sérica. Foram utilizados pré-molares inferiores, com contaminação intratubular padronizada com *Enterococcus faecalis*, sendo divididos em seis grupos quanto aos irrigantes (n=10), GI) Hipoclorito de sódio (NaOCl), GII) NaOCl + pó de dentina, GIII) NaOCl + soro bovino, GIV) Clorexidina, GV) Clorexidina + pó de dentina, GVI) Clorexidina + soro bovino. Os dentes foram analisados em microscopia confocal de varredura a laser (MCVL), corados com LIVE / DEAD®, para evidênciação de bactérias vivas e mortas e ainda a coloração com Calcofluor branco M2R, para detecção de matriz de substâncias extrapoliméricas (EPS). Os resultados foram tabulados e analisados estatisticamente ($p < 0,05$), mostrando que o pó de dentina e o soro fetal bovino foram capazes de diminuir a ação antimicrobiana das soluções irrigadoras, porém o pó de dentina teve efeito maior. Já na eliminação da matriz do biofilme o soro bovino diminuiu mais a ação das soluções. Dessa forma, conclui-se que o pó de dentina diminui a ação antimicrobiana das soluções, e que o soro fetal bovino diminui a eliminação da matriz das bactérias, mostrando grande interferência destes compostos orgânicos na ação dos irrigantes.

Palavras chave: *Enterococcus faecalis*; Hipoclorito de sódio; Clorexidina; Albumina sérica bovina;

ABSTRACT

The root canal of pulpless teeth has an abundant amount of bacteria, which can cause inflammation at the periapical tissues. A good endodontic treatment is necessary to combat these bacteria, however, there are some persistent ones, such as *Enterococcus faecalis*, which is able to penetrate deep into dentin tubules. The Endodontic treatment consists of steps and the irrigation very important, because solutions that present antimicrobial action, are used sodium hypochlorite and chlorhexidine. During the cleaning of the canal, the solutions get contact with chemicals substances, which are present in the infected root canal. Based on that, the aim of this study was to determine if there is a decrease in the antimicrobial action of the irrigating solutions used in the treatment of root canals, in the presence of dentinary debris and fetal bovine serum with serum albumin. Standardized intratubular contamination of lower premolars with *Enterococcus faecalis*, was held, and teeth divided into six groups according the irrigators (N = 10): GI) Sodium hypochlorite (NaOCl), GII) NaOCl + dentin powder, GIII) NaOCl + bovine serum, GIV) Chlorhexidine, GV) Chlorhexidine + dentin powder, GVI) Chlorhexidine + bovine serum. The teeth were analyzed in Confocal laser scanning microscopy (MCVL), stained with LIVE / DEAD®, for evidencing the living and dead bacteria and a staining with white Calcofluor M2R, for the detection of extracellular matrix substance (EPS). The results were tabulated and analyzed statistically ($p < 0.05$), showing that the dentin powder and fetal bovine serum were able to decrease the antimicrobial action of the irrigating solutions, but the dentin powder was more efficient. On the elimination of the biofilm matrix the bovine serum decreased the action of the other side, at the elimination of the biofilm matrix, the bovine serum decreased more the action of the solutions. Thus, it was concluded that the dentine powder decreased the antimicrobial action of the solutions, and the fetal bovine serum decreased the dissolution of the bacterial matrix, showing great influence of these organic compounds in the action of the irrigators.

Key words: *Enterococcus faecalis*; Sodium hypochlorite; Chlorhexidine; Bovine serum albumin;

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	ARTIGO.....	23
3	DISCUSSÃO	43
4	CONCLUSÃO.....	51
5	REFERÊNCIAS	55
6	ANEXO	63

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Para obter o sucesso nos tratamentos endodônticos de dentes com polpas necrosadas e regressão das lesões periapicais, é necessário a eliminação dos micro-organismos presentes no canal radicular. Dessa forma, a combinação das etapas de instrumentação e irrigação se tornam de extrema importância, pois através dessas, ocorre uma redução e/ou eliminação dos micro-organismos, até um nível que o organismo consiga reparar o tecido periapical.

Entretanto, não podemos nos preocupar apenas com os micro-organismos que são deixados no interior do canal radicular, mas também com os que permanecem no interior dos túbulos dentinários. Estudos relatam presença de micro-organismos vivos nos túbulos dentinários, de dentes contaminados endodônticamente. Há bactérias persistentes, que penetram em profundidade nestes túbulos, como o *Enterococcus faecalis* ⁽⁴⁷⁾.

Antigamente, os profissionais ocupavam mais tempo de trabalho durante a instrumentação do canal radicular, porém atualmente temos muitos instrumentos que facilitam essa etapa e a tornam mais rápida. Entretanto existem áreas de difícil acesso aos instrumentos como, canais acessórios, istmos, deltas apicais, túbulos dentinários, onde os micro-organismos podem penetrar e não serão removidos por meio mecânicos. ⁽¹⁷⁾

De acordo com estudos de Haapasalo et. al. (1987), as bactérias podem penetrar a uma profundidade maior que 500 µm, relatando ainda que em casos de periodontite apical persistente o *Enterococcus faecalis* pode penetrar de 800-1000 µm nos túbulos dentinários ⁽¹⁴⁾.

Frente a isso, há a necessidade de se complementar com a irrigação do canal radicular, pois é através do líquido irrigador que o canal e suas ramificações poderão ser descontaminados satisfatoriamente para a reparação dos tecidos periapicais ⁽¹⁶⁾.

Assim, a solução irrigadora possui diferentes funções como: manter o canal lubrificado, reduzir os detritos decorrentes da instrumentação do canal, além de apresentar ação antimicrobiana, dissolução de tecidos orgânicos, e ausência de efeitos citotóxicos para os tecidos periapicais ⁽²⁸⁾.

Atualmente há uma grande variedade de soluções irrigadoras, porém a mais antiga, sendo usada desde 1920 até os dias atuais, é o hipoclorito de sódio (NaOCl), pois apresenta uma excelente ação antimicrobiana e dissolução de tecidos orgânicos ⁽²¹⁾. Entretanto, apesar do NaOCl conter alta atividade antimicrobiana, é bastante citotóxico e possui instabilidade, afetando outras propriedades que dependem de tempo de exposição, pH, temperatura e interação com os compostos orgânicos e inorgânicos do interior do canal radicular *in vivo* ^(3,8,44).

A ação solvente do hipoclorito de sódio ocorre através de três reações químicas, onde a primeira de fato é a responsável pela dissolução de tecido orgânico, pois o hipoclorito de sódio age como solvente, degradando os ácidos graxos, transformando-os em sais de ácidos graxos (sabão) e glicerol (álcool). A segunda reação, ocorre pela neutralização dos aminoácidos, formando água e sal, e a terceira, o cloro e os grupos amino formam cloraminas, interferindo no metabolismo das bactérias. ^(11, 12, 13)

Outro irrigante também utilizado na endodontia é a clorexidina (CLX). A clorexidina foi o primeiro antisséptico usado para limpezas de pele que apresentava alto nível de ação antimicrobiana e baixa toxicidade. A CLX foi introduzida na odontologia na década de 1970, para controle de placa bacteriana, sendo muito usada na periodontite por seus efeitos positivos na gengivite. Na endodontia, é principalmente utilizada nos casos de ápice aberto, alargamento do forame, perfuração e reabsorção radicular, pois apresenta menor citotoxicidade com os tecidos periapicais, não induzindo dor, além de ser uma alternativa para pacientes alérgicos ao NaOCl ⁽²⁰⁾.

Estudos mostram que a clorexidina 2% não apresenta ação solvente sobre a matriz do biofilme, mostrando que a clorexidina pode não ser muito efetiva em áreas que os instrumentos endodônticos não conseguem tocar. Entretanto apresenta ação antimicrobiana, efeito de substantividade, baixa toxicidade, ^(11,12,13) além de possuir ação antibacteriana sobre *Enterococcus faecalis*, considerada uma das espécies mais resistentes no canal radicular e responsável inúmeras vezes pela falha do tratamento endodôntico ⁽²⁸⁾.

Durante a etapa de instrumentação do canal radicular, há formação de debris dentinários. Esses detritos de tecido duro podem influenciar no resultado final do

tratamento endodôntico, pois podem interferir na ação da solução irrigadora sobre biofilmes. Isso porque, a dentina da parede do canal radicular, é composta principalmente de hidroxiapatita, que possui um forte efeito tampão sobre ácidos e bases.⁽³⁰⁾ A literatura demonstra que a dentina pode inibir o efeito antimicrobiano da solução de NaOCl a 1% e acetato de clorexidina frente ao *Enterococcus faecalis*.⁽²²⁾

Desse modo, o efeito da dentina na ação antimicrobiana das soluções irrigadoras tem sido estudado. Novos métodos surgiram para se utilizar a dentina radicular de dentes humanos extraídos, como transformá-los em pó de dentina, em um tamanho que seja possível a mistura do pó com as soluções irrigadoras testadas, e que apresente facilidade para o seu depósito no interior do canal radicular⁽²¹⁾.

Outro fator que também pode influenciar na ação da solução irrigadora, é o ambiente químico do canal, pois o mesmo apresenta componentes orgânicos e inorgânicos, que podem influenciar a ação do hipoclorito de sódio à 1%, por exemplo⁽⁴⁶⁾. Alguns estudos demonstraram que a albumina que é a principal proteína do sangue, pode estar presente no canal radicular, por meio de sangue, exsudato inflamatório, e também pode estar presente no fluido dos túbulos dentinários, podendo diminuir assim, a ação antimicrobiana das soluções irrigadoras.^(22, 30)

De acordo com Baker^(17,30) em 1947, a albumina presente no ovo e o NaOCl juntos, resulta em uma reação de degradação da proteína, reduzindo a ação do NaOCl. Outros estudos mostraram que a albumina também pode reduzir a inativação da alfa 1-antiproteínase pelo ácido hipocloroso, que é o responsável pela principal ação antimicrobiana do NaOCl⁽³⁰⁾.

De acordo com Portenier et. Al. (2006), a albumina presente em soro bovino também reduz a ação antimicrobiana da clorexidina, hidróxido de cálcio e iodo,⁽²²⁾ podendo ser comparada com a albumina presente no interior do canal, decorrente da vascularização da polpa e sua posterior necrose.

Dessa forma, para obter a análise utilizamos corantes fluorescentes como Live&Dead, que marca os micro-organismos viáveis com coloração verde e os mortos com coloração vermelha. Entretanto, há no mercado atual outros corantes fluorescentes, que marcam a matriz desses micro-organismos, pois não basta saber se as soluções irrigadoras usadas na endodontia são capazes apenas de matar as bactérias, mas também, se são capazes de remover suas matrizes orgânicas.

Atualmente, estão sendo realizados estudos com o corante Calcofluor, esse corante tende a marcar a matriz de bactérias e fungos, porém ainda não se tem resultados na literatura utilizando esse corante na odontologia. Contudo, é rotineiramente usado em pesquisas para demonstração de fungos, como seu uso na micologia clínica.

O calcofluor é um corante que se liga aos polissacarídeos beta 1-3 e beta 1-4, que podem ser encontrados em celulose e quitina ⁽⁴³⁾. O método de análise com o calcofluor vem sendo muito utilizado na oftalmologia, in vivo para diagnóstico de ceratite microsporídica. ⁽²⁶⁾ Entretanto, para detecção de bactérias ainda é um método recente e necessita de mais estudos.

Não há ainda estudo na literatura que tenha explorado o efeito do pó de dentina e proteínas sanguíneas, combinadas com as soluções irrigadoras, contra o *Enterococcus faecalis* em contaminações intratubulares e utilizando os dois corantes fluorescentes para suas análises. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a possível influência do pó de dentina e albumina sérica (soro fetal bovino) na atividade antimicrobiana das soluções irrigadoras, na contaminação intratubular de *Enterococcus faecalis*.

2 ARTIGO

2 ARTIGO

O artigo que compõe esta dissertação foi redigido conforme as normas de publicação da *Revista Journal of Endodontics*.

2.1 Artigo 1

Título: Influência do soro bovino e do pó de dentina na efetividade antimicrobiana intratubular de soluções de hipoclorito de sódio e clorexidina

Influência do soro bovino e do pó de dentina na efetividade antimicrobiana intratubular de soluções de hipoclorito de sódio e clorexidina

Durante o preparo biomecânico dos canais radiculares, soluções irrigadoras entram em contato com substâncias orgânicas e inorgânicas, dentinárias e da necrose pulpar, que podem prejudicar a efetividade antimicrobiana destas soluções. O objetivo deste estudo é averiguar se há uma diminuição da ação antimicrobiana das soluções irrigadoras utilizadas, na presença de debris dentinários e soro fetal bovino com albumina sérica. Foram utilizados pré-molares inferiores, com contaminação intratubular padronizada com *Enterococcus faecalis*, sendo divididos em seis grupos quanto aos irrigantes (n=10): GI) Hipoclorito de sódio (NaOCl), GII) NaOCl + pó de dentina, GIII) NaOCl + soro bovino, GIV) Clorexidina, GV) Clorexidina + pó de dentina, GVI) Clorexidina + soro bovino. Os dentes foram analisados em microscopia confocal de varredura a laser (MCVL), corados com LIVE / DEAD®, para evidenciação de bactérias vivas e mortas e ainda a coloração com Calcofluor branco M2R, para detecção de matriz de substâncias extrapoliméricas (EPS). Os resultados foram tabulados e analisados estatisticamente ($p < 0,05$), mostrando que o pó de dentina e o soro fetal bovino foram capazes de diminuir a ação antimicrobiana das soluções irrigadoras, porém o pó de dentina teve efeito maior. Já na eliminação da matriz do biofilme, o soro bovino diminuiu mais a ação das soluções. Dessa forma, conclui-se que o pó de dentina diminui a ação antimicrobiana das soluções, e que o soro fetal bovino diminui a eliminação da matriz das bactérias, mostrando a grande interferência destes compostos orgânicos na ação dos irrigantes.

Palavras chave: Biofilme; Endodontia; hipoclorito de sódio; clorexidina, albumina sérica bovina;

INTRODUÇÃO

O sucesso do tratamento endodôntico é dependente de várias etapas, porém o principal para se obter o reparo dos tecidos periapicais é a desinfecção do canal radicular. A instrumentação e a irrigação do canal radicular, são as principais etapas para a eliminação dos micro-organismos. Entretanto, de acordo com a literatura, não há micro-organismos apenas na luz do canal, onde conseguimos acessar com facilidade, mas também nas áreas de complexidade anatômicas, como: istmos, canais acessórios, deltas apicais e túbulos dentinários.

Há micro-organismos que permanecem nos túbulos dentinários após o preparo biomecânico, como o *Enterococcus faecalis*. Essas bactérias podem se reproduzir no interior desses túbulos se houver falha no selamento da cavidade ou acesso a nutriente proveniente do periodonto, e posteriormente causar a falha no tratamento endodôntico ⁽¹⁾. Durante o tratamento endodôntico a irrigação com soluções como hipoclorito de sódio (NaOCl) que é a solução mais antiga e a mais usada até os dias atuais pode ter sua ação antimicrobiana alterada quando há presença de compostos orgânicos e inorgânicos, compostos esses que são encontrados no canal radicular de polpas necrosadas. Entretanto a Clorexidina (CLX) também é muito utilizada na endodontia como irrigante, e também pode apresentar alteração na sua ação antimicrobiana. ^(21, 2009, 19, 20)

Embora essas soluções irrigadoras usadas na endodontia apresentem alta atividade antibacteriana, as suas propriedades podem ser alteradas in vivo ^(2,3). O canal radicular é revestido por dentina e, Haapasalo et al. (2000) ⁽⁴⁾ mostraram que a dentina inibe a ação antimicrobiana destas soluções frente ao *Enterococcus faecalis*. Outros estudos ^(1,2,16,17,21) indicam que componentes orgânicos da polpa como a albumina sérica, que é uma proteína do sangue, também podem reduzir a ação antimicrobiana dessas soluções.

Tong, Zangh & Wey (2019) avaliaram a influência do pó de dentina e do soro humano quanto a atividade antibacteriana e antibiofilme do hipoclorito de sódio a 1% sobre biofilmes de *Enterococcus faecalis*. Encontraram que ambas substâncias, orgânica e inorgânica, diminuíram a efetividade do NaOCl, especialmente o soro humano.

Frente a isso, o objetivo desse estudo foi avaliar a ação antimicrobiana do NaOCl e da clorexidina na presença de pó de dentina e albumina sérica bovina em dentes não somente com biofilmes, mas especialmente com contaminação intratubular de *Enterococcus faecalis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção dos dentes e preparo da amostra

A amostra foi composta por pré-molares inferiores cedidos por cirurgiões-dentistas, analisados por radiografia periapical, verificando sua anatomia interna, com o intuito de selecionar apenas dentes com canais únicos. Os dentes passaram por desinfecção inicial com hipoclorito de sódio a 2,5% durante 24 horas. Foram removidos os 2 milímetros apicais e a coroa, padronizando-se os espécimes em 15 milímetros de comprimento total.

Os canais de 66 dentes selecionados foram preparados para remoção de tecido pulpar e ampliação do canal para a contaminação e subsequente teste com as substâncias irrigadoras. Foi realizada exploração do canal com lima K15 (Dentsply Maillefer, Ballaiges, Suíça), e preparo com a lima #25.05 (X1 Blue, MK Life, Porto Alegre, Brasil) em todos os dentes. Os mesmos receberam três banhos em cuba ultrassônica (Odontobras, Ribeirão Preto, SP, Brasil) de 10 minutos cada, com hipoclorito de sódio a 2,5%, EDTA a 17% e água destilada para neutralizar os dois primeiros.

Protocolo de contaminação

Os dentes ficaram imersos em 1 mL de água destilada no interior de microtubos (Axigen® São Paulo, São Paulo, Brasil) e foram esterilizados. Após a esterilização a água dos microtubos foi substituída, por 1 mL de caldo BHI esterilizado e agitados em cuba ultrassônica durante 15 minutos.

Os dentes foram contaminados com a cepa bacteriana *Enterococcus faecalis* catalogada com número de registro da American Type Culture Collection (ATCC)

29212). Todos os procedimentos de contaminação foram realizados no interior de uma câmara de fluxo laminar (Esco, Arstream, classe II A2, Jacarei, São Paulo), com confirmação da pureza da cepa através de coloração de Gram.

Por um período de quatro dias, houveram trocas diárias de forma asséptica, de inóculo contaminado e meio de cultura limpo alternadamente, além de dez ciclos de centrifugação com diferentes velocidades, de acordo com o protocolo de Andrade et al. (2015).

Preparação do Pó de dentina e soro fetal bovino nos espécimes

O pó de dentina foi preparado com o auxílio de uma ponta diamantada, ponta de lápis 2200 (Option – Poul Sorensen, Bragança Paulista, São Paulo, Brasil) realizando-se o desgaste da dentina do canal radicular de dentes humanos extraídos. Esse pó obtido foi filtrado, em filtro de papel 0.7 mm de diâmetro (Double ring quantitative filter paper - Darmsadt, Alemanha) e, após seco, o mesmo foi depositado em um microtubo com água destilada e esterilizados a 121°C por 15 minutos. O pó de dentina foi misturado no momento do experimento, na proporção de 100 mg de pó para 1mL de água destilada esterilizada (Tong, Shang, Wei, 2019).

Tanto o pó de dentina (PD) diluído como o SB, nos determinados grupos, foram colocados junto com cada dente já contaminado no interior de um microtubo e levados para a cuba ultrassônica por 15 minutos. Com este procedimento, foi possível viabilizar a penetração de PD e SB na profundidade dos túbulos dentinários de cada espécime.

Após isso, com os dentes contaminados e repletos das substâncias inibidoras, realizou-se o tratamento antimicrobiano por meio da irrigação com as soluções em teste.

Tratamento e avaliação dos espécimes

Os dentes foram divididos em 6 grupos (n=10) e um grupo controle (n= 6).

Os irrigantes testados foram:

Grupo I: Hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5%;

Grupo II: NaOCl 2,5% + Soro fetal bovino (SB) (Gibco, Evansville, EUA)

Grupo III: NaOCl 2,5% + Pó de dentina (PD)

Grupo IV: Clorexidina 2%

Grupo V: Clorexidina 2% + Soro fetal bovino

Grupo VI: Clorexidina 2% + Pó de dentina

As soluções irrigadoras foram obtidas em loja comercial de produtos odontológicos, já com as concentrações determinadas: Clorexidina 2 % (Maquira - Maringá, Paraná, Brasil) e hipoclorito de sódio 2,5% (Rioquímica – São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil).

Os espécimes foram irrigados com a solução determinada para cada grupo. Foram utilizados 10 mL para a irrigação de cada dente com seringa de irrigação Ultradent 5 mL (Ultradent – Salt Lake City, Utah, EUA) e agulha Endo-Eze tips (Ultradent – Salt Lake City, Utah, EUA) em movimento de entrada e saída de forma convencional.

Após a sua irrigação, os espécimes foram seccionados longitudinalmente com disco diamantado (Erios, São Paulo, Brasil) em máquina de corte (IsoMet™ 1000, Precision Sectioning Saw, Buehler, Illinois, EUA) sob resfriamento. Utilizou-se EDTA 17% para remoção do smear layer oriundo do corte longitudinal por três minutos de acordo com o protocolo estabelecido (Andrade et al, 2015; Arias et al., 2016; Pereira et al. 2019).

Em seguida, os espécimes foram corados com 10µL da mistura do kit Live&Dead, que contém os corantes iodeto de propídeo (vermelho) e Syto9 (verde) por 15 minutos, para evidênciação das bactérias mortas e viáveis, respectivamente.

O corante calcofluor (Sigma – Aldrich – F3453 – San Luis, Missouri, EUA) foi colocado após o Live&Dead, por mais 15 minutos, para evidênciação da matriz polissacarídica (EPS) bacteriana.

Após a coloração, os espécimes foram observados através do programa Leica TCS-SPE CLSM (Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Alemanha), pelo qual as imagens foram adquiridas, sendo obtidas 8 imagens por dente, do terço médio e cervical, totalizando 80 imagens por grupo de estudo. A quantificação dos micro-

organismos viáveis, mortos e da matriz em porcentagem foi realizada no programa ImageJ (Scion corporation – Fraderick, Maryland, EUA).

RESULTADOS

Neste estudo, foi analisada a ação antimicrobiana do NaOCl 2,5% e da clorexidina a 2%, em dentes com contaminação intratubular. Na tabela 1 pode-se observar a viabilidade das bactérias após o uso dos irrigantes e as substâncias adicionais (soro bovino na presença de albumina e pó de dentina). Ao utilizar o irrigante puro, observamos que o NaOCl foi o que apresentou mais bactérias mortas, restando 15% de bactérias viáveis (Figura 1). Quando acrescentamos o pó de dentina no NaOCl a viabilidade foi para 22%, ao associar o soro bovino 18%.

Já a clorexidina apresentou porcentagens maiores na viabilidade, quando pura 27% de bactérias viáveis, associada com pó de dentina 31% e na presença de soro bovino, 32% (Figura 1).

A análise estatística, quando realizada em todas as áreas dos espécimes conjuntamente, mostrou diferenças entre os grupos de clorexidina com adição de soro bovino e o grupo de NaOCl ($p= 0.0012$), clorexidina com adição de soro bovino e NaOCl com soro bovino ($p= 0.0079$), clorexidina com pó de dentina e NaOCl ($p= 0.0075$) e clorexidina com pó de dentina e NaOCl com soro bovino ($p= 0.0417$).

Ao avaliar a região cervical, todos os grupos reduziram a quantidade de células bacterianas viáveis, porém o grupo de clorexidina com soro bovino e de NaOCl com soro bovino ($p= 0.0246$) apresentaram diferença estatística entre si (Tabela 2).

No terço apical, houve diferença estatística entre a clorexidina com soro bovino e o grupo de NaOCl ($p= 0.0067$) e entre os grupos de clorexidina com pó de dentina e o grupo de NaOCl ($p= 0.0227$) (Tabela 3).

Tabela 1- Mediana, mínimo e máximo da viabilidade do *Enterococcus faecalis* após o uso das soluções, analisadas através da microscopia confocal de varredura a laser.

Grupos	Mediana	Mínimo-máximo	≠ Estatística*
Hipoclorito de sódio	15.29	(4.15 – 29.85)	C
Hipoclorito de sódio + soro bovino	18.09	(14.41 – 29.05)	B, C
Hipoclorito de sódio + pó de dentina	22.99	(13.14 – 44)	A, C
Clorexidina	27.05	(5.854 – 31.56)	A, B, C
Clorexidina + soro bovino	31.73	(28.3 – 46.52)	A
Clorexidina + pó de dentina	31.44	(19.63 – 37.85)	A, B

* Letras diferentes determinam diferença significativa entre os grupos, pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn.

Tabela 2- Mediana, mínimo e máximo da viabilidade do *Enterococcus faecalis* após o uso das soluções no terço cervical, analisadas através da microscopia confocal de varredura a laser.

Grupos	Mediana	Mínimo-máximo	≠ Estatística*
Hipoclorito de sódio	24.04	(4.276 – 37.43)	A, B
Hipoclorito de sódio + soro bovino	23.39	(9.157 – 28.15)	B
Hipoclorito de sódio + pó de dentina	31.37	(4.88 – 42.1)	A, B
Clorexidina	28.41	(7.391 – 35.59)	A, B
Clorexidina + soro bovino	33.28	(16.78 – 48.32)	A
Clorexidina + pó de dentina	31.7	(14.17 – 40.72)	A, B

* Letras diferentes determinam diferença significativa entre os grupos, pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn.

Avaliamos também a matriz do biofilme de *Enterococcus faecalis*, após o uso dos irrigantes e seus adicionais. O irrigante que mais eliminou matriz do biofilme foi o NaOCl, restando 12% de matriz. Quando adicionado o pó de dentina ao NaOCl, permaneceram 23% e adicionado soro bovino, 31% de matriz. Na presença de clorexidina pura permaneceram 27%, com adição de pó de dentina 31% e, com soro bovino, 32% de matriz extrapolimérica. Após a análise estatística, observou-se diferença entre o grupo de clorexidina com soro bovino e o grupo de NaOCl ($p=0.0121$) (tabela 4).

Tabela 3- Mediana, mínimo e máximo da viabilidade do *Enterococcus faecalis* após o uso das soluções no terço apical, analisadas através da microscopia confocal de varredura a laser.

Grupos	Mediana	Mínimo-máximo	Significância*
Hipoclorito de sódio	9.934	(0.1693 – 42.07)	B
Hipoclorito de sódio + soro bovino	15.89	(5.544 – 48.95)	A, B
Hipoclorito de sódio + pó de dentina	19.3	(2.877 – 51.33)	A, B
Clorexidina	23.59	(4.316 – 41.07)	A, B
Clorexidina + soro bovino	32	(26.02- 45.12)	A
Clorexidina + pó de dentina	32.31	(24.18 – 37.8)	A

* Letras diferentes determinam diferença significativa entre os grupos, pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn.

Tabela 4- Mediana, mínimo e máximo da matriz do biofilme de *Enterococcus faecalis* após o uso das soluções, analisadas através da microscopia confocal de varredura a laser.

Grupos	Mediana	Mínimo-máximo	≠ Estatística*
Hipoclorito de sódio	12.49	(3.084 – 45.71)	B
Hipoclorito de sódio + soro bovino	31.37	(10.66 - 44)	A, B
Hipoclorito de sódio + pó de dentina	22.99	(13.14 – 44)	A, B
Clorexidina	27.05	(5.854 – 37.56)	A, B
Clorexidina + soro bovino	31.73	(28.3 – 46.52)	A
Clorexidina + pó de dentina	31.44	(28.3 – 46.52)	A, B

* Letras diferentes determinam diferença significativa entre os grupos, pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn.

No terço cervical todos os grupos apresentaram uma redução na matriz, entretanto o NaOCl foi o que apresentou maior poder de dissolução (Tabela 5). A análise estatística demonstrou que o grupo de clorexidina com pó de dentina e o grupo de NaOCl apresentou diferença estatística ($p = 0.0100$).

Na região apical houve diferenças estatísticas entre os grupos de clorexidina e NaOCl ($p = 0.0051$), grupo clorexidina com soro bovino e NaOCl ($p = 0.0003$), grupo clorexidina com pó de dentina e NaOCl ($p = 0.0028$), grupo NaOCl com NaOCl com pó de dentina ($p = 0.0459$) e o grupo NaOCl e NaOCl com soro bovino ($p = 0.0090$) (Tabela 6).

Tabela 5- Mediana, mínimo e máximo da matriz do biofilme de *Enterococcus faecalis* após o uso das soluções no terço cervical, analisadas através da microscopia confocal de varredura a laser.

Grupos	Mediana	Mínimo-máximo	≠ Estatística*
Hipoclorito de sódio	21.49	(4.271 – 31.36)	B
Hipoclorito de sódio + soro bovino	31.36	(13.26 – 43.89)	A, B
Hipoclorito de sódio + pó de dentina	27.37	(12.09 – 35.86)	A, B
Clorexidina	31.26	(10.75 – 37.81)	A, B
Clorexidina + soro bovino	32.03	(20.45 – 44.67)	A, B
Clorexidina + pó de dentina	34.47	(31.16 – 41.04)	A

* Letras diferentes determinam diferença significativa entre os grupos, pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn.

Tabela 6- Mediana, mínimo e máximo da matriz do biofilme de *Enterococcus faecalis* após o uso das soluções no terço apical, analisadas através da microscopia confocal de varredura a laser.

Grupos	Mediana	Mínimo-máximo	≠ Estatística*
Hipoclorito de sódio	12.03	(0 – 46.95)	B
Hipoclorito de sódio + soro bovino	30.65	(8.066 – 44.1)	A
Hipoclorito de sódio + pó de dentina	25.3	(7.766 – 44.39)	A
Clorexidina	30.98	(23.47 – 38.11)	A
Clorexidina + soro bovino	35.53	(23.18 – 42.69)	A
Clorexidina + pó de dentina	32.13	(24.54 – 35.87)	A

* Letras diferentes determinam diferença significativa entre os grupos, pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn.

Os testes de normalidade D' agostino e Shapiro – Wilk, demonstraram que em todas as amostras a distribuição dos valores foram não paramétricos, portanto, foram utilizados testes não paramétricos como Kruskal – Wallis seguido de Dunn ($p < 0.05$).

Após as análises, podemos observar que as soluções irrigadoras afetaram mais a viabilidade do *Enterococcus faecalis*, quando comparado com a eliminação da matriz do biofilme.

Figura 1: Imagens de dentina infectada obtida por microscopia confocal de varredura a laser após a irrigação convencional. **A:** Hipoclorito de sódio, **B:** Hipoclorito de sódio com adição de soro fetal bovino com albumina sérica, **C:** Hipoclorito de sódico com adição do pó de dentina, **D:** Clorexidina, **E:** Clorexidina com adição de soro fetal bovino com albumina sérica, **F:** clorexidina com adição do pó de dentina.

DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o efeito de soluções irrigadoras hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5% e a clorexidina 2%. As soluções foram testadas na presença e na ausência de debris (pó) de dentina e soro fetal bovino com albumina sérica (SB), para descontaminação de pré-molares inferiores, com contaminação intratubular de *Enterococcus faecalis*.

O método utilizado para a contaminação intratubular foi de Andrade et al. ⁽⁵⁾, eficaz em outros estudos ^(6,7,8), escolhido a fim de simular uma situação endodôntica clínica, onde encontramos contaminação em profundidade nos túbulos dentinários. Esta contaminação foi realizada com *Enterococcus faecalis*, que é uma bactéria comumente encontrada no canal radicular, principalmente em casos de fracasso do tratamento endodôntico ^(9,10,11). Possui capacidade de penetração nos túbulos dentinários em profundidade podendo permanecer viáveis por longos períodos ausentes de nutrientes, ^(12,13,14) além de possuir resistência a determinadas substâncias antimicrobianas e não ser totalmente eliminado dos canais radiculares ⁽¹⁵⁾.

A solução irrigadora mais antiga é o NaOCl que é a mais usada até os dias atuais. Estudos anteriores mostram que o NaOCl apresenta ação antimicrobiana eficaz contra o *Enterococcus faecalis* ^(16,18,19,20). Neste estudo, o grupo onde o NaOCl apresenta-se puro, obteve melhor resultado na não-viabilidade das bactérias, ou seja, apresentou um maior número de bactérias mortas.

A literatura nos mostra, a ação antimicrobiana do NaOCl quando há adição de SB, uma alteração nesse efeito ^(2,16,19,21,22). Alguns estudos apresentam que quanto menor o pH do NaOCl maior é a sua ação antimicrobiana ^(1,23). Pelos resultados obtidos, o NaOCl com SB apresentou sua ação antimicrobiana diminuída, porém próxima ao NaOCl puro. Acredita-se que o SB dificulte a ação do NaOCl, porém alguma substância do soro bovino ainda não identificada, possa ter diminuído o pH do NaOCl, o que também seria favorável à sua ação antimicrobiana. Já foi comprovado que o SB pode apresentar um efeito inibitório na morte do *Enterococcus faecalis* por NaOCl, porém essa inibição é dependente da concentração do NaOCl e SB ⁽¹⁶⁾, contudo, concentrações do SB não foram testadas no presente estudo.

Essas soluções irrigadoras são muito importantes durante o tratamento endodôntico, pois atuam também no preparo biomecânico, não apenas como ação lubrificante, mas também na remoção de detritos do canal radicular ⁽²⁵⁾. Quando essas soluções entram em contato com os detritos dentinários a ação antimicrobiana das mesmas, pode ser alterada. Pois, ocorre pela quantidade de cloro disponível no meio ^(2,33), quando essa solução entra em contato com o pó de dentina há a redução do cloro livre no canal ⁽²⁾, comprovando os resultados apresentados nesse estudo, onde na presença de pó de dentina o NaOCl, apresentou maior quantidade de bactérias viáveis, ou seja, menor ação antimicrobiana quando comparado com o NaOCl puro.

Outra solução que também é muito utilizada na endodontia é a clorexidina a 2%, que é um agente antimicrobiano de amplo espectro com ação comparável ao NaOCl ^(27, 28). Em um estudo de Haapasalo et al. (2007) foi demonstrado que a clorexidina pura, eliminou mais de 99% de *Enterococcus faecalis* em 1 hora, porém quando adicionado o pó de dentina a ação antimicrobiana diminui consideravelmente ⁽²⁹⁾. O mesmo ocorreu no presente estudo, pois a clorexidina pura, apresentou 27% de bactérias viáveis, e quando na presença do pó de dentina apresentou 31% (diferença não estatisticamente significativa).

Estudos nos mostram, que o pó de dentina não inibe a ação antimicrobiana da clorexidina, entretanto, retarda o seu efeito. ⁽¹⁹⁾ Quando na presença de SB a clorexidina apresentou resultados semelhantes com quando foi adicionado o pó de dentina, porém sem diferenças estatísticas. De acordo com a literatura, o SB, isto é, a albumina sérica quando associada à clorexidina diminui o seu efeito antimicrobiano ⁽³⁰⁾.

Pelos resultados obtidos, quando comparamos a ação antimicrobiana das soluções irrigadoras em terços, a ação é maior no terço cervical, isso porque apresenta maior quantidade e maior diâmetro dos túbulos dentinários em relação ao terço apical ⁽¹⁹⁾.

A pesquisa publicada por Tong, Shang, Wei (2019) ⁽¹⁷⁾ mostrou da mesma forma que este estudo, a influência destas substâncias orgânicas e inorgânicas sobre a ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio. No entanto, o soro promoveu maior inibição do que o pó de dentina, contrariamente ao aqui verificado. Pode-se justificar que esta maior inibição do NaOCl pelo soro, se deve ao fato de que foi utilizado o soro humano, concentração diferente do NaOCl (1%) e também a avaliação metodológica

em si foi bastante diferente, uma vez que, os autores citados fizeram seu teste sobre biofilmes de 7 dias e no presente trabalho, foi testada a descontaminação intratubular em dentes humanos extraídos.

Quando analisamos a quantidade de bactérias mortas, não significa que a solução irrigadora removeu a matriz do biofilme e, na literatura os estudos são escassos em relação a essa análise. Atualmente, há alguns estudos na medicina e agropecuária, com diagnóstico laboratorial, para marcação de fungos e algumas bactérias, através do corante Calcofluor, que permite avaliar a presença da matriz da bactéria (16,31,32,33,34).

O NaOCl apresenta ação de dissolução de tecidos ⁽⁶⁾ e, pelos resultados obtidos o NaOCl apresentou menos quantidade de matriz de biofilme do *Enterococcus faecalis*, porém, ao associá-lo com o pó de dentina e o SB sua ação de dissolução é prejudicada. O NaOCl com SB na morte bacteriana se mostrou melhor, que na presença do pó de dentina, entretanto, quando avaliamos a matriz o resultado foi o inverso, ou seja, o SB não inibiu por completo a ação antimicrobiana do NaOCl, porém diminuiu consideravelmente sua ação de dissolução. Estudos comprovam que o SB não apresenta efeito antimicrobiano contra o *Enterococcus faecalis* ⁽¹⁶⁾.

Trabalhos na literatura afirmam que a clorexidina não apresenta ação de dissolução de tecidos ⁽³⁶⁾. Nos resultados obtidos a clorexidina pura apresentou maior quantidade de matriz quando comparada ao NaOCl, e que quando associada com o pó de dentina e o SB, apresentou quantidades ainda maiores.

Baseados nos resultados obtidos, pode-se observar que a adição do pó de dentina e o SB afetam mais a viabilidade das bactérias do que a dissolução de suas matrizes. A clorexidina quando pura apresentou resultados inferiores ao NaOCl associado com o SB, mostrando que mesmo na presença de exsudato inflamatório no canal radicular este irrigante apresentará melhores resultados.

O SB pode ser um inibidor mais forte que o pó de dentina na ação antimicrobiana da clorexidina e o contrário foi visualizado sobre o NaOCl. O fato é que ambos inibem a ação antimicrobiana e clinicamente isto poderia ser compensado com uma maior quantidade ou volume dos irrigantes. O mesmo pode ser considerado em relação a presença de matriz, pois o NaOCl que possui excelente capacidade de dissolução,

quando adicionado ao SB torna-se bastante ineficaz. Assim, são necessários mais estudos, envolvendo diferentes volumes e concentrações das substâncias testadas e principalmente, em relação à dissolução das matrizes de biofilmes.

REFERÊNCIAS

1. Zehnder M, Kosicki D, Luder H, et al. Tissue-dissolving capacity and antibacterial effect of buffered and unfbuffered hypochlorite solutions. *Oral Surg Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 94:756-62
 2. Arias-Moliz MT, Morago A, Ordinola-Zapata R, et al. Effects of dentin debris on the antimicrobial properties of sodium hypochlorite and etidronic acid. *J Endod.* 2016; 42:771-5
 3. Van der Sluis LW, Vogels MP, Verhaagen B, et al. Study on the influence of refreshment/activation cycles and irrigants on mechanical cleaning efficiency during ultrasonic activation of the irrigant. *J Endod.* 2010; 36:737-40
 4. Haapasalo H, Sirén E, Waltimo T, et al. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: in vitro study. *Int Endod J.* 2000; 33:126-31
 5. Andrade FB, Arias MPC, Maliza AGA, et al. A new improved protocol for *in vitro* intratubular dentinal bacterial contamination for antimicrobial endodontic tests: standardization and validation by confocal laser scanning microscopy. *J Appl Oral Sci.* 2015; 23:591-8
 6. Giardino L, Del Fabbro M, Cesário F, et al. Antimicrobial effectiveness of combinations of oxidant and chelating agentes in infected dentine: na *ex vivo* confocal laser scanning microscopy study. *Int Endod J.* 2018; 51:448-456
 7. Pereira TC, Vasconcelos LRSM, Graeff MSZ, et al. Intratubular disinfection with tri-antibiotic and calcium hydroxide pastes. *Acta Odontol. Scand.* 2016; 75:87-93
 8. Pereira TC, Vasconcelos LRSM, Graeff MSZ, et al. Intratubular decontamination ability and physicochemical properties of calcium hydroxide pastes. *Clin Oral Investig.* 2019; 23: 1253-1262
 9. Peculiene V, Reynaud AH, Balciuniene I, et al. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J.* 2001; 34:429-34
 10. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, et al. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 2003; 36:1-11
 11. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, et al. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.* 2006; 32:93-8
-

12. Siqueira JF Jr, De Uzeda M, Fonseca ME. A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. J Endod. 1996; 22:308-10
 13. Love RM. *Enterococcus faecalis*: a mechanism for its role in endodontic failure. Int Endod J. 2001; 34:399-405
 14. Chivatxaranukul P, Dashper SG, Messer HH. Dentinal tubule invasion and adherence by *Enterococcus faecalis*. Int Endod J. 2008; 41: 873-82
 15. Guerreiro-Tanomaru JM, Morgental RD, Flumignan DL, et al. Evaluation of pH, available chlorine content, and antibacterial activity of endodontic irrigants and their combinations against *Enterococcus faecalis*. Oral Surg Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011; 112:132-5
 16. Pappen FG, Qian W, Aleksejuniene J, et al. Inhibition of sodium hypochlorite antimicrobial activity in the presence of bovine serum albumin. J Endod. 2010; 36: 268-71
 17. Tong Z, Zhang Y, Wei X. The effect of human serum and dentin powder alone or in combination on the antibacterial activity of sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis*. Arch Oral Biol. 2019; 97:72-76
 18. Macedo RG, Herrero NP, Wesselink P. Influence of the dentinal wall on the pH of sodium hypochlorite during root canal irrigation. J Endod. 2014; 40:1005-08
 19. Quintana RM, Jardine AP, Montagner F. Effect of human, dentin, albumin and lipopolysaccharide on the antibacterial activity of endodontic irrigants. J Conserv Dent. 2017; 20:341-345
 20. Sassone LM, Fidel R, Fidel M, et al. The influence of organic load on the antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine *in vitro*. Int Endod J. 2003; 36:848-852
 21. Khedmat S, Aligholi M, Sadeghi S. Influence of bovine serum albumin on the antibacterial activity of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis*. IEJ. 2009; 4:139-143
 22. Peters LB, Wesselink PR, Buijs JF, et al. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. J Endod. 2001; 27:76-80
 23. Cesário F. [Dissertação de Mestrado]. Desinfecção intratubular dentinária promovida por soluções irrigadoras com variação de pH e agitação ultrassônica. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo; 2016
 24. Van der Sluis LW, Versluis M, Wu MK, et al. Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. Int Endod J. 2007; 40:415-26
 25. Estrela C, Estrela CRA, Barbin EL, et al. Mechanism of action of sodium hypochlorite. Braz Dent J. 2002; 13:113-117
 26. White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. J Endod. 1998; 23:229-31
-

27. Siqueira JF Jr, Batista MM, Fraga RC, et al. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod.* 1998; 24:414-6
 28. Haapasalo M, Qian W, Portenier I, et al. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. *J Endod.* 2007; 33:917-925
 29. Portenier I, Haapasalo H, Rye A, et al. Inactivation of root canal medicaments by dentine, hydroxylapatite and bovine sérum albumin. *Int Endod.* 2001; 34:184-188
 30. Surya Kirani KRL, Satya Chandrika V. Efficacy of in-house fluorescent stain for fungus. *Indian J Pathol Microbiol.* 2017; 60:57-60
 31. Malhotra C, Jain AK, Kaur S, et al. In vivo confocal microscopic characteristics of microsporidial keratoconjunctivitis in immunocompetent adults. *Br J Ophthalmol.* 2017; 101: 1217-1222
 32. Ram AFJ, Klis FM. Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on calcofluor White and congo red. *Nat Protoc.* 2006; 1:2253-56
 33. Lallo MA, Bondan EF, Xavier JG, et al. Técnicas de coloração para detecção de *Encephalitozoon cuniculi* em cortes histológicos. *Ciencia rural.* 2010; 40:2406-2410
 34. Brasil KW, Pinheiro RL, Pimentel IC. Diagnóstico laboratorial de micoses superficiais e cutâneas: comparação dos métodos do hidróxido de potássio e do calcofluor White. *Na bras Dermatol.* 2003; 78:547-551
 35. Pascon CB. [Monografia Unicamp]. Análise crítica da ação do hipoclorito de sódio e da clorexidina como substâncias química auxiliares em endodôntia: enfoque em obturação de canais laterais. Piracicaba: UNICAMP – São Paulo 2007
-

3 DISCUSSÃO

3 DISCUSSÃO

Para a avaliação das bactérias viáveis foi utilizado o microscópio confocal de varredura a laser que oferece vantagens, como: analisar a viabilidade das bactérias através do uso de corantes específicos e não exigir preparo prévio da peça ⁽²⁹⁾. O *Enterococcus faecalis* foi a bactéria escolhida no presente estudo pois, é uma bactéria frequentemente encontrada em casos de retratamento e lesões primárias, pois apresenta capacidade de penetração nos túbulos dentinários, podendo permanecer viáveis em seu interior, além de possuir resistência a algumas substâncias antimicrobianas. ^(9,24,32,42)

No presente estudo, foi realizada a contaminação intratubular dos espécimes pelo protocolo de Andrade et al. (2015), ⁽²⁾ que tem sido utilizado por muitos estudos. ^(2,15,18) O modelo experimental foi escolhido a fim de simular a situação endodôntica real, onde essa infecção ocorre em profundidade nos túbulos dentinários. O tratamento endodôntico é composto por várias etapas: Abertura coronária, instrumentação/irrigação e obturação. A irrigação atua no preparo biomecânico não só como lubrificante, mas na remoção de detritos e na eliminação das bactérias, pois possuem ação antimicrobiana como o hipoclorito de sódio e a clorexidina ⁽³⁴⁾.

O hipoclorito de sódio é a solução mais antiga e a mais usada na endodontia até os dias atuais, apresentando diversas propriedades como ação solvente de matéria orgânica e excelente ação antimicrobiana, porém possui suas desvantagens, como toxicidade aos tecidos periapicais, quando extravasado além do ápice radicular. Sua ação antimicrobiana consiste na quantidade de cloro livre, chamado de cloro ativo. Em 1982 Moorer & Wesselink realizaram um estudo *in vitro*, que demonstrou o contato do NaOCl com amostras de tecidos necróticos, comprovando que a solução é mais efetiva nos primeiros momentos, quando há grande disponibilidade de cloro livre ⁽³¹⁾.

No presente estudo o hipoclorito de sódio 2,5%, apresentou o melhor resultado sobre *Enterococcus faecalis*, ou seja, foi a solução que apresentou a maior porcentagem de bactérias mortas, quando comparado com os outros grupos. Entretanto de acordo com a literatura, quando essa solução entra em contato com

substâncias orgânicas e inorgânicas no interior do canal infectado, pode ocorrer alteração na sua ação antimicrobiana. (3,21,22,28,30)

O tecido pulpar apresenta um fluido tecidual, que contém albumina (3,4,22,30). A literatura apresenta estudos em que na presença da albumina sérica a ação do NaOCl é reduzida (3,22,20). O soro fetal bovino, foi testado quanto ao seu possível efeito inibidor na ação antimicrobiana das soluções irrigadoras. Nos resultados obtidos ao acrescentar o soro fetal bovino com albumina sérica ao NaOCl, obtivemos resultados inferiores na viabilidade das bactérias, porém os resultados foram próximos ao do NaOCl puro. Segundo Pappen et al. (2010) (30) essa diminuição na ação antimicrobiana é dependente da concentração da albumina no meio em questão, em que estas proteínas vão consumir o cloro livre. Outro fator, seria o pH do NaOCl, pois quanto menor o pH maior sua ação antimicrobiana, pois há uma maior liberação de ácido hipocloroso e consequentemente de cloro livre (8,43). Entretanto é necessário, mais estudos para analisar o pH na adição da albumina ao NaOCl. Acredita-se que o SB dificulte a ação do NaOCl, porém alguma substância do soro bovino ainda não identificada, possa ter diminuído o pH do NaOCl, o que também seria favorável à ação antimicrobiana do NaOCl.

Como substância inorgânica nos deparamos com a dentina, que é o tecido que reveste o canal radicular, e que durante o tratamento endodôntico, há formação de detritos dentinários, que são removidos com o auxílio da irrigação (21). Haapasalo et al (2000) demonstraram que a dentina inibe o efeito antimicrobiano do NaOCl a 1% contra o *Enterococcus faecalis*. Desde então, a ação da dentina sobre as soluções irrigadoras vem sendo muito estudada, (21,25,28,30,38) e um novo método foi desenvolvido, através do pó da dentina de dentes humanos extraídos, pois apresenta partículas pequenas e podem ser adicionadas às soluções antimicrobianas e meios de cultura, além de serem facilmente depositadas no canal radicular ou/e sobre dentina em quantidades padronizadas (21,25).

O grupo onde ocorreu a inclusão do pó de dentina ao NaOCl, apresentou menor ação antimicrobiana quando comparados com os outros grupos de NaOCl. A dentina demonstrou resultados inferiores ao soro fetal bovino com albumina sérica em relação ao NaOCl. Optou-se por esse modelo de estudo, para aproximar a uma condição real, onde o NaOCl permanece em contato com a dentina e seus detritos,

durante a modelagem do canal radicular, confirmando que o NaOCl perde sua ação antimicrobiana de forma rápida ao entrar em contato com a dentina e portanto é de extrema importância a troca constante da solução durante o tratamento.

A pesquisa publicada por Tong, Shang, Wei (2019) mostrou da mesma forma que este estudo, a influência destas substâncias orgânicas e inorgânicas sobre a ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio. No entanto, o soro promoveu maior inibição do que o pó de dentina, contrariamente ao aqui verificado. Pode-se justificar que esta maior inibição do NaOCl pelo soro, se deve ao fato de que foi utilizado o soro humano, concentração diferente do NaOCl (1%) e também a avaliação metodológica em si foi bastante diferente, uma vez que, os autores citados fizeram seu teste sobre biofilmes de 7 dias e no presente trabalho, foi testada a descontaminação intratubular em dentes humanos extraídos.

A clorexidina é uma solução irrigadora que também é recomendada para o tratamento de canais radiculares e, apresenta ação antimicrobiana de amplo espectro e não apresenta ação de solvente de tecidos orgânicos. porém A clorexidina pode apresentar toxicidade aos tecidos periapicais, no entanto, em menor intensidade que o NaOCl. A ação antimicrobiana da clorexidina ocorre sobre a membrana celular da bactéria e, quando em concentrações elevadas, atua como bactericida, rompendo a parede celular e, quando em baixas concentrações atua como bacteriostática, inibindo funções da membrana celular ^(20,42).

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que a clorexidina quando usada sozinha apresentou ação antimicrobiana, porém inferior ao NaOCl. Entretanto quando adicionada ao pó de dentina os resultados foram menos favoráveis. Estudos revelaram que o efeito inibitório da dentina sobre a clorexidina ocorre após 1 hora em contato com as bactérias, ou seja, o pó de dentina não inibiu a ação antimicrobiana da clorexidina, porém retarda o seu efeito ⁽³⁶⁾. Na adição do soro bovino à clorexidina, obtivemos resultados inversos ao NaOCl, pois a adição do soro bovino com albumina sérica na clorexidina apresentou resultados ainda inferiores, quando comparado aos outros grupos. Estudos na literatura apontam que o soro fetal bovino inibe grande parte da ação antimicrobiana da clorexidina e, mesmo após 24 horas, mais de 20% das cepas de *Enterococcus faecalis* permaneceram viáveis ^(36,38).

Frente a isso, pode-se dizer que o exsudato inflamatório periapical, que pode ser encontrado no canal radicular, é uma ameaça maior à atividade antimicrobiana da clorexidina do que as paredes dentinárias e seus detritos.

Além da viabilidade bacteriana após a irrigação convencional com as soluções irrigadoras, também foi analisado a presença da matriz do biofilme, pois não significa que com a bactéria morta sua matriz tenha sido completamente eliminada. Para essa análise foi usado o corante fluorescente Calcofluor White.

O Calcofluor é normalmente utilizado para demonstração de fungos e, é muito usado na micologia clínica, sendo um corante que se liga à celulose e quitina. Ainda não tem relatos na odontologia da sua utilização, porém está sendo estudado na agropecuária, agronomia e iniciou-se na oftalmologia para detecção de algumas bactérias, porém seus estudos ainda são escassos ^(23,26,43).

Nos resultados obtidos, observamos que o NaOCl quando sozinho, apresentou alta efetividade na ação dissolvente dos tecidos, isto é, quando sozinho foi o grupo que mais eliminou matriz de biofilme. Entretanto quando associado ao soro fetal bovino, apresentou grande quantidade de matriz, ou seja, mesmo sendo efetivo na ação antimicrobiana, o soro fetal bovino diminui a sua ação solvente espantosamente. Na presença de pó de dentina a ação solvente foi melhor quando comparada com o soro fetal bovino, entretanto foi menos efetiva do que o NaOCl puro.

Já foi comprovado na literatura que a clorexidina não apresenta ação solvente dos tecidos, devido a isso seus resultados em relação a presença de matriz do biofilme foi maior quando comparada com os grupos de NaOCl. Entretanto, ainda apresentou resultados melhores, sozinha, do que os grupos onde foi associada com o pó de dentina e o soro fetal bovino.

O SB pode ser um inibidor mais forte que o pó de dentina na ação antimicrobiana da clorexidina e o contrário foi visualizado sobre o NaOCl. O fato é que ambos inibem a ação antimicrobiana e clinicamente isto poderia ser compensado com uma maior quantidade ou volume dos irrigantes. O mesmo pode ser considerado em relação à presença de matriz, pois o NaOCl que possui excelente capacidade de dissolução, quando adicionado de SB torna-se bastante

ineficaz. Assim, são necessários mais estudos, envolvendo diferentes volumes e concentrações das substâncias testadas e principalmente, em relação à dissolução das matrizes de biofilmes.

4 CONCLUSÃO

4 CONCLUSÃO

Concluiu-se que a associação do pó de dentina e o soro fetal bovino com albumina sérica nas soluções irrigadoras, afetaram mais a viabilidade das bactérias do que a dissolução de suas matrizes.

A clorexidina quando pura demonstrou resultados inferiores ao hipoclorito de sódio, mesmo adicionado de soro bovino. O NaOCl foi mais afetado com a presença do pó de dentina do que com o SB, porém sem diferença estatística. A clorexidina demonstrou que na presença de soro fetal bovino houve maior inibição do efeito antimicrobiano quando comparado ao grupo da clorexidina associada com o pó de dentina. A ação antimicrobiana da clorexidina é mais afetada pelo pó de dentina do que pelo soro fetal bovino.

Em relação a matriz de biofilme, o NaOCl demonstrou grande capacidade de dissolução, entretanto, bastante neutralizada na presença do soro bovino. A clorexidina expressou pouca capacidade de dissolução de matriz, no entanto, comportando-se da mesma maneira quando adicionada dos inibidores e do grupo de NaOCl com soro bovino.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Alveolo-Maurosa JG. et al. Direct image-based enumeration of *Clostridium phytofermentans* cells on insoluble plant biomass growth substrates. Appl. Environ Microbiol, Estados Unidos, v. 82, n. 3, p. 972-8, Feb. 2016.
 2. Andrade FB. et al. A new improved protocol for *in vitro* intratubular dentinal bacterial contamination for antimicrobial endodontic tests: standardization and validation by confocal laser scanning microscopy. J Appl Oral Sci, Brasil, v. 23, n. 6, p. 591-8, Dec. 2015.
 3. Arias-Moliz MT. et al. Effects of dentin debris on the antimicrobial properties of sodium hypochlorite and etidronic acid. J Endod, Estados Unidos, v. 42, n. 5, p.771-5, May. 2016.
 4. Bergenholtz G. et al. Inhibition of sérum albumin flux across exposed dentine following conditioning with GLUMA primer, glutaraldehyde or potassium oxalates. Dent J, Suíça, v. 21, n. 4, p. 220-227, Aug.. 1993.
 5. Bickel M, Cimasoni G, Andersen E. Flow and albumin content of early (pre-inflammatory) gingival crevicular fluid from human subjects. Archs oral biol, Inglaterra, v. 30, n. 8, p. 599-602. 1985.
 6. Brasil KW, Pinheiro RL, Pimentel IC. Diagnóstico laboratorial de micoses superficiais e cutâneas: comparação dos métodos do hidróxido de potássio e do calcofluor White. An bras Dermatol, Rio de Janeiro, v. 78, n.5, p. 547-551, Set/out. 2003.
 7. Busanello FH. et al. Chemical biofilm removal capacity of endodontic irrigants as a function of biofilm structure: optical coherence tomography, confocal microscopy and viscoelasticity determination as integrated assessment tools. Int Endod J, Inglaterra, v. 52, n.4, p. 461-474, Apr. 2019.
 8. Cesário F. Desinfecção intratubular dentinária promovida por soluções irrigadoras com variação de pH e agitação ultrassônica. 2016. 60 p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2016.
 9. Chivatxaranukul P, Dashper SG, Messer HH. Dentinal tubule invasion and adherence by *Enterococcus faecalis*. Int Endod J, Inglaterra, v. 41, n.10, p. 873-82, Oct. 2008.
-

10. Dametto FR. et al. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gem as na endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. Oral Surg Oral Med Oral Oral Radiol Endod, Estados Unidos, v. 99, n. 6, p. 768-772, jun. 2005.
 11. Del Carpio-Perochena AE. et al. Antibacterial and dissolution ability of sodium hypochlorite in diferente pHs on multi-species biofilms. Clin Oral Investig, Alemanha, v. 19, n.8, p. 2067-73, nov. 2015.
 12. Del Carpio-Perochena AE. et al. Effect of temperature, concentration and time of sodium hypochlorite on the treatment and revitalization of oral biofilms. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects, Irã, v. 9, n.4, p. 209-15, Dez. 2015.
 13. Del Carpio-Perochena AE. et al. Biofilm dissolution and cleaning ability of diferente irrigant solutions on intraorally infected dentin. J Endod, Estados Unidos, v.37, n.8, p.1134-8, Aug. 2011.
 14. De Oliveira RL. et al. Computed microtomography evaluation of calcium hydroxide-based root canal dressing from oval root canals by diferente methods of irrigation. Microsc Res Tech, Estados Unidos, v. 82, n.3, p. 232-237, Mar. 2019.
 15. Domenech M. et al. Evidence of the presence of nucleic acids and β -glucan in the matrix of non-typeable *Haemophilus influenzae in vitro* biofilms. Sci Rep, Inglaterra, p. 1-13, Nov. 2016.
 16. Duque JA. et al. Comparative effectiveness of new mechanical irrigant agitating devices for debris removal from the canal and isthmus of mesial roots of mandibular molars. J Endod, Estados Unidos, v. 43, n. 2, p. 326-331, Feb. 2017.
 17. Estrela C. et al. Mechanism of action of sodium hypochlorite. Braz Dent J, Brasil, v. 13, n.2, p. 113-117. 2002.
 18. Giardino L. et al. Sodium hypochlorite solution penetration into human dentine: a histochemical evaluation. Int Endod J, Inglaterra, v. 50, n. 5, p. 492-498, May. 2017.
 19. Giardino L. et al. Antimicrobial effectiveness of combinations of oxidant and chelating agentes in infected dentine: na ex vivo confocal laser scanning microscopy study. Int Endod J, Inglaterra, v. 51, n. 4, p. 448-456, Apr. 2018.
 20. Goldberg F, Abramovich A. Analysis of the effect of EDTAC on the dentinal walls of the root canal. J Endod, Estados Unidos, v. 3, n. 3, p. 101-105, Mar. 1977.
-

21. Gomes BPFA. et al. Chlorhexidine in endodontics. Braz Dent J, Ribeirão Preto, v. 24, n. 2, p. 89-102, Apr. 2013.
 22. Haapasalo M. et al. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. J Endod, Estados Unidos, v. 33, n. 8, p. 917-925, Aug. 2007.
 23. Khedmat S, Aligholi M, Sadeghi S. Influence of bovine sérum albumin on the antibacterial activity of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis*. IEJ, Irã, v. 4, n. 4, p. 139-143, Aug. 2009.
 24. Lallo MA. et al. Técnicas de coloração para detecção de *Encephalitozoon cuniculi* em cortes histológicos. Ciencia rural, Brasil, v. 40, n. 11, p. 2406-2410, Nov. 2010.
 25. Love RM. *Enterococcus faecalis*: a mechanism for its role in endodontic failure. Int Endod J, Inglaterra, v. 34, n. 5, p. 399-405, Jul. 2001.
 26. Macedo RG, Herrero NP, Wesselink P. Influence of the dentinal wall on the pH of sodium hypochlorite during root canal irrigation. J Endod, Estados Unidos, v. 40, n. 7, p. 1005-08, Jul. 2014.
 27. Malhotra C. et al. In vivo confocal microscopic characteristics of microsporidial keratoconjunctivitis in immunocompetent adults. Br J Ophthalmol, Inglaterra, v. 101, n. 9, p. 1217-1222, Sep. 2017.
 28. Mohammadi Z, Shalavi S. Effect of hydroxyapatite and bovine sérum albumin on the antibacterial activity of MTA. IEJ, Irã, v. 6, n. 4, p. 136-139, Sep. 2011.
 29. Morgental RD. et al. Dentin inhibits the antibacterial effect of new and conventional endodontic irrigants. J Endod, Estados Unidos, v. 39, n. 3, p. 406-410, Mar. 2013.
 30. Ordinola-Zapata R. Periodontite apical induzida em cães. Efeito do tratamento endodôntico. Estudo microbiológico, tomográfico e de microscopia confocal. 2009. 179 p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2009.
 31. Pappen FG. et al. Inhibition of sodium hypochlorite antimicrobial activity in the presence of bovine sérum albumin. J Endod, Estados Unidos, v. 36, n. 2, p. 268-71, Feb. 2010.
-

32. Pascon CB. **Análise crítica da ação do hipoclorito de sódio e da clorexidina como substâncias química auxiliares em endodôntia: enfoque em obturação de canais laterais.** 2007. 53 p. Monografia (Especialista em Endodontia) – Faculdade de Piracicaba, UNICAMP, Piracicaba, 2007.
 33. Peciulienė V. et al. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J*, Inglaterra, v. 34, n. 6, p. 429-34, Sep. 2001.
 34. Pereira TC. et al. Intratubular disinfection with tri-antibiotic and calcium hydroxide pastes. *Acta Biomater Odontol Scand*, Inglaterra, v. 75, n. 2, p.87-93, Nov.. 2016.
 35. Pereira TC. et al. Intratubular decontamination ability and physicochemical properties of calcium hydroxide pastes. *Clin Oral Investig*, Alemanha, v. 23, n. 3, p. 1253-1262, Mar. 2019.
 36. Peters LB. et al. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. *J Endod*, Estados Unidos, v. 27, n. 2, p. 76-80, Feb. 2001.
 37. Portenier I. et al. Inactivation of root canal medicaments by dentine, hydroxylapatite and bovine serum albumin. *Int Endod*, Inglaterra, v. 34, n. 3, p. 184-188, Apr. 2001.
 38. Portinier I. et al. Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. *J Endod*, Estados Unidos, v. 32, n. 2, p. 138-141, Feb.. 2006.
 39. Quintana RM, Jardine AP, Montagner F. Effect of human, dentin, albumin and lipopolysaccharide on the antibacterial activity of endodontic activity of endodontic irrigants. *J Conserv Dent*, Índia, v. 20, n. 5, p. 341-345, Oct. 2017.
 40. Ram AFJ, Klis FM. Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on calcofluor White and congo red. *Nat Protoc*, Inglaterra, v.1, n. 5, p. 2253-56, Dec. 2006.
 41. Sassone LM. et al. The influence of organic load on the antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine *in vitro*. *Int Endod J*, Inglaterra, v. 36, n. 12, p. 848-52, Dec. 2003.
 42. Sassone LM. et al. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine by two different tests. *Aust Endod J*, Austrália, v. 34, n. 1, p. 19-24, Apr. 2008.
-

43. Siqueira JF Jr, De Uzeda M, Fonseca ME. A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. *J Endod, Estado Unidos*, v. 22, n. 4, p. 308-10, Jun. 1996. 39
 44. Surya Kirani KRL, Satya Chandrika V. Efficacy of in-house fluorescent stain for fungus. *Indian J Pathol Microbiol, Índia*, v. 60, n. 1, p. 57-60, Mar. 2017.
 45. Tong Z, Zhang Y, Wei X. The effect of human serum and dentin powder alone or in combination on the antibacterial activity of sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis*. *Arch Oral Biol, Inglaterra*, v. 97, p. 72-76, Jan.. 2019.
 46. Van der Sluis LW. et al. Study on the influence of refreshment/activation cycles and irrigants on mechanical cleaning efficiency during ultrasonic activation of the irrigant. *J Endod, Estados Unidos*, v. 36, n. 4, p. 737-40, Apr. 2010.
 47. Vianna ME. et al. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, Estados Unidos*, v. 97, n.1, p. 79-84, Jan. 2004.
 48. Zehnder M. et al. Tissue-dissolving capacity and antibacterial effect of buffered and unbuffered hypochlorite solutions. *Oral Surg Oral Pathol Oral Radiol Endod, Estados Unidos*, v. 94, n. 6, p. 756-62, Dec. 2002.
 49. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod, Estados Unidos*, v. 32, n. 5, p. 389-398, May. 2006.
-
-

ANEXOS

ANEXO A – Comitê de Ética

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência do soro bovino e do pó de dentina na efetividade antimicrobiana intratubular de soluções de hipoclorito de sódio e clorexidina

Pesquisador: GLAUCIA BEATRIZ GONCALVES

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 99729818.7.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo - Faculdade de Odontologia de Bauru

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.091.854

Apresentação do Projeto:

O estudo visa aprimorar o conhecimento sobre processo de limpeza de canais radiculares visando descontaminação e impedir que haja infecção pós-tratamento endodôntico.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar o efeito antimicrobiano nos túbulos dentinários das soluções irrigadoras utilizadas no tratamento de canais radiculares, quando na presença de debris dentinários e soro bovino.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos mínimos e benefícios relacionados ao aprimoramento do processo de limpeza dos canais radiculares, o que contribui para melhoria do tratamento endodôntico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa com alto potencial de contribuição ao avanço do conhecimento na área de endodontia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Após as devidas adequações, os termos reapresentados atendem as exigências éticas.

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA B
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA Cid: 17.012-001
UF: SP Município: BAURU
Telefone: (14)3235-8399 Fax: (14)3235-8399 E-mail: cep@fob.usp.br

USP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU DA USP

Continuação do Parecer: 3.001.554

Considerações Finais a critério do CEP:

Esse projeto foi considerado APROVADO na reunião ordinária do CEP de 17/12/2018, com base nas normas éticas da Resolução CNS 466/12. Ao término da pesquisa o CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatório final. Os relatórios parciais deverão estar de acordo com o cronograma e/ou parecer emitido pelo CEP. Alterações na metodologia, título, inclusão ou exclusão de autores, cronograma e quaisquer outras mudanças que sejam significativas deverão ser previamente comunicadas a este CEP sob risco de não aprovação do relatório final. Quando da apresentação deste, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação assinados e rubricados, se pertinentes.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1220721.pdf	28/11/2018 15:13:24		Aceito
Outros	OFICIO_RESPOSTA.docx	28/11/2018 15:13:03	GLAUCIA BEATRIZ GONCALVES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_com_parecer.docx	23/11/2018 17:47:15	GLAUCIA BEATRIZ GONCALVES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	novatese.pdf	20/09/2018 22:26:52	GLAUCIA BEATRIZ GONCALVES	Aceito
Outros	questionariopesquisador.pdf	20/09/2018 22:24:03	GLAUCIA BEATRIZ GONCALVES	Aceito
Outros	Glaucia_GI.pdf	20/09/2018 22:23:37	GLAUCIA BEATRIZ GONCALVES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Scan4.pdf	20/09/2018 22:23:03	GLAUCIA BEATRIZ GONCALVES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracaopesquisador.pdf	20/09/2018 22:22:32	GLAUCIA BEATRIZ GONCALVES	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	20/09/2018 22:22:04	GLAUCIA BEATRIZ GONCALVES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRUSOLLA 75 QUADRA 9
 Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA CEP: 17.012-981
 UF: SP Município: BAURU
 Telefone: (14)3235-8356 Fax: (14)3235-8356 E-mail: cep@fob.usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP

Continuação do Parecer 3.001.854

BAURU, 18 de Dezembro de 2018

Assinado por:
Ana Lúcia Pompêa Fraga de Almeida
(Coordenador(a))

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** dep@fob.usp.br

ANEXO B – Gráfico: Viabilidade Total

ANEXO C – Gráfico: Viabilidade Cervical

ANEXO D – Gráfico: Viabilidade Apical **ANEXO E – Gráfico: Matriz Total**

ANEXO F – Gráfico: Matriz Cervical

ANEXO G – Gráfico: Matriz Apical

ANEXO H – Gráfico: Viabilidade x Matriz

ANEXO I – Declaração

DECLARAÇÃO DE USO EXCLUSIVO DE ARTIGO EM DISSERTAÇÃO

Declaramos estarmos cientes de que o trabalho **Influência do soro bovino e pó de dentina na efetividade antimicrobiana intratubular de soluções de hipoclorito de sódio e clorexidina** será apresentado na dissertação da aluna Gláucia Beatriz Gonçalves e que não foi e nem será utilizado em outra dissertação/tese dos Programas de Pós-graduação da FOB-USP.

Bauru, 03 de maio de 2019.

Gláucia Beatriz Gonçalves

Assinatura

Maricel Rosário Cárdenas Cuellar

Assinatura

Murilo Priori Alcalde

Assinatura

Thais Cristina Pereira

Assinatura

Marco Antonio Hungaro Duarte

Assinatura

Flaviana Bombarda de Andrade

Assinatura