

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

MIRELA CESAR DE BARROS

**Ultrasonic agitation effect on different final irrigation
protocols on bacterial LPS inactivation**

**Efeito da agitação ultrassônica em diferentes protocolos
de irrigação final na inativação do LPS bacteriano**

BAURU
2022

MIRELA CESAR DE BARROS

**Ultrasonic agitation effect on different final irrigation
protocols on bacterial LPS inactivation**

**Efeito da agitação ultrassônica em diferentes protocolos
de irrigação final na inativação do LPS bacteriano**

Dissertação constituída por artigo 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.

Orientador: Profa. Dra. Flaviana Bombarda de Andrade

Versão Corrigida

BAURU
2022

Cesar de Barros, Mirela
Efeito da agitação ultrassônica em diferentes
protocolos de irrigação na inativação do LPS
bacteriano / Mirela Cesar de Barros. -- Bauru, 2022.
52 p. : il. ; 31 cm.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de
Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo,
2022.

Orientador: Prof. Dra. Flaviana Bombarda de
Andrade

Nota: A versão original desta dissertação/tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

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

Assinatura: 

Data: 25/03/2022

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 4.536.271
Data: 11 de Fevereiro de 2021

ERRATA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Assistência Técnica Acadêmica
Serviço de Pós-Graduação



FOLHA DE APROVAÇÃO

Dissertação apresentada e defendida por
MIRELA CESAR DE BARROS
e aprovada pela Comissão Julgadora
em 05 de maio de 2022.

Prof.^a Dr.^a **LUCIANE DIAS DE OLIVEIRA**
UNESP

Prof.^a Dr.^a **BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES**
FOP

Prof. Dr. **MARCO ANTONIO HUNGARO DUARTE**
FOB-USP

Prof.^a Dr.^a **FLAVIANA BOMBARDA DE ANDRADE**
Presidente da Banca
FOB - USP


Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte
Presidente da Comissão de Pós-Graduação
FOB-USP

DEDICATÓRIA

A Deus, pela dádiva da vida, por guiar e iluminar meus passos durante toda essa caminhada e nos momentos em que mais questioneei o meu propósito, me mostrou que depois da tempestade sempre vem a calmaria.

Aos meus pais, Eliana e Douglas, que sonham junto comigo e vibram com todas as minhas conquistas. Sem vocês nada disso seria possível! Minha base e meio apoio. Amo vocês incondicionalmente e dedico esta, assim como todas as minhas conquistas à vocês. Sempre buscarei ser uma pessoa melhor por vocês.

Ao Eduardo Pimentel meu companheiro, meu amor. Você foi meu alicerce durante esse tempo e não sei o que seria de mim sem o seu apoio e fé, quando eu mesma me desacreditei. Você enxerga em mim a melhor profissional do mundo, me motivando e impulsionando dia após dia. Te amo!

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra. Flaviana Bombarda de Andrade por todos os ensinamentos durante o meu mestrado. Tudo que aprendi no laboratório de microbiologia devo à senhora, que com toda paciência pegou na minha mão e me ensinou tudo que sei. Obrigada pela compreensão, carinho, disponibilidade, amizade e por ter acreditado em mim quando eu mesma duvidei. Construímos nesses anos uma linda relação de respeito e muito carinho. Serei eternamente grata por tudo.

Aos professores da disciplina de Endodontia, Prof Dr. Clovis Monteiro Bramante, Prof. Dr. Marco Antônio Hungaro Duarte e Prof. Dr. Rodrigo Ricci Vivan, com os quais aprendi muito e tive o prazer de conviver nas disciplinas do mestrado, clinics e laboratórios da graduação. Foi uma honra estar perto de pessoas tão renomadas e generosas.

A professora Dra. Lidiane de Castro Pinto por todo carinho e suporte, abrindo as portas da especialização de Endodontia do HRAC/USP para que eu pudesse participar monitorando os laboratórios práticos durante o meu mestrado. Professora, saiba que serei eternamente grata às oportunidades que me concedeu nesses anos.

A Profa. Dra. Luciane Dias Oliveira e a Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo Gomes que abriram as portas do seu laboratório para que eu pudesse realizar parte da minha pesquisa. Sou extremamente grata pela gentileza, acolhimento e disponibilidade que tiveram em colaborar comigo.

Ao Prof. Dr. Felipe Eduardo de Oliveira que foi essencial na realização de parte da minha metodologia não medindo esforços para me ajudar tanto presencial quanto de maneira remota. Sofreu junto comigo, mas também se alegrou pelas minhas conquistas. Felipe, palavras não seriam suficientes pela sua gentileza e empatia comigo. Obrigada!

Ao doutorando Victor Feliz Pedrinha, meu parceiro de laboratório e trabalhos, sua presença foi essencial na minha jornada. Não tenho palavras para agradecer a sua ajuda em toda minha caminhada no mestrado, sua amizade me fortaleceu em diversos momentos.

A doutoranda Jessica de Almeida Coelho, por todo apoio dentro e fora da pós-graduação. Jessica, palavras não medem o meu amor e gratidão pela sua existência na minha vida. Você apareceu na hora certa e suas palavras sempre sabem como me

trazer conforto e calma. Sua empatia, carinho, generosidade e luz me fortaleceram nos meus piores momentos e me impulsionaram nos melhores.

Aos meus grandes amigos Viviane Siqueira, Thiago Batista e Daiara Franco que foram fundamentais na minha caminhada do mestrado. Ofereceram ombro no momentos difíceis, mas também, vibraram cada conquista comigo. A amizade de vocês deixou tudo mais leve e eu só tenho a agradecer por toda ajuda, palavras, carinho e companheirismo nesses anos.

As minhas grandes amigas, Alline e Ranna, que viveram comigo toda angústia do processo de preparo para a seleção do mestrado, mas também, a conquista da tão sonhada aprovação e hoje comemoram comigo o fim desse ciclo. Vocês foram fundamentais nessa jornada e não posso me considerar nada menos que uma mulher de sorte.

Aos funcionários do Departamento de Endodontia Suely e Edimauro pelo carinho e convivência agradável durante esses anos.

A Marcia Graeff, técnica do Microscópio confocal de varredura a laser, sou muito grata pela sua ajuda e paciência durante a realização dos meus experimentos, que foram fundamentais para a conclusão desta etapa.

Aos meus colegas de Mestrado Letycia, Marcos, Thalita e também aos demais colegas da pós-graduação orientados da profa. Flaviana, que dividiram comigo todas as experiências desse ciclo e tornaram meus dias mais leves e divertidos. Só tenho a agradecer pela parceria, ajuda, companheirismo e presença de cada um de vocês nesses dois anos. Hoje saio uma pessoa e profissional completamente diferente de quando ingressei e há a contribuição de cada um de vocês nisso.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, na pessoa do diretor, Professora Dra. Marília Buzalaff.

À comissão de pós-graduação na pessoa do Professor Dr. Marco Antônio Hungaro Duarte.

Ao coordenador do programa da pós-graduação em Endodontia Professor Dr. Marco Antônio Hungaro Duarte.

Aos funcionários da pós-graduação Ana Letícia Palombo Momesso, Vera Lygia Santos Butignoli Caetano e Leila Regina da Silva Yerga Xavier por sempre estarem a disposição em ajudar e serem atenciosas, muito obrigada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo financiamento deste projeto.

Ao Centro Integrado de Pesquisas da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP, na pessoa da Professora Dra. Profa. Dra. Ana Carolina Magalhães.

"Devemos acreditar que somos talentosos para algumas coisas, e que essa coisa, a qualquer custo, deve ser alcançada."

Marie Curie

RESUMO

Objetivo: Avaliar a efetividade de soluções irrigadoras alternativas associadas ou não à irrigação ultrassônica passiva (PUI) sobre *Fusobacterium nucleatum* e sua endotoxina (LPS). **Material e Métodos:** Noventa cilindros de dentina foram contaminados com *F. nucleatum* (ATCC 51190) por 7 dias. Amostras foram divididas em 1 grupo controle e grupos experimentais de acordo com os irrigantes: Hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl), Clorexidina 2% (CLX), NaOCl 2,5% + solução de hidróxido de cálcio 0,14% (Ca(OH)₂) e extrato etanólico de própolis 10% (EEP), e os métodos de agitação PUI ou irrigação convencional (IC). Coletas antes e após a irrigação foram realizadas para quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e LPS, utilizando o ensaio LAL cinético cromogênico. Em seguida, as amostras foram submetidas à análise por microscopia confocal de varredura a laser para quantificar a viabilidade bacteriana. A distribuição dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Comparações intragrupos e intergrupos foram realizadas pelo teste de Wilcoxon e Kruskal-Wallis, respectivamente, seguido pelo pós-teste de Dunn. O teste de Mann-Whitney foi realizado para comparação entre as técnicas de irrigação ($\alpha = .05$). **Resultados:** Todos os irrigantes foram eficazes em reduzir a contagem de UFC/mL ($p > .05$). Menores valores de viabilidade bacteriana e LPS foram observados para os irrigantes PUI-ativados. O maior percentual de redução do LPS assim como a menor viabilidade foram atribuídos ao NaOCl 2,5% ($p < .05$). EEP 10% e NaOCl + Ca(OH)₂ 0,14% PUI-ativados apresentaram desempenho estatisticamente similar ao NaOCl 2,5% ($p > .05$). **Conclusão:** O EEP 10% quando ativado teve a mesma ação antimicrobiana e anti-LPS que a solução de NaOCl 2,5%. A PUI favoreceu a ação de todas as soluções investigadas sobre o *F. nucleatum* e sua endotoxina.

Palavras-chave: *Fusobacterium nucleatum*. Endotoxinas. Ultrassom. Própolis. Teste do Limulus. Hipoclorito de sódio.

ABSTRACT

Ultrasonic agitation effect on different final irrigation protocols on bacterial LPS inactivation

Objective: To evaluate the effectiveness of alternative irrigating solutions associated or not with passive ultrasonic irrigation (PUI) on *Fusobacterium nucleatum* and its endotoxin (LPS). **Material and Methods:** Ninety dentin cylinders were contaminated with *F. nucleatum* strain (ATCC 51190) for 7 days. The specimens were divided into 1 control group and experimental groups according to the irrigant: 2.5% sodium hypochlorite (NaOCl), 2% chlorhexidine (CHX), 2.5% NaOCl + 0.14% calcium hydroxide solution (Ca(OH)₂), and 10% ethanolic extract of propolis (EEP), and agitation methods, PUI ou CI. Samples before and after irrigation were performed to quantify colony forming units (CFU/mL) and LPS using the LAL assay. Then, the specimens were subjected to confocal laser scanning microscopy analysis to quantify the bacterial viability. Data distribution was confirmed by the Shapiro-Wilk test. Intragroup and intergroup comparisons were performed using the Wilcoxon and Kruskal-Wallis tests, respectively, followed by Dunn's post-test. The Mann-Whitney test was performed to compare the irrigation techniques ($\alpha = .05$). **Results:** All irrigants were effective in reducing the CFU/mL count after irrigation with no significant differences ($p > .05$). Lower values of bacterial viability and LPS were observed for PUI-activated irrigants. The highest percentage of LPS reduction, as well as the lowest viability, were attributed to 2.5% NaOCl. 10% EEP and NaOCl + 0.14% Ca(OH)₂ associated with PUI-activated showed similar performance to 2.5% NaOCl ($p > .05$). **Conclusion:** The 10% EEP when activated had the same antimicrobial and anti-LPS action as the 2.5% NaOCl solution. The PUI favored the action of all investigated solutions on *F. nucleatum* and its endotoxin.

Keywords: *Fusobacterium nucleatum*. Endotoxins. Ultrasound. Propolis. Limulus Test. Sodium hypochlorite.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

SCR – Sistema de canais radiculares

LPS – Lipopolissacarídeos

IL – Interleucinas

TNF – Fator de necrose tumoral

NaOCl – Hipoclorito de sódio

CLX – Clorexidina

IC – irrigação convencional

PUI – Irrigação ultrassônica passiva

UFC/mL – Unidades formadoras de colônias por mililitro

MCVL - Microscopia confocal de varredura a laser

LAL – Lisado de amebócito de Limulus

EEP - Extrato etanólico de própolis

Ca(OH)₂ - Hidróxido de cálcio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	ARTIGO	20
2.1	ARTIGO 1	20
3	REFERÊNCIAS	42
	APÊNDICES	47
	ANEXOS	52

1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O tratamento endodôntico de dentes com necrose pulpar objetiva, através de meios mecânicos e químicos, a desinfecção do sistema de canais radiculares (SCR) eliminando microrganismos e seus subprodutos, e promovendo assim condições ideais para o reparo dos tecidos periapicais (BASRANI *et al.*, 2010; GRÜNDLING *et al.*, 2015). No entanto, a complexidade anatômica apresentada pelo SCR impõe dificuldades a essa sanificação, onde a persistência de microrganismos e/ou seus fatores de virulência dentro do SCR tem sido relacionada ao fracasso do tratamento endodôntico (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2008).

Bactérias desempenham um papel importante na indução e manutenção das doenças periapicais (KAKEHASHI, 1965). As Gram-negativas, presentes principalmente nos casos de infecção endodôntica primária possuem na sua parede celular externa lipopolissacarídeos (LPS), também conhecidos como endotoxinas, representando o principal fator de virulência desses patógenos. São liberados durante multiplicação ou lise da célula bacteriana e responsáveis por uma série de efeito biológicos nocivos, na qual o lipídeo A é a região molecular responsável por tais efeitos (MERGENHAGEN; VARAH, 1963; LEONARDO *et al.*, 2004; MARTINHO *et al.*, 2012).

Essas endotoxinas, altamente imunoestimuladoras, são responsáveis pela quimiotaxia de neutrófilos, ativação do sistema complemento, indução de febre, alterações hemodinâmicas, ativação policlonal de linfócitos B e a produção de óxido nítrico (HORIBA *et al.*, 1990; OLIVEIRA *et al.*, 2005b). Se liga ao receptor CD-14 de macrófagos, neutrófilos e fibroblastos sendo reconhecida pelo hospedeiro como um antígeno, levando a liberação de uma série de mediadores químicos e citocinas pró-inflamatórias comumente envolvidas na patogênese da inflamação periapical, como as interleucinas (IL-1a, IL-1b, IL-6 e IL-8) e o fator de necrose tumoral (TNF-a) (HORIBA *et al.*, 1990). Além disso, estimula a secreção de prostaglandina E-2, que leva a ativação dos osteoclastos contribuindo para o processo de reabsorção óssea periapical (MARTINHO *et al.*, 2010; LUCISANO *et al.*, 2014).

Foi demonstrada uma correlação positiva entre a concentração dessa endotoxina nos canais radiculares e a presença de sinais e sintomas clínicos (JACINTO *et al.*, 2005; ENDO *et al.*, 2012), assim como maior destruição óssea periapical (SCHEIN; SCHILDER, 1975; CARDOSO *et al.*, 2015; MACHADO *et al.*, 2020). Por isso, o

tratamento endodôntico não deve apenas objetivar destruir bactérias, mas também, a eliminação do LPS e outros produtos tóxicos favorecendo o processo de reparo dos tecidos periapicais. Sabendo que os dentes com necrose pulpar e lesão periapical apresentam elevada quantidade de LPS e do seu potencial citotóxico sobre os tecidos periradiculares, há uma busca incessante de procedimentos clínicos para a sua redução ou neutralização. No entanto, existe uma grande dificuldade na eliminação e/ou inativação de LPS sobretudo pela sua grande capacidade de difusão através dos túbulos dentinários, podendo atingir a superfície radicular externa a partir de 24 horas (OLIVEIRA *et al.*, 2005a).

Fusobacterium nucleatum é um microrganismo anaeróbio Gram-negativo, isolado em 100% dos casos de infecção endodôntica primária (DE SOUZA *et al.*, 2005) e de extrema importância na formação de biofilmes, atuando como uma ponte de união entre colonizadores primários e secundários que não conseguem interagir (AMANO, 2010). Além disso, está presente na microbiota tanto de casos assintomáticos quanto sintomáticos, sendo nesses últimos a espécie mais predominante (SAKAMOTO *et al.*, 2006; SIQUEIRA; RÔÇAS, 2009).

A irrigação durante a terapia endodôntica mostra-se essencial para otimizar a eliminação e/ou redução dos níveis de LPS (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Diversas substâncias químicas foram estudadas dentre elas o hipoclorito de sódio (NaOCl), amplamente empregado devido a sua capacidade de dissolução tecidual e atividade antimicrobiana (HAAPASALO *et al.*, 2014) e a clorexidina (CLX), substância auxiliar empregada no tratamento endodôntico. Embora apresente inúmeras vantagens de uso, o NaOCl possui algumas desvantagens, incluindo ausência de substantividade e irritação quando em contato com os tecidos vivos periapicais, independente da sua concentração (PETERS, 2004; ZEHNDER, 2006; BRAMANTE *et al.*, 2015). Apesar disso, possui a capacidade de neutralizar de forma parcial o LPS (GOMES; MARTINHO; VIANNA *et al.*, 2009; MARTINHO *et al.*, 2012; CAVALLI *et al.*, 2017). Já a CLX 2%, apesar de possuir atividade antimicrobiana, amplo espectro de ação, baixa toxicidade e substantividade (IRALA *et al.*, 2009; HAAPASALO *et al.*, 2014), demonstra não ter ação eficaz sobre endotoxinas bacterianas (GRÜNDLING *et al.*, 2015; NEELAKANTAN *et al.*, 2018).

Alternativas como o hidróxido de cálcio, amplamente utilizado no tratamento endodôntico, devido à sua capacidade indutora de mineralização, ação antimicrobiana

e principalmente sobre as endotoxinas (LEONARDO *et al.*, 2002; MENEZES *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2005b), tem mostrado resultados favoráveis no uso como irrigante (água de cal) sozinho ou associado ao NaOCl na redução do LPS (OLIVEIRA *et al.*, 2005b; CARVALHO *et al.*, 2016). Também a própolis, que possui propriedades antimicrobianas, antivirais e antifúngicas, e tem demonstrando capacidade em reduzir a quantidade de bactérias e/ou seus fatores de virulência dos canais radiculares quando empregada durante o preparo biomecânico ou como medicação intracanal, apresenta-se como opção na potencialização da descontaminação do SCR (FERREIRA *et al.*, 2007; VALERA *et al.*, 2010; JAHROMI; TOUBAYANI; REZAEI, 2012; MAEKAWA *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2019).

O mecanismo mais empregado para a distribuição destas soluções é a irrigação convencional (IC), realizada por meio de seringas e agulhas de pequenos calibres, que apresenta limitações na remoção de debris dentinários, acesso à porção apical e áreas de complexidade anatômica (LEE; WU; WESSELINK, 2004; DUQUE *et al.*, 2017; GENERALI *et al.*, 2017). Consequentemente, recursos adicionais foram surgindo, dentre eles a irrigação ultrassônica passiva (PUI), que consiste na vibração da solução irrigante utilizando um inserto acoplado a um ultrassom, que oscila no interior dos canais radiculares, potencializando a atividade antimicrobiana da solução e favorecendo a limpeza através do efeito da cavitação e corrente acústica (AHMAD; PITTFORD; CRUM, 1987; VAN DER SLUIS *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2017). Além de promover uma melhor entrega do irrigante às regiões de maior complexidade anatômica e levar a uma maior limpeza através da remoção da *smear layer* (WELLER; BRADY; BERNIER, 1980; VIRDEE *et al.*, 2017), a PUI é responsável por uma maior redução dos níveis de LPS nos canais radiculares, como exposto na literatura (AVEIRO *et al.*, 2019; HASNA *et al.*, 2020).

Os estudos que avaliaram a ação do NaOCl e da CLX sobre o LPS, mostraram o seu potencial na redução dos níveis dessa endotoxina em canais radiculares infectados (VIANNA *et al.*, 2004; GOMES; MARTINHO; VIANNA *et al.*, 2009; GRÜNDLING *et al.*, 2015; NEELAKANTAN *et al.*, 2018). No entanto, poucos ou nenhum, abordaram protocolos de irrigação alternativos e ainda, associados à PUI que possam corroborar com tal feito. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar *in vitro* a efetividade de soluções irrigadoras alternativas associadas ou não à

irrigação ultrassônica passiva (PUI) sobre *Fusobacterium nucleatum* e sua endotoxina (LPS) presentes no interior do canal radicular e túbulos dentinários.

2

Artigo

2. ARTIGO

O artigo apresentado nesta dissertação foi escrito de acordo com as instruções e orientações para a submissão de artigos apresentados na revista *Journal of Endodontics*.

2.1 Artigo 1

Ativação ultrassônica da própolis, água de cal e irrigantes convencionais na redução de *Fusobacterium nucleatum* e seu LPS: estudo Ex Vivo

Mirela Cesar de Barros¹

Victor Feliz Pedrinha¹

Felipe Eduardo de Oliveira²

Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes³

Maria Cristina Marcucci Ribeiro²

Luciane Dias de Oliveira²

Flaviana Bombarda de Andrade¹

¹Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, São Paulo, Brasil.

²Departamento de Biociências e Diagnóstico Oral, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, São Paulo, Brasil.

³Departamento de Odontologia Restauradora, Divisão de Endodontia, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

Autor correspondente:

Dra. Flaviana Bombarda de Andrade

Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Al. Dr. Octavio Pinheiro Brisolla, 9-75, Bauru, São Paulo, Brasil.

Email: Flaviana@fob.usp.br

RESUMO

Objetivo: Avaliar a efetividade de soluções irrigadoras alternativas associadas ou não à irrigação ultrassônica passiva (PUI) sobre *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) e sua endotoxina (LPS) presentes no interior do canal radicular e túbulos dentinários.

Material e Métodos: Noventa cilindros de dentina de pré-molares inferiores foram contaminados com *F. nucleatum* (ATCC 51190) por 7 dias em condições de anaerobiose. Os espécimes foram divididos em 1 grupo controle e grupos experimentais de acordo com os irrigantes: Hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl), Clorexidina 2% (CLX), NaOCl 2,5% + solução de hidróxido de cálcio 0,14% (Ca(OH)₂) e extrato etanólico de própolis 10% (EEP), e os métodos de agitação PUI ou irrigação convencional (IC). Coletas antes e após da irrigação foram realizadas para quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e de LPS, utilizando o ensaio LAL. Em seguida, os espécimes foram submetidos à análise por microscopia confocal de varredura a laser para avaliar a viabilidade bacteriana intratubular. A distribuição dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Comparações intragrupos e intergrupos foram realizadas pelo teste de Wilcoxon e Kruskal-Wallis, respectivamente, seguido pelo pós-teste de Dunn. O teste de Mann-Whitney foi realizado para comparação entre as técnicas de irrigação ($\alpha = .05$). **Resultados:** Todos os irrigantes foram eficazes em reduzir a contagem de UFC/mL ($p > .05$). Menores valores de viabilidade bacteriana e LPS foram observados para os irrigantes PUI-ativados. O maior percentual de redução do LPS assim como a menor viabilidade foram atribuídos ao NaOCl 2,5% ($p < .05$). EEP 10% e NaOCl + Ca(OH)₂ 0,14% PUI-ativados apresentaram desempenho estatisticamente similar ao NaOCl 2,5% ($p > .05$). **Conclusão:** O EEP 10% quando ativado teve a mesma ação antimicrobiana e anti-LPS que a solução de NaOCl 2,5%. A PUI favoreceu a ação de todas as soluções investigadas sobre o *F. nucleatum* e sua endotoxina.

Descritores: *Fusobacterium nucleatum*. Endotoxinas. Ultrassom. Própolis. Teste do Limulus. Hipoclorito de sódio.

Introdução

A análise da microbiota de canais radiculares com polpa necrótica e infectados revelaram a predominância de bactérias anaeróbias Gram-negativas³. Essas bactérias possuem na sua membrana externa lipopolissacarídeos (LPS) que representam o seu principal fator de virulência⁴ e são liberados durante multiplicação ou lise celular⁵. Altos níveis de LPS estão relacionados ao desenvolvimento da sintomatologia clínica, manutenção da inflamação e destruição óssea periapical⁶⁻⁸.

Fusobacterium nucleatum (*F. nucleatum*) é um microrganismo Gram-negativo, isolado em 100% dos casos de infecção endodôntica primária (DE SOUZA *et al.*, 2005) e de extrema importância na formação de biofilmes pois atua como uma ponte de união entre colonizadores primários e secundários que não conseguem interagir (AMANO, 2010).

Várias soluções irrigadoras tem sido testadas contra o LPS em infecções do canais radiculares¹⁰⁻¹³, dentre elas o hipoclorito de sódio (NaOCl), mundialmente utilizado devido a sua capacidade de dissolução tecidual e atividade antimicrobiana e a clorexidina (CLX), solução alternativa na terapia endodôntica, que apresenta além de ação antimicrobiana associada a substantividade, baixo grau de toxicidade¹⁴. Apesar das excelentes propriedades antimicrobianas, mostram pouco ou nenhum efeito na eliminação do LPS quando empregados de forma convencional durante o preparo biomecânico^{9,11,15,16}.

Alternativas como o hidróxido de cálcio (CaOH₂) tem mostrado bons resultados na eliminação do LPS de canais radiculares, quando utilizado como irrigante único (água de cal)⁹ ou associado ao NaOCl¹⁷, assim como o extrato etanólico de própolis (EEP), que também tem apresentando eficácia na eliminação de Gram-negativos e sua endotoxinas¹⁸. Estratégias como a irrigação ultrassônica passiva (PUI), melhoram a descontaminação e limpeza do canal radicular¹⁹, permitindo maior alcance do irrigante em áreas de complexidade anatômica e tem mostrado otimizar a redução dos níveis de LPS nos canais radiculares^{12,13,20}. Existem poucos estudos comparativos sobre a ativação mecânica do NaOCl e CLX e seus efeitos na redução bacteriana intratubular e dos níveis de LPS. E tampouco, investigações sobre ação de soluções alternativas como a água de cal e a própolis nessas condições.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar *in vitro* os efeitos de soluções alternativas e a técnica de irrigação, na eliminação do *F. nucleatum* e sua endotoxina (LPS) presentes no interior do canal radicular e túbulos dentinários. A hipótese nula é de que não há diferenças significantes entre as soluções e os protocolos de irrigação na redução de *F. nucleatum* do canal principal e de dentro dos túbulos, assim como dos níveis de LPS.

Material e métodos

Estimativa do tamanho da amostra

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa em seres humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru (CAAE: 39330620.0.0000.5417). O cálculo amostral foi realizado baseado em estudos anteriores usando o software G* Power v 3.1 para Mac (Heinrich Heine, Universidade de Düsseldorf, Alemanha). Para 8 grupos experimentais usando o erro do tipo alfa de 0,05, o poder beta de 0,95 e a razão N2/N1 de 1. O teste mostrou um total de 10 espécimes por grupo como o tamanho ideal. Além disso, foram utilizados 10 dentes como controles positivos (C⁺) para o crescimento bacteriano intratubular.

Seleção dos espécimes

Noventa pré-molares inferiores unirradiculares recém extraídos foram selecionados através de radiografias mesiodistais e vestibulolinguais. Os dentes apresentavam raízes totalmente formadas e canais únicos, sem reabsorção radicular ou calcificações nos canais radiculares.

Preparo dos espécimes

Detritos, cálculos e restos de tecido mole foram removidos da superfície radicular com curetas periodontais Gracey (SSWhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Os dentes foram decoronados e os 3 mm apicais de cada raiz foram removidos com um disco diamantado de dupla face 0,10 x 22 mm (KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil) resfriado a água, padronizando o comprimento da raiz ($\cong$ 15 mm). O comprimento de trabalho (CT) foi determinado subtraindo 1 mm desta medida²¹.

Para padronizar o diâmetro dos canais (ou seja, o diâmetro interno dos cilindros de dentina), eles foram ampliados com o instrumento X-1 blue 40.06 (MK LIFE, Porto

Alegre, RS, Brasil), abrindo espaço para a inoculação de microrganismos. Os espécimes foram submetidos a três banhos ultrassônicos sucessivos por 10 minutos cada em NaOCl 1% (Asfer, São Caetano do Sul, São Paulo, Brasil), EDTA 17% (Biodinâmica, Ibitiporã, PR, Brazil) e tiosulfato de sódio 1%.

Os cilindros foram secos com pontas de papel esterilizada (Dentsply Ind Com LTDA, Petrópolis, RJ, Brasil). A região apical foi selada com resina composta Natural Look (DFL Industria e Comércio S.A. Taquaral, RJ, Brasil) e as superfícies radiculares externas receberam duas camadas de adesivo epóxi (Brascola, São Paulo, SP, Brasil), exceto na região cervical⁹. Em seguida, foram fixados com resina acrílica quimicamente ativada em placas de 24 poços, dez espécimes por placa, e esterilizados juntamente com todo material utilizado na pesquisa, por radiação gama com cobalto 60 (20 KGy por 6 horas)²².

Contaminação intratubular

Os espécimes foram colocados em microtubos apirogênicos (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) com RCM esterilizado (Reinforced Clostridial Medium, Probac do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) e submetidos a banho ultrassônico por 10 minutos para máxima penetração do caldo nos túbulos dentinários.

A cepa bacteriana de *F. nucleatum* ATCC 51190 (American Type Culture Collection) foi reativada em caldo RCM e incubada em anaerobiose durante 48h, após esse período a suspensão bacteriana foi ajustada para concentração de 3×10^8 unidades formadoras de colônia (UFC/mL) utilizando espectrofotômetro SF325NM (Bel Photonics do Brasil Ltda, Osasco, SP, Brasil) e incubada a 37°C por 24h em câmara de anaerobiose para atingir crescimento exponencial. A morfologia da colônia e coloração de Gram foram avaliadas várias vezes ao longo do experimento para confirmar a pureza. A contaminação dos espécimes durou 7 dias em meio RCM a 37°C seguindo o protocolo de Andrade et al.²¹ e a sequência de centrifugação de Ma et al.²³ com modificações.

Grupos experimentais

Todos os procedimentos foram realizados em condições assépticas dentro de fluxo laminar. Os espécimes foram distribuídos aleatoriamente em oito grupos (n=10) de acordo com o protocolo de irrigação realizado, irrigação convencional (IC) ou PUI: G1: NaOCl 2,5% (Farmácia Específica, Bauru, SP, Brasil) + IC; G2: CLX 2% (Farmácia

Specífica, Bauru, SP, Brasil) + IC; G3: NaOCl 2,5% + Ca(OH)₂ 0,14% (0.14 g de hidróxido de cálcio em água apirogênica; Biodinâmica, PR, Brasil) + IC; G4: EEP 10% Apis-Brasil, Pindamonhagaba, SP, Brasil) + IC; G5: NaOCl 2,5% + PUI; G6: CLX 2% + PUI; G7: NaOCl 2,5% + Ca(OH)₂ 0,14% + PUI; G8: EEP 10% + PUI.

A irrigação convencional (IC) foi realizada em conjunto com aspiração simultânea utilizando 5mL da solução de escolha, ficando o último mL durante 60s. A irrigação ultrassônica passiva (PUI) foi realizada com 5mL da solução de escolha dividida em três ativações de 20s cada.

Para os procedimentos de irrigação os espécimes foram colocados em um dispositivo metálico esterilizado. Nos grupos da IC, o irrigante foi entregue por intermédio de seringa e agulha apirogênicas. A PUI foi realizada usando o inserto ultrassônico E1-Irrisonic (Helse, Santa Rosa de Viterbo, SP, Brasil) (#20.01), inserido 2mm aquém do comprimento de trabalho. A potência do aparelho ultrassônico foi de 10% (Satelec, Microimagem, Indaiatuba, SP, Brasil)^{13,20}. Após os protocolos de irrigação final todos os espécimes foram irrigados com 5mL de água destilada apirogênica.

Coletas das amostras

Para amostragem microbiológica e de endotoxinas, duas pontas de papel absorvente esterilizadas/apirogênicas (tamanho #25; Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) foram introduzidas, uma por vez, em toda a extensão do canal e mantidas na posição por 60s cada^{12,20,28}. Foram realizadas coletas em dois momentos: antes dos protocolos de irrigação (S1), no intuito de confirmar a contaminação e servir como linha de base e imediatamente após (S2), a fim de determinar a atividade antimicrobiana e anti-LPS de cada solução irrigadora final, associada a IC ou a PUI.

Ensaio Lisado de Amebócito de Limulus (LAL) - Quantificação de endotoxinas

Imediatamente após a coleta, as pontas de papel foram transferidas para microtubos apirogênicos contendo 1000µL de solução salina apirogênica e armazenadas em freezer -20°C até o momento do uso. Para a quantificação das endotoxinas, as amostras foram diluídas em 10⁻³ devido à sensibilidade do teste cinético cromogênico (KQCL). A endotoxina de *Escherichia coli* foi utilizada como padrão nas concentrações de 50 EU/mL, 5 EU/mL, 0,5 EU/mL, 0,05 EU/mL e 0,005 EU/mL, para calcular a quantidade de endotoxina presente em cada amostra dos

canais radiculares. Para o teste 100µL dessas 5 concentrações, do blank (água apirogênica) e das amostras coletadas dos canais, foram adicionadas em duplicata na placa de 96 poços. A placa foi incubada a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 10 min em um leitor cinético-QCL conectado a um computador usando o software WinKQCL (Lonza). Por fim, 100µL do reagente cromogênico foi adicionado a cada poço e a absorbância (405 nm) foi lida e monitorada continuamente pelo software do leitor de placas KQCL, que calculou automaticamente a correlação linear log/log entre os tempo de reação de cada solução padrão e a respectiva concentração da endotoxina^{8,20}.

Unidades formadoras de colônias (UFC/mL)

Após a coleta, as pontas de papel foram transferidas para microtubos^{24,25} contendo 1mL de caldo RCM (Reinforced Clostridial Medium, Difco, Detroit, EUA). Em uma câmara de anaerobiose os microtubos foram agitados em vórtex por 10s, e 100µL do conteúdo foi transferido para outros microtubos com 900µL de RCM até atingir uma concentração de 10^{-4} . Em seguida, 50µL das diluições foram semeadas em placas de Petri com ágar RCM suplementadas com 5% de sangue desfibrinado de carneiro (Laborclin, São José do Rio Preto, SP, Brasil) que foram incubadas em câmara anaeróbica a 37°C por 7 dias para contagens subsequentes de UFC/mL.

Avaliação antimicrobiana por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL)

Após exposição aos protocolos de irrigação e as coletas supracitadas, os espécimes foram seccionados longitudinalmente em Isomet (Buehler, IL, EUA), tratados com EDTA 17% por 3 min e lavados com solução salina esterilizada para remover a *smear layer* resultante do procedimento de corte^{21,23}. Os espécimes foram então corados por 15 min em ambiente escuro com 20µL do kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD™ BacLight (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). Este kit contém o corante SYTO 9™ Green Stain, que cora bactérias viáveis, e Propidium Iodide Red Stain™, que cora as bactérias mortas. As amostras foram examinadas com um microscópio confocal Leica TCS-SPE (Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Alemanha) em aumento de 40x, tamanho de passo de 1µm de profundidade e uma resolução de 1024x1024 pixels. Foram obtidas oito imagens sequenciais dos espécimes: 4 na porção superficial e 4 na porção profunda em relação ao canal principal, totalizando 80 imagens de cada grupo, incluindo os controles positivos. Isso permitiu a visualização de todas as extensões de túbulos dentinários

contaminados desde o canal radicular principal até o cimento. As imagens adquiridas foram fragmentadas usando o software Leica Application Suite-Advanced Fluorescence (LAS AF, Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Alemanha) e convertidas para o formato TIFF. Essas imagens foram exportadas para o software bioImage_L v21 para quantificar a porcentagem de bactérias viáveis (coradas de verde) e não viáveis (coradas de vermelho).

Análise estatística

A normalidade dos dados foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk. As contagens de UFC/mL foram transformadas em Log antes da análise estatística. O efeito antimicrobiano sobre *F. nucleatum* e sua endotoxina é expresso em porcentagem de redução, calculada para cada grupo da seguinte forma: $(S1/S2 \times 100)^{26}$. As comparações intragrupos e intergrupos foram realizadas pelo teste de Wilcoxon e Kruskal-Wallis, respectivamente, seguido pelo pós-teste de Dunn. O teste de Mann-Whitney foi realizado para comparação entre os protocolos de irrigação, CI ou PUI. O software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad San Diego, CA, EUA) foi utilizado para a análise, adotando-se um nível de significância de 5%.

Resultados

Quantificação de endotoxinas (LPS)

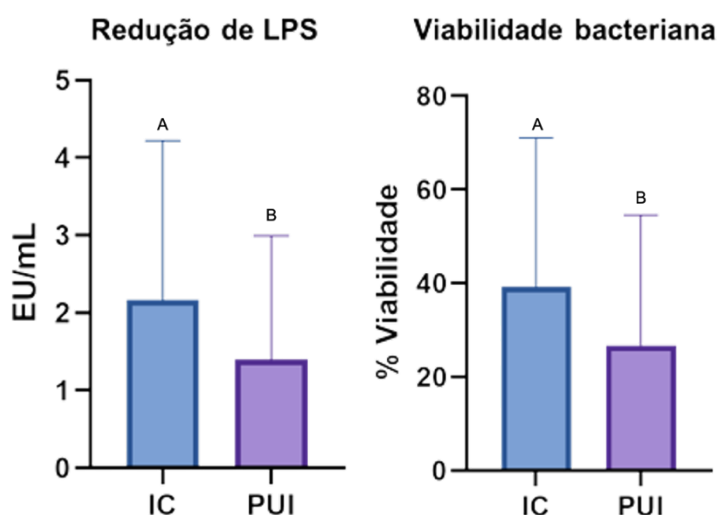
O ensaio LAL indicou a presença de LPS em todas as amostras da primeira coleta (S1). A irrigação final (S2) reduziu o número de EU/mL em todos os grupos ($p < .05$) com relação as coletas iniciais (Tabela 1). Em S2, os menores níveis foram encontrados nos grupos irrigados com NaOCl 2,5%, com e sem a PUI, e NaOCl 2,5% + $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 0,14% + PUI em comparação com a CLX 2%, mesmo agitada ($p < .05$). Os maiores percentuais de redução foram atribuídos aos grupos irrigados com NaOCl 2,5% com e sem a PUI (99% e 98.3%, respectivamente) seguido do EEP 10% + PUI (97.9%) e NaOCl 2,5% + $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 0,14% + PUI (97.3%), sem diferenças estatísticas ($p > .05$). Os grupos com a PUI mostraram resultados estatisticamente superiores a IC (Figura 1).

Tabela 1 - Mediana (Me), mínimo e máxima (Min-Max) EU/mL e redução percentual de LPS (%) dos canais radiculares para cada grupo experimental.

Grupos	Antes da irrigação (S1)	Depois da irrigação (S2)	Redução (%)
	(EU/mL)	(EU/mL)	Me (Min-Max)
	Me (Min-Max)	Me (Min-Max)	
Grupos IC			
NaOCl 2,5%	39.00 (17.2 – 50.9) ^{Aa}	0.50 (0.5 – 1.3) ^{ABb}	98.30 (97.0 – 99.0) ^{AB}
CHX 2%	55.90 (12.7 – 84.2) ^{Aa}	3.67 (2.4 – 8.3) ^{Db}	92.20 (65.9 – 96.1) ^C
NaOCl 2,5% + Ca(OH) ₂ 0,14%	26.10 (10.4 – 81.6) ^{Aa}	0.77 (0.5 – 4.4) ^{ABCDb}	93.40 (83.0 – 99.3) ^{BC}
EEP 10%	30.80 (19.0 – 89.5) ^{Aa}	1.49 (0.9 – 2.6) ^{BCDb}	94.60 (90.0 – 98.8) ^{BC}
Grupos PUI			
NaOCl 2,5%	50.00 (50.0 – 76.7) ^{Aa}	0.50 (0.5 – 0.85) ^{Ab}	99.00 (98.3 – 99.3) ^A
CHX 2%	25.00 (20.0 – 90.0) ^{Aa}	3.40 (0.7 – 5.7) ^{CDb}	93.00 (65.7 – 94.9) ^C
NaOCl 2,5% + Ca(OH) ₂ 0,14%	22.80 (12.3 – 50.0) ^{Aa}	0.50 (0.5 – 0.7) ^{ABb}	97.30 (95.8 – 99.0) ^{AB}
EEP 10%	34.40 (15.2 – 50.0) ^{Aa}	0.69 (0.6 – 1.1) ^{ABCb}	97.9 (96.0 – 98.9) ^{ABC}

Comparação pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunn ($p < 0,05$). Diferentes letras maiúsculas sobrescritas em uma coluna representam diferenças significativas entre os grupos; diferentes letras minúsculas sobrescritas em uma linha representam diferenças significativas dentro dos grupos

Figura 1: Gráficos comparativos dos grupos submetidos à irrigação convencional versus a PUI, em relação à redução de endotoxina (LPS) e porcentagem de viabilidade bacteriana intratubular. Diferentes letras sobrescritas indicam diferença entre os grupos pelo teste de Mann Whitney ($p < .05$).



Avaliação microbiológica

As coletas iniciais (S1) revelaram o crescimento de bactérias viáveis em 100% das amostras recuperadas dos canais radiculares contaminados. Todos os protocolos e irrigantes testados foram eficazes em reduzir a carga microbiana (UFC/mL) em S2 com relação as amostras iniciais ($p < .05$). Ambas as técnicas de irrigação, IC ou PUI, levaram a uma eliminação semelhante de UFC/mL ($p > .05$). O mesmo percentual de redução foi observado para todos os grupos ($p > .05$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Mediana (Me), mínimo e máxima (Min-Max) de UFC/mL e redução percentual de *F. nucleatum* (%) dos canais radiculares para cada grupo experimental.

Grupos	Antes da irrigação (S1)	Depois da irrigação (S2)	Redução (%)
	(Log ₁₀ UFC/mL)	(Log ₁₀ UFC/mL)	Me (Min-Max)
	Me (Min-Max)	Me (Min-Max)	
Grupos IC			
NaOCl 2,5%	5.78 (5.3 - 7.0) ^{Aa}	0.00 (0.0 - 0.0) ^{Bb}	100.0 (100.0 - 100.0)*
CHX 2%	6.25 (5.6 - 7.0) ^{Aa}	0.00 (0.0 - 0.0) ^{Bb}	100.0 (100.0 - 100.0)*
NaOCl 2,5% + Ca(OH) ₂ 0,14%	6.60 (5.3 - 7.2) ^{Aa}	0.00 (0.0 - 0.0) ^{Bb}	100.0 (100.0 - 100.0)*
EEP 10%	6.71 (5.6 - 7.3) ^{Aa}	0.00 (0.0 - 0.0) ^{Bb}	100.0 (100.0 - 100.0)*
Grupos PUI			
NaOCl 2,5%	5.78 (5.3 - 7.0) ^{Aa}	0.00 (0.0 - 0.0) ^{Bb}	100.0 (100.0 - 100.0)*
CHX 2%	6.30 (5.6 - 7.3) ^{Aa}	0.00 (0.0 - 0.0) ^{Bb}	100.0 (100.0 - 100.0)*
NaOCl 2,5% + Ca(OH) ₂ 0,14%	6.65 (5.6 - 7.3) ^{Aa}	0.00 (0.0 - 0.0) ^{Bb}	100.0 (100.0 - 100.0)*
EEP 10%	6.71 (5.6 - 7.3) ^{Aa}	0.00 (0.0 - 0.0) ^{Bb}	100.0 (100.0 - 100.0)*

Comparação pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunn ($p < 0,05$). Diferentes letras maiúsculas sobrescritas em uma coluna representam diferenças significativas entre os grupos; diferentes letras minúsculas sobrescritas em uma linha representam diferenças significativas dentro dos grupos. *Sem diferença estatisticamente significativa.

Avaliação da descontaminação intratubular (MCVL)

Os grupos experimentais apresentaram valores de viabilidade menores do que o grupo controle positivo ($p < .05$). A comparação entre grupos mostrou que nas áreas superficiais e profundas a irrigação com NaOCl 2,5%, independente da técnica, produziu uma porcentagem menor de bactérias viáveis ($p < .05$). Não foram observadas diferenças significativas nas comparações intragrupos quanto as profundidades (superficial x profundo) (Tabela 3). A ativação ultrassônica produziu valores de viabilidade bacteriana inferiores à irrigação convencional (Figura 1), com diferenças significativas ($p < .05$) entre as soluções alternativas e os seus respectivos não ativados. Além disso, tiveram desempenho estatisticamente similar ao NaOCl 2,5% e CLX 2%. Imagens representativas da microscopia confocal de varredura a laser dos grupos são mostradas nas Figuras 2A-I e 3A-I.

Tabela 3 - Porcentagem mediana (intervalo de confiança de 95%) de bactérias viáveis nos túbulos dentinários após o protocolo de irrigação de cada grupo.

Grupos	Total	Superficial	Profundo
Controle	75.50 (12.1 – 99.4) ^{Ea}	73.66 (18.9 – 98.9) ^{Aa}	70.00 (3.3 – 86.6) ^{Ca}
Grupos IC			
NaOCl 2,5%	9.72 (0.6 – 97.7) ^{ABa}	6.62 (0.3 – 90.8) ^{Ba}	8.95 (0.8 – 95.9) ^{ABa}
CHX 2%	35.01 (0.0 – 98.9) ^{BCDa}	28.66 (0.0 – 97.84) ^{Ba}	40.24 (0.0 – 98.9) ^{ABa}
NaOCl 2,5% + Ca(OH) ₂ 0,14%	45.48 (0.7 – 94.2) ^{CDa}	42.69 (0.7 – 93.9) ^{Ba}	52.98 (0.1 – 94.2) ^{Ba}
EEP 10%	59.91 (0.0 – 99.9) ^{Da}	30.03 (0.0 – 94.3) ^{Ba}	65.57 (0.0 – 93.6) ^{Ba}
Grupos PUI			
NaOCl 2,5%	7.78 (0.8 – 95.9) ^{Aa}	9.96 (0.6 – 93.2) ^{Ba}	8.35 (0.1 – 97.7) ^{Aa}
CHX 2%	23.80 (0.1 – 98.6) ^{ABCa}	21.08 (0.6 – 91.5) ^{Ba}	32.59 (0.1 – 98.6) ^{ABa}
NaOCl 2,5% + Ca(OH) ₂ 0,14%	18.41 (0.2 – 88.5) ^{ABa}	14.88 (0.2 – 80.0) ^{Ba}	27.62 (1.2 – 88.5) ^{ABa}
EEP 10%	14.61 (0.2 – 99.9) ^{ABa}	12.87 (1.3 – 96.2) ^{Ba}	16.90 (0.2 – 99.9) ^{ABa}

Comparação pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunn ($p < 0,05$). Diferentes letras maiúsculas sobrescritas em uma coluna representam diferenças significativas entre os grupos; diferentes letras minúsculas sobrescritas em uma linha representam diferenças significativas dentro dos grupos.

Figura 2: Imagens MCVL representativas das áreas superficiais dos túbulos dentinários (perto do canal radicular). (A) NaOCl 2,5% + IC; (B) CLX 2% + IC; (C) NaOCl 2,5% + Ca(OH)₂ 0,14% + IC; (D) EEP 10% + IC; (E) NaOCl 2,5% + PUI; (F) CLX 2% + PUI; (G) NaOCl 2,5% + Ca(OH)₂ 0,14% + PUI; (H) EEP 10% + PUI; (I) C⁺. Células viáveis coradas em verde e as não viáveis em vermelho. Ampliação: 40x. Barras: 20,0 µm.

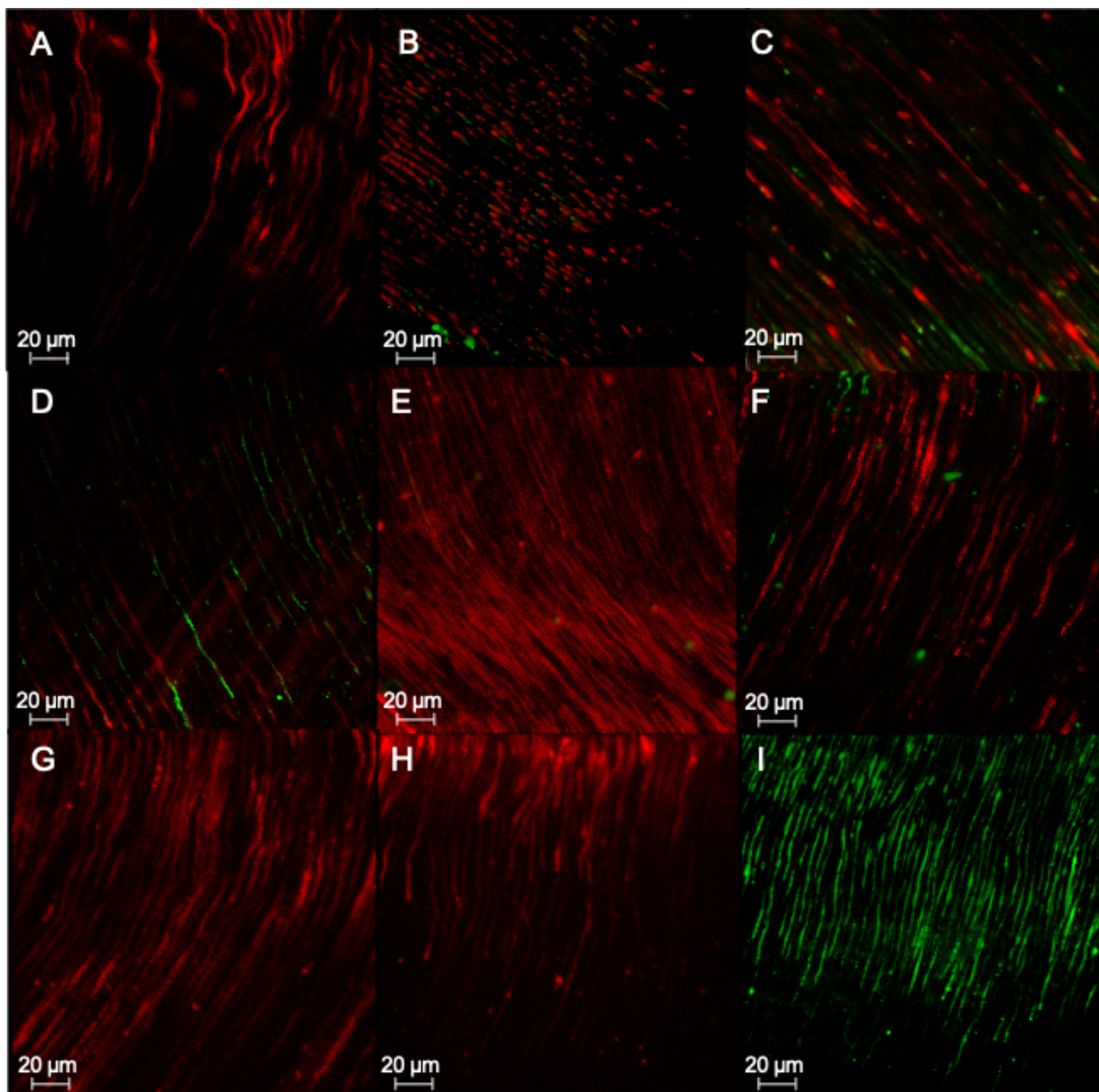
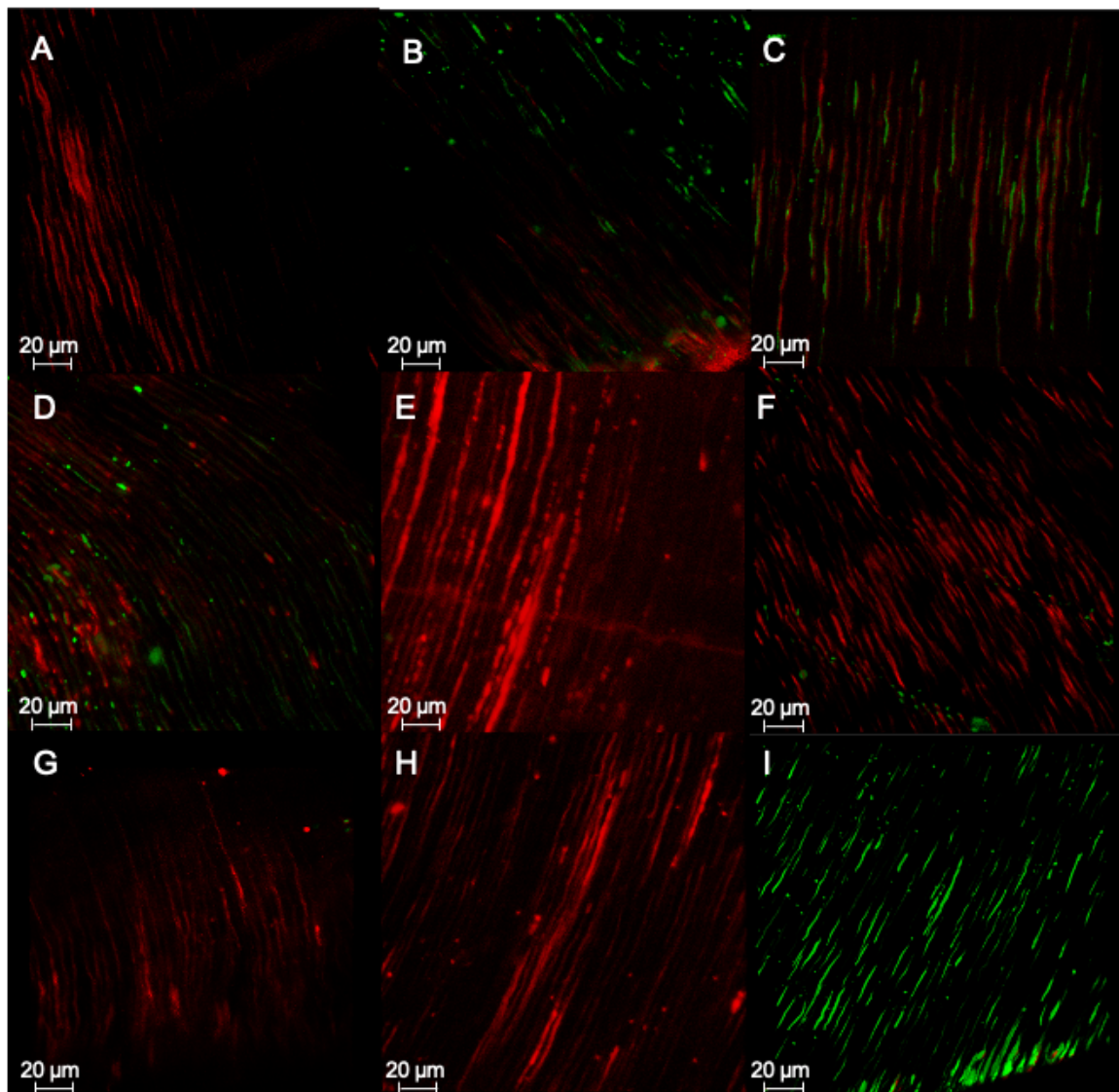


Figura 3: Imagens MCLV representativas das áreas profundas dos túbulos dentinários (longe do canal radicular). (A) NaOCl 2,5% + IC; (B) CLX 2% + IC; (C) NaOCl 2,5% + Ca(OH)₂ 0,14% + IC; (D) EEP 10% + IC; (E) NaOCl 2,5% + PUI; (F) CLX 2% + PUI; (G) NaOCl 2,5% + Ca(OH)₂ 0,14% + PUI; (H) EEP 10% + PUI; (I) C⁺. Células viáveis coradas em verde e as não viáveis em vermelho. Ampliação: 40x. Barras: 20,0 µm.



Discussão

Considerando os resultados do presente estudo, a hipótese nula foi parcialmente rejeitada, pois houveram diferenças significativas entre as técnicas de irrigação quanto à redução da viabilidade bacteriana intratubular e dos níveis de LPS, porém não entre todas as soluções investigadas.

O critério de seleção do *F. nucleatum* para a contaminação dos canais foi baseado não só pela sua prevalência em infecções primárias, mas também, pela toxicidade do seu LPS^{30,31}. Embora um biofilme monoespécie tenha sido empregado no presente trabalho, este método foi pensado como maneira preliminar de avaliar a resistência e viabilidade de um anaeróbio estrito, confirmada pelo controle positivo (Figuras 2I e 3I), à sequência de centrifugações propostas pela contaminação intratubular antes de associá-lo a outras espécies. Até o momento, não há estudos acerca da descontaminação intratubular promovida por irrigantes utilizando *F. nucleatum* como microrganismo patogênico.

Nossos resultados demonstraram que todos os irrigantes e técnicas utilizados foram capazes de eliminar o *F. nucleatum* do interior dos canais radiculares conforme demonstrado pelos resultados da contagem de UFC/mL (Tabela 2), em concordância com estudos prévios^{12,13,28}. A provável razão para esses resultados se deve ao fato de que as coletas foram realizadas apenas do canal radicular principal com cones de papel absorvente, que são capazes de coletar bactérias nesta área somente e têm dificuldade de acesso a regiões estritas como os túbulos dentinários. Portanto, os dados de contagem de UFC/mL obtidos do canal radicular principal devem ser interpretados com cautela.

No presente trabalho houve uma redução drástica dos níveis de endotoxina em todos os grupos ($p < .05$), em concordância com Aveiro et al.¹² que observaram resultados semelhantes na comparação da agitação ultrassônica com a irrigação manual, clinicamente. Já Nakamura et al.³² não observaram diferença entre PUI e IC na redução do LPS e, esse contraste se deve provavelmente a diferença do volume utilizado na irrigação, além da microbiota dos canais radiculares. Os protocolos finais de irrigação propostos foram eficazes em erradicar o *F. nucleatum*, mas ainda assim, suas endotoxinas permaneceram no sistema de canais radiculares (SCR). Isso pode ser explicado, pois a morte de bactérias Gram-negativas leva à liberação de LPS, que

pode aderir às paredes dentinárias e se difundir pelos túbulos dentinários³³, dificultando a sua remoção pelo fluxo da irrigação convencional. No entanto, a PUI pode favorecer a sua eliminação^{11,12}.

Nesse estudo, os níveis de endotoxinas inicialmente encontrados nos canais radiculares contaminados variou de 22.80 EU/mL a 55.90 EU/mL. Após a irrigação esses valores decaíram para uma faixa de 0.50 EU/mL a 3.67 EU/mL, inferiores aos encontrados em casos sintomáticos de infecção primária conforme demonstrado por estudos anteriores^{3,6,34}, que exibiram valores médios de LPS variando de 7,49 EU/mL a 19,10 EU/mL. Apesar de não promoverem a erradicação da endotoxina, as soluções e técnicas empregadas foram capazes de reduzir os seus níveis abaixo daqueles compatíveis ao desenvolvimento de sintomatologia clínica e destruição óssea periapical tendo importante contribuição no processo de reparo dos tecidos perirradiculares.

Os espécimes tratados com NaOCl 2,5% + PUI tiveram a maior porcentagem de redução de endotoxinas (99%), embora nenhum irrigante ou protocolo tenha conseguido eliminar por completo a mesma dos canais. Resultado similar foi observado anteriormente ao comparar o NaOCl com e sem a PUI¹³. A ativação ultrassônica provavelmente melhorou a eficácia da solução irrigadora, através do estresse de cisalhamento em células bacterianas causado pela corrente acústica e cavitação¹⁹. O NaOCl, assim como a CLX, reduz o nível de endotoxinas, mas não as elimina completamente^{9,11,16}, indo de encontro aos presentes achados.

O EEP 10% quando agitado mostrou-se igualmente eficaz ao NaOCl 2,5% podendo ser considerado como uma alternativa a ser utilizada durante a irrigação final. Atribui-se este resultado não somente à composição e eficácia antimicrobiana da própolis^{35,36}, mas também, ao efeito sinérgico da ativação ultrassônica. Valera et al.¹⁸ observaram uma redução significativa dos níveis de LPS nos canais radiculares quando a própolis foi utilizada como irrigante, em concordância com os presentes achados. A ação da própolis sobre o LPS também foi demonstrada por Maekawa et al.²⁵ com resultado semelhante.

O uso do hidróxido de cálcio como irrigante endodôntico tem mostrado efeito sobre o LPS no SCR^{2,9,37}. Esses resultados estão relacionados principalmente à capacidade do hidróxido de cálcio de neutralizar as propriedades biológicas do LPS³⁸. Neste estudo, a irrigação dos canais radiculares com NaOCl 2,5% + Ca(OH)₂ 0,14%, mostrou potencial desintoxicante, independente da técnica utilizada, reduzindo a

quantidade de endotoxina de forma similar ao NaOCl 2,5% e EEP 10%, superior a CLX 2%. O uso *in vitro* de NaOCl 2,5% + Ca(OH)₂ 0,14%, como irrigante foi relatado por Carvalho et al.¹⁷, que observaram excelente resultado em comparação ao NaOCl 2,5% sozinho, quando usado durante o preparo biomecânico. Em contrapartida, no presente estudo, houve resultado estatisticamente similar entre ambos, o que provavelmente pode ser atribuído a diferença da microbiota e ausência da ação mecânica do instrumento em conjunto com a irrigação.

Na análise de MCVL, todos os grupos experimentais após o tratamento mostraram um número reduzido de bactérias viáveis na dentina infectada. No regime de IC, o NaOCl 2,5% produziu os menores percentuais de viabilidade, o que confirma sua atividade antimicrobiana e anti-biofilme. Rodrigues et al.³⁹ observaram resultados similares com o emprego do NaOCl 2,5% em relação à atividade antimicrobiana intratubular quando comparado à clorexidina 2%. Para os irrigantes PUI-ativados, maior redução foi observada em comparação a IC, em concordância com estudos anteriores^{40,41}, onde a PUI foi responsável pela penetração em maior profundidade do irrigante.

Dentre os grupos ativados, o menor percentual de viabilidade total, superficial e profunda foi observado para o NaOCl 2,5%, indo de encontro aos achados de Harrison et al.⁴² que avaliaram a ação antimicrobiana intratubular do NaOCl PUI-ativado. Ainda de acordo com nossos achados, tanto o EEP 10% quanto o NaOCl 2,5% + Ca(OH)₂ 0,14%, foram eficazes na redução da viabilidade bacteriana intradentinária. Ferreira et al.³⁶ já havia demonstrado a habilidade da própolis em eliminar *F. nucleatum*, fato esse que pode explicar os resultados desse grupo. Apesar da eficácia do NaOCl + Ca(OH)₂ na descontaminação intratubular, nossos resultados mostraram que o NaOCl 2,5% foi melhor sozinho do que em conjunto com o Ca(OH)₂, tornando o emprego dessa associação, desvantajosa nesse cenário. No entanto não existem, até o momento, investigações que corroborem nossos resultados.

Até onde sabemos, não há estudos avaliando o efeito da PUI em soluções como a própolis e a água de cal na descontaminação intratubular e redução do LPS, sobretudo, em comparação à IC, sendo portanto, o presente estudo inédito. Os poucos estudos *in vitro* que avaliaram o efeito do NaOCl e da CLX sobre endotoxina concordam que estes não são tão eficazes sobre a mesma. No entanto, como são irrigantes comumente utilizados na prática endodôntica, é interessante a busca por

protocolos e alternativas que sejam coadjuvantes ao seu uso e potencializem essa desintoxicação. Além disso, foi utilizado um microrganismo tipicamente endodôntico apesar da dificuldade do seu cultivo, diferindo dos demais trabalhos que fazem uso de endotoxinas comerciais de *Eschericia coli*.

As soluções alternativas propostas quando combinadas à PUI foram tão eficazes quanto o NaOCl, e superior a CLX tanto na redução dos níveis de LPS quanto da microbiota intratubular, ressaltando a importância da agitação ultrassônica na potencialização da ação antimicrobiana do fármaco e no seu alcance em profundidade através dos túbulos dentinários. No presente trabalho, a ativação ultrassônica foi mais significativa para EEP 10% e NaOCl 2,5% + Ca(OH)₂ 0,14% do que para as substâncias convencionais (Tabela 3).

De forma geral todas as soluções testadas foram eficazes sobre o *F. nucleatum* e sua endotoxina, sendo o emprego da PUI benéfico para todas elas. As soluções alternativas tiveram seu desempenho melhorado pela ativação ultrassônica tanto na descontaminação intratubular quanto na redução do LPS. Apesar da associação NaOCl 2,5% + Ca(OH)₂ 0,14% apresentar bons resultados, o NaOCl 2,5% foi melhor quando utilizado sozinho. Em todas as análises, o EEP 10% associado a PUI teve a mesma ação antimicrobiana e anti-LPS que a solução de NaOCl 2,5%.

Agradecimentos

Este estudo foi parcialmente financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Os autores negam qualquer conflito de interesse.

Referências

1. Kakehashi S, Stanley HF, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1965;20:340-9. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(65\)90166-0](https://doi.org/10.1016/0030-4220(65)90166-0).
2. Oliveira LD, Carvalho CA, Carvalho AS, et al. Efficacy of endodontic treatment for endotoxin reduction in primarily infected root canals and evaluation of cytotoxic effects. J Endod 2012;38:1053-7. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.04.015>.
3. Gomes BP, Endo MS, Martinho FC. Comparison of endotoxin levels found in primary and secondary endodontic infections. J Endod. 2012;38(8):1082-1086. doi:10.1016/j.joen.2012.04.021

-
4. Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. *J Endod* 1975;32:293-5. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2006.02.008>.
 5. Leonardo MR, Silva RA, Assed S, Nelson-Filho P. Importance of bacterial endotoxin (LPS) in endodontics. *J Appl Oral Sci*. 2004;12(2):93-98. <https://doi.org/10.1590/s1678-77572004000200002>.
 6. Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, et al. Correlation between clinical/radiographic features and inflammatory cytokine networks produced by macrophages stimulated with endodontic content. *J Endod* 2012;38:740-745.
 7. Lucisano MP, Nelson-Filho P, Silva PA, et al. Role of endotoxin in the etiology of periapical lesions: molecular mechanisms involved in endotoxin's recognition and cell activation. *Rev Gaúch Odontol* 2014;62:289-298.
 8. Machado FP, Khoury RD, Toia CC, et al. Primary versus post-treatment apical periodontitis: microbial composition, lipopolysaccharides and lipoteichoic acid levels, signs and symptoms. *Clin Oral Investig* 2020;24:3169-3179. <https://doi.org/10.1007/s00784-019-03191-6>.
 9. Oliveira LD, Jorge AO, Carvalho CA, et al. *In vitro* effects of endodontic irrigants on endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;104:135–42.
 10. Endo MS, Martinho FC, Zaia AA, et al. Quantification of cultivable bacteria and endotoxin in post-treatment apical periodontitis before and after chemo-mechanical preparation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:2575-2583. <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1598-6>.
 11. Gomes BP, Martinho FC, Vianna ME. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. *J Endod* 2009;35:1350-1353. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.06.011>.
 12. Aveiro E, Chiarelli-Neto VM, de-Jesus-Soares A, et al. Efficacy of reciprocating and ultrasonic activation of 6% sodium hypochlorite in the reduction of microbial content and virulence factors in teeth with primary endodontic infection. *Int Endod J* 2020;53:604-618. <https://doi.org/10.1111/iej.13261>.
 13. Abu Hasna A, Pereira Da Silva L, Pelegriini FC, et al. Effect of sodium hypochlorite solution and gel with/without passive ultrasonic irrigation on *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and their endotoxins. *F1000Res* 2020;9:642. <https://doi.org/10.12688/f1000research.24721.1>.
 14. Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, et al. Irrigation in endodontics. *Br Dent J* 2014;216:299-303. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2014.204>.
 15. Gründling GL, Melo TA, Montagner F, et al. QMix® irrigant reduces lipopolysaccharide (LPS) levels in an *in vitro* model. *J Appl Oral Sci* 2015;23:431-435. <https://doi.org/10.1590/1678-775720140488>.

16. Neelakantan P, Herrera DR, Pecorari VGA, et al. Endotoxin levels after chemomechanical preparation of root canals with sodium hypochlorite or chlorhexidine: a systematic review of clinical trials and meta-analysis. *Int Endod J*. 2019;52:19-27. <https://doi.org/10.1111/iej.12963>.
17. Carvalho AS, Oliveira LD, Cardoso FG, et al. Limewater and Polymyxin B Associated with NaOCl for Endotoxin Detoxification in Root Canal with Necrotic Pulp. *Braz Dent J* 2016;27:573-577. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201600934>
18. Valera MC, da Rosa JA, Maekawa LE, et al. Action of propolis and medications against *Escherichia coli* and endotoxin in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;110:70-4. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2010.01.029>.
19. 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;40:415-426. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2007.01243.x>.
20. Matos FS, Khoury RD, Carvalho CAT, et al. Effect of EDTA and QMIX Ultrasonic Activation on the Reduction of Microorganisms and Endotoxins in Ex Vivo Human Root Canals. *Braz Dent J* 2019;30:220-226. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201902470>
21. Andrade FB, Arias MP, Maliza AG, 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.
22. Csako G, Elin RJ, Hochstein HD, et al. Physical and biological properties of U.S. standard endotoxin EC after exposure to ionizing radiation. *Infect Immun* 1983;41:190-6. <https://doi.org/10.1128/iai.41.1.190-196.1983>.
23. Ma J, Wang Z, Shen Y, et al. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *J Endod* 2011;37:1380-1385.
24. Martinho FC, Gomes BP. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. *J Endod* 2008;34:268-272. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.11.015>.
25. Maekawa LE, Valera MC, Oliveira LD, et al. Effect of Zingiber officinale and propolis on microorganisms and endotoxins in root canals. *J Appl Oral Sci* 2013;21:25-31.
26. Ferrer-Luque CM, Bejarano I, Ruiz-Linares M, et al. Reduction in *Enterococcus faecalis* counts: a comparison between rotary and reciprocating systems. *Int Endod J* 2014;47:380-6. <https://doi.org/10.1111/iej.12158>.

27. Soriano de Souza CA, Teles RP, Souto R, et al. Endodontic therapy associated with calcium hydroxide as an intracanal dressing: microbiologic evaluation by the checker board DNA-DNA hybridization technique J Endod 2005;31:79-83.
28. Al-Madi EM, Almohaimede AA, Al-Obaida MI, et al. Comparison of the Antibacterial Efficacy of Commiphora molmol and Sodium Hypochlorite as Root Canal Irrigants against *Enterococcus faecalis* and *Fusobacterium nucleatum*. Evid Based Complement Alternat Med 2019;4:6916795.
29. Brennan CA, Garrett WS. *Fusobacterium nucleatum* - symbiont, opportunist and oncobacterium. Nat Rev Microbiol 2019;17:156-166. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0129-6>.
30. Horiba N, Maekawa Y, Matsumoto T, et al. A study of the distribution of endotoxin in the dentinal wall of infected root canals. J Endod. 1990;16(7):331-4. doi: 10.1016/S0099-2399(06)81944-8.
31. Gomes BP, Endo MS, Martinho FC. Comparison of endotoxin levels found in primary and secondary endodontic infections. J Endod. 2012;38(8):1082-6. doi: 10.1016/j.joen.2012.04.02.
32. Nakamura VC, Pinheiro ET, Prado LC, et al. Effect of ultrasonic activation on the reduction of bacteria and endotoxins in root canals: a randomized clinical trial. Int Endod J 2018;51:12-22. <https://doi.org/10.1111/iej.12783>
33. Oliveira LD, Carvalho CA, Valera MC, et al. Diffusion ability of endotoxin through dentinal tubules. Braz Oral Res 2005; 91:5-10.
34. Gabrielli ES, Lima AR, Francisco PA, et al. Comparative analysis of bacterial content, levels of lipopolysaccharides and lipoteichoic acid in symptomatic and asymptomatic endodontic infections at different stages of endodontic treatment. Clin Oral Investig. 2022; 26(1):287-302. doi: 10.1007/s00784-021-03998-2.
35. Scazzocchio F, D'Auria FD, Alessandrini D, et al. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. Microbiol Res 2006;161:327-33.
36. Ferreira FB, Torres SA, Rosa OP, et al. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2007;104:709-16.
37. Oliveira LD, Leão MV, Carvalho CA, et al. *In vitro* effects of calcium hydroxide and polymyxin B on endotoxins in root canals. J Dent 2005;33:107-114. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2004.08.008>.
38. Leonardo MR, Silveira FF, Silva LA, et al. Calcium hydroxide root canal dressing. Histopathological evaluation of periapical repair at different time periods. Braz Dent J 2002;13:17-22.
39. Rodrigues CT, Andrade FB, Vasconcelos LRSM, et al. Antibacterial properties of silver nanoparticles as a root canal irrigant against *Enterococcus faecalis* biofilm and

infected dentinal tubules. Int Endod J 2018;51:901-911. <https://doi.org/10.1111/iej.12904>.

40. Vasconcelos LRSM, Midená RZ, Minotti PG, et al. Effect of ultrasound streaming on the disinfection of flattened root canals prepared by rotary and reciprocating systems. J Appl Oral Sci 2017;25:477-82. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2016-0358>.

41. Cuellar MRC, Velasquez-Espedilla EG, Pedrinha VF, et al. Can kinematics, file diameter, and PUI influence the intracanal decontamination and apical bacterial extrusion? Braz Oral Res 2020;35:e003.

42. Harrison AJ, Chivatxaranukul P, Parashos P, et al. The effect of ultrasonically activated irrigation on reduction of *Enterococcus faecalis* in experimentally infected root canals. Int Endod J 2010;43:968-77. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2010.01715.x>.

3

Referências

REFERÊNCIAS

AHMAD, M.; PITTFORD, T.R.; CRUM, L.A. Ultrasonic debridement of root canals: acoustic streaming and its possible role. **J Endod**, v.14, p. 490–9, 1987.

AMANO, A. Bacterial adhesins to host components in periodontitis. **Periodontol** **2000**, v. 52, n. 1, p. 12-37, 2010.

AVEIRO, E, *et al.* Efficacy of reciprocating and ultrasonic activation of 6% sodium hypochlorite in the reduction of microbial content and virulence factors in teeth with primary endodontic infection. **Int Endod J**, [S.L.], v. 53, n. 5, p. 604-618, mai. 2019.

BASRANI, B.R. *et al.* Determination of 4-Chloroaniline and Its Derivatives Formed in the Interaction of Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine by Using Gas Chromatography. **J Endod**. v. 36, n. 2, p.312-314, fev. 2010.

BRAMANTE C.M. *et al.* Use of a 660-nm Laser to Aid in the Healing of Necrotic Alveolar Mucosa Caused by Extruded Sodium Hypochlorite: A Case Report. **J Endod**, v. 41, n. 11, p. 1899-1902. 2015.

CARDOSO, F.G. *et al.* Correlation between volume of apical periodontitis determined by cone-beam computed tomography analysis and endotoxin levels found in primary root canal infection. **J Endod**, [S.L.], v. 41, n. 7, p. 1015-1019, jul. 2015.

CARVALHO, A.S. *et al.* Limewater and Polymyxin B Associated with NaOCl for Endotoxin Detoxification in Root Canal with Necrotic Pulp. **Braz Dent J**, [S.L.], v. 27, n. 5, p. 573-577, out. 2016.

CAVALLI, D. *et al.* Effectiveness in the Removal of Endotoxins and Microbiological Profile in Primary Endodontic Infections Using 3 Different Instrumentation Systems: a randomized clinical study. **J Endod**, [S.L.], v. 43, n. 8, p. 1237-1245, ago. 2017.

DE SOUZA, C.A. *et al.* Endodontic therapy associated with calcium hydroxide as an intracanal dressing: microbiologic evaluation by checkerboard DNA-DNA hybridization technique. **J Endod**. V.31, n.2, p. 79-83, 2005.

DUQUE, J.A *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**, [S.L.], v. 43, n. 2, p. 326-331, fev. 2017.

ENDO, M.S. *et al.* Quantification of cultivable bacteria and endotoxin in post-treatment apical periodontitis before and after chemo-mechanical preparation. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, [S.L.], v. 31, n. 10, p. 2575-2583, mai. 2012.

FERREIRA, F.B. *et al.* Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 104, p. 709-16. 2007.

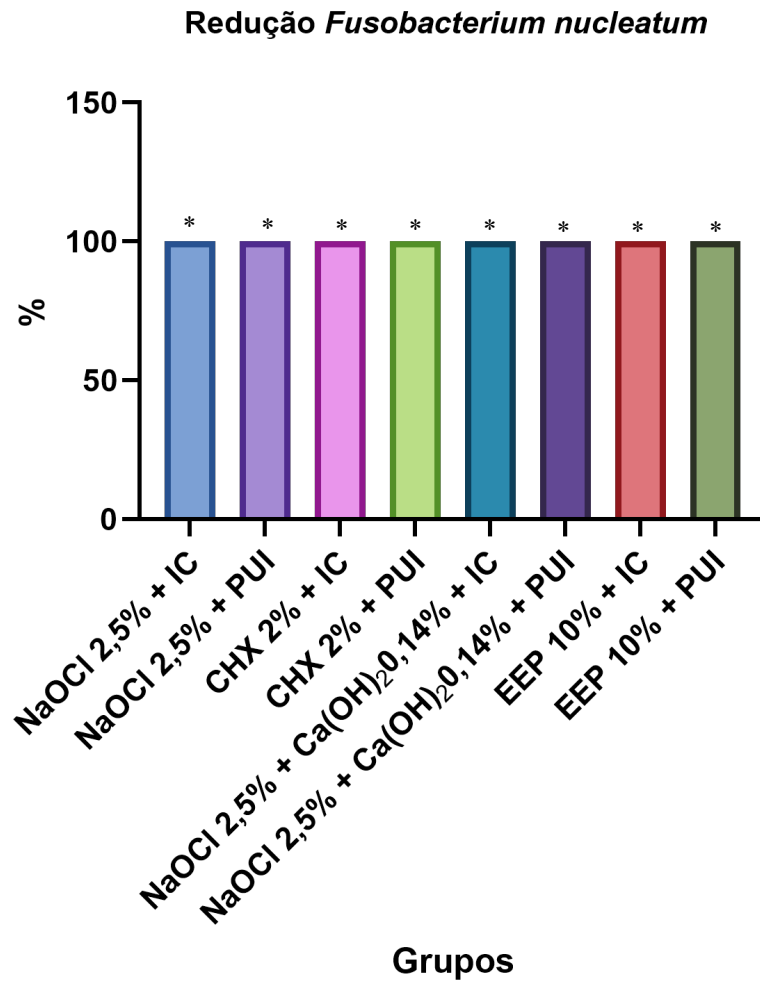
- GENERALI, L. *et al.* Effect of Different Irrigation Systems on Sealer Penetration into Dentinal Tubules. **J Endod**, [S.L.], v. 43, n. 4, p. 652-656, abr. 2017.
- GOMES, B.P.F.A.; MARTINHO, F.C.; VIANNA, M.E. Comparison of 2.5% Sodium Hypochlorite and 2% Chlorhexidine Gel on Oral Bacterial Lipopolysaccharide Reduction from Primarily Infected Root Canals. **J Endod**, [S.L.], v. 35, n. 10, p. 1350-1353, out. 2009.
- GRÜNDLING, G.L. *et al.* QMix® irrigant reduces lipopolysaccharide (LPS) levels in an in vitro model. **J Appl Oral Sci**, [S.L.], v. 23, n. 4, p. 431-435, ago. 2015.
- HAAPASALO, M. *et al.* Irrigation in endodontics. **Br Dent J**, v. 216, n. 6, p. 299-303, Mar, 2014. DOI: 10.1038/sj.bdj.2014.204
- HASNA, A.A. *et al.* Effect of sodium hypochlorite solution and gel with/without passive ultrasonic irrigation on *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and their endotoxins. **F1000Research**, [S.L.], v. 9, p. 642, 24 jun. 2020.
- HORIBA, N. *et al.* A study of the distribution of endotoxin in the dentinal wall of infected root canals. **J Endod**, v.16, n.7, p.331-4. 1990.
- IRALA, L.E.D. *et al.* Avaliação da formação de pigmento escuro quando da mistura da solução de hipoclorito de sódio, em diferentes concentrações, com digluconato de clorexidina a 0,2%. **Rev Sul-Bras Odontol**, [s.i], v.6, n.3, p.286-290, sep. 2009.
- JACINTO, R.C. *et al.* Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. **J Med Microbiol**, v. 54, p.777–83, 2005.
- JAHROMI, M.Z.; TOUBAYANI, H.; REZAEI, M. Propolis: a new alternative for root canal disinfection. **Iran Endod J**, [S.L.], v. 7, n. 3, p. 22-26, 21 jul. 2012.
- KAKEHASHI, S.; STANLEY, H.F.; FITZGERALD, R.J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 20, p. 340-9, 1965.
- LEE, S.J.; WU, M.K; WESSELINK, P.R. The effectiveness of syringe irrigation and ultrasonics to remove debris from simulated irregularities within prepared root canal walls. **Int Endod J**. v. 37, p. 672–8, 2004.
- LEONARDO, M.R. *et al.* Calcium hydroxide root canal dressing. Histopathological evaluation of periapical repair at different time periods. **Braz Dent J**. v.13, p. 17-22, 2002.
- LEONARDO, M.R. *et al.* Importance of bacterial endotoxin (LPS) in Endodontics. **J of Appl Oral Sci**. V. 12, p. 93-8, 2004.
- LUCISANO, M.P. *et al.* Role of endotoxin in the etiology of periapical lesions: molecular mechanisms involved in endotoxin's recognition and cell activation. **Rev Gaúch Odontol**. v.62, n.3, p. 289-298, out./dez., 2014.

- MACHADO, F.P. *et al.* Primary versus post-treatment apical periodontitis: microbial composition, lipopolysaccharides and lipoteichoic acid levels, signs and symptoms. **Clin Oral Investig**, [S.L.], p. 1-11, 13 jan. 2020.
- MAEKAWA, L.E. *et al.* Effect of Zingiber officinale and propolis on microorganisms and endotoxins in root canals. **J Appl Oral Sci**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 25-31, fev. 2013.
- MARTINHO, F.C. *et al.* Clinical investigation of the efficacy of chemomechanical preparation with rotary nickel-titanium files for removal of endotoxin from primarily infected root canals. **J Endod**, v. 36, n. 11, p. 1766-1769, 2010.
- MARTINHO, F.C. *et al.* Correlation between clinical/radiographic features and inflammatory cytokine networks produced by macrophages stimulated with endodontic content. **J Endod**, v.38, p.740–745, 2012.
- MENEZES, M.M. *et al.* In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. **Int Endod J**. v.37, p.311-9, 2004.
- MERGENHAGEN, S.E.; VARAH, E. Serologically specific lipopolysaccharides from oral Veillonella. **Arch Oral Biol**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 31-36, jan. 1963.
- NEELAKANTAN, P. *et al.* Endotoxin levels after chemomechanical preparation of root canals with sodium hypochlorite or chlorhexidine: a systematic review of clinical trials and meta-analysis. **Int Endod J**, [S.L.], v. 52, n. 1, p. 19-27, 3 jul. 2019.
- OLIVEIRA, L.D. *et al.* Diffusion ability of endotoxin through dentinal tubules. **Bras Oral Res**, v.19, n. 1, p. 5-10. 2005a.
- OLIVEIRA, L.D. *et al.* In vitro effects of calcium hydroxide and polymyxin B on endotoxins in root canals. **Journal Of Dentistry**, [S.L.], v. 33, n. 2, p. 107-114, fev. 2005b.
- OLIVEIRA, L.D. *et al.* In vitro effects of endodontic irrigants on endotoxins in root canals. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 104, p. 135–42. 2007.
- PEREIRA, T.C. *et al.* Intratubular decontamination ability and physicochemical properties of calcium hydroxide pastes. **Clin Oral Investig**, v. 23, n. 3, p. 1253-1262. 2019.
- PETERS, O. A. Current challenges and concepts in the preparation of root canal systems: a review. **J Endod**, v. 30, p. 559–567, 2004. DOI: 00004770-200408000-00001
- RODRIGUES, C.T. *et al.* Comparison of two methods of irrigant agitation in the removal of residual filling material in retreatment. **Braz Oral Res**, [S.L.], v. 31, p. 328-334, 18 Dez, 2017.

- SAKAMOTO, M. *et al.* Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. **Oral Microbiol Immunol**, v. 21, n. 2, p. 112-122. 2006.
- SCHEIN, B.; SCHILDER, H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. **J Endod**, v. 32, n.4, p. 293-5, 1975 DOI: 10.1016/S0099-2399(75)80244-5
- SIQUEIRA, J.F.; RÔÇAS, I. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. **J Endod**, v. 34, n. 11, p. 1291-301, 2008.
- SIQUEIRA, J.F.; RÔÇAS, I. The microbiota of acute apical abscesses. **J Dent Res**, v. 88, n.1, p. 61-65. 2009.
- VALERA, M.C. *et al.* Action of propolis and medications against *Escherichia coli* and endotoxin in root canals. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, [S.L.], v. 110, n. 4, p. 70-74, out. 2010.
- VAN DER SLUIS, L.W. *et al.* Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. **Int Endod J**. v.40, p.415-426, 2007.
- VIANNA, M.E. *et al.* In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, [S.,.], v. 97, n. 1, p. 79-84, jan. 2004.
- VIRDEE, S.S. *et al.* Efficacy of irrigant activation techniques in removing intracanal smear layer and debris from mature permanent teeth: a systematic review and meta-analysis. **Int Endod J**, [S.L.], v. 51, n. 6, p. 605-621, dez. 2017.
- ZEHNDER, M. Root canal irrigants. **J Endod**, v. 32, p. 389-398, 2006. DOI: 0.1016/j.joen.2005.09.014
- WELLER, R.N.; BRADY, J.M.; BERNIER, W.E. Efficacy of ultrasonic cleaning. **J Endod**, [S.L.], v. 6, n. 9, p. 740-743, set. 1980.

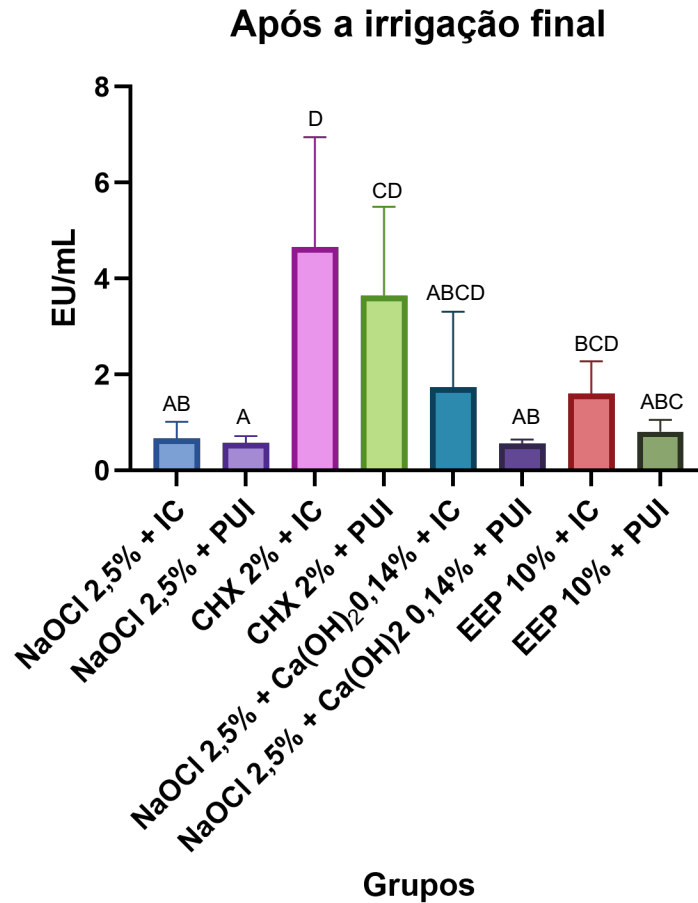
Apêndices

APÊNDICE A - Gráfico representativo do percentual médio de redução do *Fusobacterium nucleatum* nos canais radiculares após os protocolos finais de irrigação (S2) em relação à coleta inicial (S1). Análise de UFC/mL.



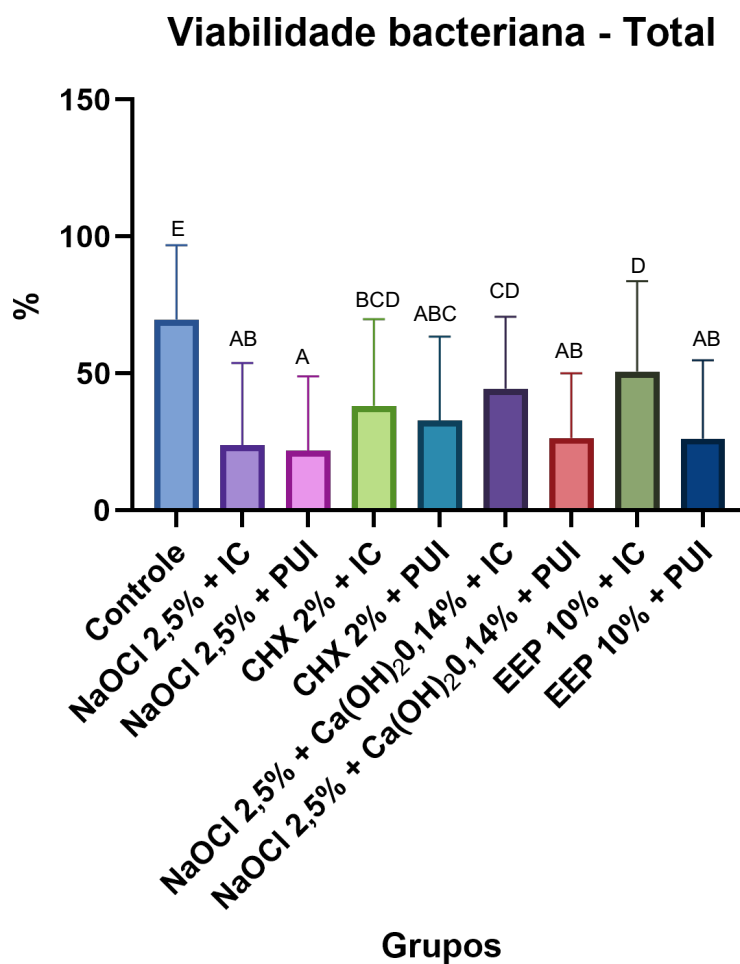
Comparação pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunn ($p < 0,05$). *Sem diferença estatisticamente significativa.

APÊNDICE B - Gráfico representativo do nível médio de endotoxina (LPS) após os protocolos finais de irrigação (S2). Análise do ensaio LAL.



Comparação pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunn ($p < 0,05$). Diferentes letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os grupos.

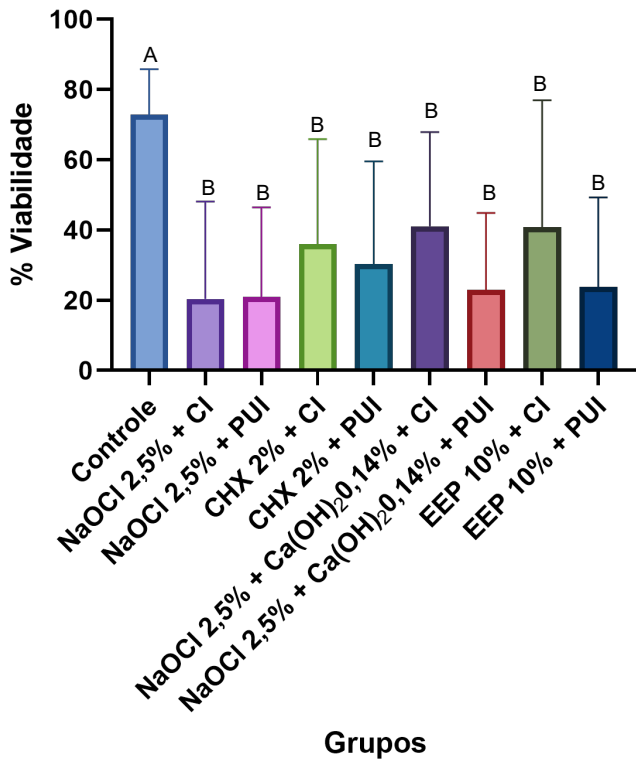
APÊNDICE C - Gráfico representativo da porcentagem das bactérias viáveis após os protocolos finais de irrigação (S2). Análise em MCVL.



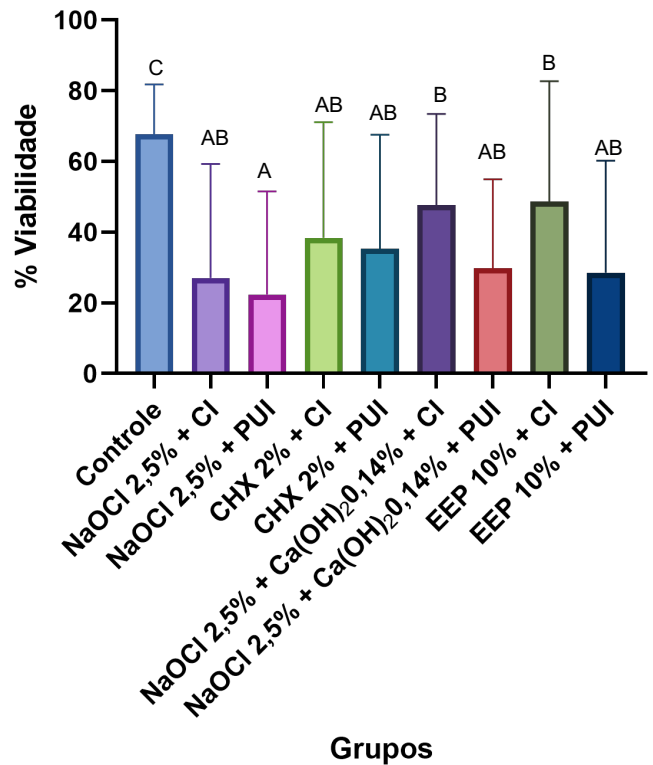
Comparação pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunn ($p < 0,05$). Diferentes letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os grupos.

APÊNDICE D - Gráficos representativos das porcentagens de bactérias viáveis nas regiões superficial e profunda em relação a luz do canal, após os protocolos finais de irrigação (S2). Análise no MCVL.

Viabilidade bacteriana - Superficial



Viabilidade bacteriana - Profundo



Comparação pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunn ($p < 0,05$). Diferentes letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os grupos.

Anexos

ANEXO A – Descrição da própolis verde utilizada

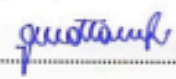
 O Apis-Brasil promovendo a Vida!	CERTIFICADO DE ANÁLISE DE PRODUTO ACABADO	CÓD: CA-CQ-010
	ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA	Versão: 04
		Página 1 de 1

Data de emissão	13/05/2022
Fabricante/SIF	Green Eucalypt Propolis LTDA / 3619
Produto	Extrato de Própolis Pastoso 80%
Lote Produto acabado	M509
Validade	07/23

RESULTADOS FÍSICO-QUÍMICOS

Análises	Especificação	Resultado	Conforme/Não conforme
Características organolépticas*	Característico	Característico	Conforme
Atividade de Oxidação	Máximo de 22 seg	00'03	Conforme
Compostos fenólicos	Mínimo de 5,0% (m/m)	10,2% m/m	Conforme
Compostos flavonoides	Mínimo de 0,50% (m/m)	3,4 % m/m	Conforme
Reação com acetato de chumbo	Positivo	Positivo	Conforme
Reação com hidróxido de sódio	Positivo	Positivo	Conforme
Extrato seco	Mínimo 70%	79,7 %	Conforme
Espectro de absorção UV-visível	Presença de picos entre 200 (m e 400 nm)	Valor do pico 320	Conforme
Umidade	Máximo 12%	7,12 % m/m	Conforme
Teor de cera	Máximo 25% (m/m)	3,2% m/m	Conforme
Cinzas	Máximo de 5%	2,5%	Conforme
Densidade	Informativo	1,04 g/ml	Conforme

*Análises sensoriais: Aroma, Cor, Sabor, Aspecto.

Aprovação: 

Este certificado não pode ser reproduzido sem autorização.

Gabriel Aparecido Motta
Responsável Técnico
CRU-IV 044109817

Referências

- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº3 de 19 de janeiro de 2001. Anexo VII-Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Extrato de Própolis.
- V.S.Bankova and M.C.Marcucci, Standardization of Propolis: Present Status and Perspectives, Bee World 81(4) 182-188 (2000).

GREEN EUCALYPT PROPOLIS LTDA.
Rua José Bastos Júnior, 173 - Santa Cecília - CEP 12411-330 - Pindamonhangaba - São Paulo - Brasil
Fone: (12) 3645-4431 - E-mail: qualidade@apisbrasil.com.br

Fonte: Green Eucalypt Propolis LTDA / 3619. Pindamonhangaba (SP).