

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
Faculdade de Odontologia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DE DIFERENTES
IRRIGANTES FINAIS UTILIZANDO A CONTAGEM DE UNIDADES
FORMADORAS DE COLÔNIAS**

Relatório Final

Apresentado à Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo, como requisito da disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso e para graduação no curso de Odontologia da Universidade de Passo Fundo.

Aluno – Dierro Soares Macci

Orientador – Prof. Dr. Matheus Albino Souza

Passo Fundo, setembro de 2019

Sumário

1. TÍTULO	3
2. EQUIPE EXECUTORA	3
2.1. Aluno	3
2.2. Orientador	3
3. RESUMO	3
4. PROBLEMA DE PESQUISA	4
5. JUSTIFICATIVA	5
6. REVISÃO DE LITERATURA	5
7. OBJETIVOS	14
7.1. Objetivos gerais	14
7.2. Objetivos específicos	14
8. MATERIAIS E MÉTODOS	15
9. RESULTADOS	20
10. DISCUSSÃO	21
11. CONCLUSÃO	23
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
13. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO ALUNO	26
14. ANEXOS	27

RELATÓRIO FINAL

1. TÍTULO

Avaliação da ação antimicrobiana de diferentes irrigantes finais utilizando a contagem de unidades formadoras de colônias.

2. EQUIPE EXECUTORA

2.1. Aluno

Nome: Dierro Soares Macci

Matrícula: 152777

2.2. Orientador

Nome: Prof. Dr. Matheus Albino Souza

Matrícula: 8948

3. RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, a ação antimicrobiana do EDTA 17% e do QMix contra *Enterococcus faecalis*, por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs). Trinta dentes humanos extraídos unirradiculares foram utilizados para o presente estudo. A porção coronária foi seccionada com um disco de diamante na junção amelo-cementária, de forma que a raiz remanescente apresentasse um comprimento de aproximadamente 15 mm. Em seguida, as amostras foram esterilizadas em autoclave por 30 minutos a uma temperatura de 120°C. Após o processo de esterilização, as amostras foram inoculadas com 100 µl de cultura de *Enterococcus faecalis* e imersas em microtubos contendo 2 ml de BHI. As amostras foram mantidas imersas em cultura bacteriana por quatorze dias e armazenadas em estufa bacteriológica a uma temperatura de 37°C, com renovação do meio de cultura a cada 48 horas, provendo os nutrientes necessários para sustentar o crescimento bacteriano. Após o período de contaminação, as amostras foram divididas aleatoriamente em três grupos (n=10) de acordo com o protocolo de irrigação final: G1: água destilada; G2: EDTA 17%; G3: QMix. A contagem de unidades formadoras de

colônias (UFCs) foram realizadas para avaliar a eficácia de descontaminação dos tratamentos propostos. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA), seguido pelo post-hoc de Tukey ($\alpha=0,05$). Obteve-se como resultado estatístico que nenhum dos grupos eliminou totalmente o conteúdo bacteriano, como também, que o QMix foi o irrigante que gerou a maior descontaminação bacteriana das amostras. Concluiu-se então, que a ação antimicrobiana foi maior quando usado o QMix.

Palavras-chave: EDTA; *Enterococcus faecalis*; irrigantes do canal radicular; QMix.

4. PROBLEMA DE PESQUISA

As alterações pulpares e dos tecidos periapicais apresentam natureza inflamatória e etiologia microbiana, onde bactérias e seus subprodutos exercem um papel significativo na indução e, principalmente, na progressão destas patologias (KAKEHASHI *et al.*, 1965). Dentre os microorganismos encontrados na microbiota endodôntica, se destaca o *Enterococcus faecalis*, que é um microorganismo anaeróbio facultativo, altamente resistente ao preparo químico-mecânico convencional e usualmente encontrado nos casos de insucesso do tratamento endodôntico (PINHEIRO *et al.*, 2003). Além disso, as complexidades anatômicas do sistema de canais radiculares impedem que os microorganismos sejam alcançados de forma adequada pelos instrumentos endodônticos (VAUDT *et al.*, 2009).

Dessa forma, o uso de substâncias químicas auxiliares, em associação com os instrumentos endodônticos, se faz necessário para promover uma adequada descontaminação do sistema de canais radiculares. No entanto, durante este processo, ocorre a liberação de raspas de dentina, que, associadas aos componentes orgânicos, microorganismos e substâncias químicas auxiliares, dão origem a uma camada denominada de *smear layer*. Esta camada adere à superfície dentinária e promove a obliteração dos túbulos dentinários, impedindo a penetração de agentes antimicrobianos (TORABINEJAD *et al.*, 2002). Neste cenário, o uso de irrigantes se faz necessário, para promover a remoção desta camada.

O EDTA é o irrigante final mais empregado na endodontia para a remoção de *smear layer* (DAI *et al.*, 2011). No entanto, possui algumas limitações, dentre as quais se incluem uma limitada ação antimicrobiana contra o biofilme de *Enterococcus faecalis* (ALMEIDA *et al.*, 2016) e a síntese do seu produto é prejudicial ao meio ambiente (SILLANPÄÄ, 1997). Diante dos problemas expostos, torna-se necessária a busca de alternativas para serem utilizadas na irrigação final, no intuito de promover a remoção da *smear layer*, ao mesmo tempo em que se contribui para o processo de descontaminação do sistema de canais radiculares (MOLLASHAHI *et al.*, 2016).

5. JUSTIFICATIVA

Recentemente, o uso de um novo irrigante endodôntico denominado QMix (Dentsply, Tulsa Dental Specialties, Tulsa, OK, USA) tem sido recomendado como protocolo de irrigação final em endodontia (STOJICIC *et al.*, 2012). Isso se deve ao fato da presença de dois componentes neste produto: a clorexidina, que possui elevado potencial antimicrobiano

(FERRAZ *et al.*, 2001), e o EDTA que possui a capacidade de remover *smear layer* oriunda do processo de instrumentação dos canais radiculares (PEREZ-HEREDIA *et al.*, 2008). Em outras palavras, ao mesmo tempo que a *smear layer* é removida, este produto contribuiria para o processo de descontaminação do sistema de canais radiculares. Além disso, apesar da presença de EDTA na sua composição, não há relatos na literatura sobre prejuízos ao meio ambiente a partir da síntese do QMix. Diante do exposto, torna-se justificável a realização deste estudo, no intuito de analisar alternativas para serem utilizadas após o preparo químico-mecânico como irrigante final, que auxiliem na descontaminação do sistema de canais radiculares ao mesmo tempo em que ocorre a remoção da *smear layer*.

6. REVISÃO DE LITERATURA

SOARES *et al.* (2010), avaliaram a eficácia antimicrobiana através de um regime de irrigações alternadas durante o preparo químico mecânico (PQM). Durante 21 dias, os canais radiculares de dentes extraídos de humanos foram infectados com *Enterococcus faecalis*, sendo que a colonização foi confirmada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os canais foram irrigados com solução salina (grupo controle), com hipoclorito de sódio (NaOCl) 5.25% seguido de uma lavagem final com EDTA 17% (grupo convencional de irrigação), ou com o uso alternado de NaOCl e EDTA (grupo de irrigação alternada [AI]). Amostras foram tiradas antes do tratamento (S1), depois do PQM (S2) e durante os 14 dias seguintes. Duas espécimes dos grupos foram analisados pelo MEV. O resultado foi que o processo de irrigação baseado no uso alternado de NaOCl e EDTA parece ser uma técnica endodôntica promissora, pois promoveu uma eliminação do biofilme de *Enterococcus faecalis* dos canais radiculares durante todo o experimento.

BACA *et al.* (2011), tiveram como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana residual de quatro grupos de irrigantes finais em canais radiculares infectados com *Enterococcus faecalis*. Para fazer esse estudo, primeiramente, foi induzido um crescimento bacteriano do *Enterococcus faecalis* em canais unirradulares durante 4 semanas. Após essas 4 semanas, foi feito no canal radicular dos dentes o preparo químico-mecânico, utilizando quatro técnicas (grupos) com diferentes produtos para a irrigação final. O grupo 1 continha EDTA-NaOCl, EDTA 17% seguido de NaOCl 5.25%. O grupo 2 possuía MA-NaOCl, ácido maleico seguido de NaOCl 5.25%. O grupo 3 era formado por EDTA-CHX + CTR, EDTA 17% seguido de clorexidina (CHX) 2% + cetrimida (CTR) 0.2%. E o último grupo com MA-CHX + CTR, MA 7% seguido de CHX 2% + CTR 0.2%. Amostras foram coletadas durante 60 dias para

identificar se houve crescimento bacteriano. Foi obtido como resultado que os grupos EDTA-CHX + CTR e MA-CHX + CTR com irrigação final de CHX 2% + CTR 0.2% mostraram porcentagens das amostras sem recolonização, respectivamente, de 72.1% e 66.8% em 60 dias. Então pôde ser concluído que a combinação entre CHX 2% + CTR 0.2% seria uma alternativa efetiva para atuar como um regime de irrigação final, devido a sua ação antimicrobiana ao longo do tempo.

GRÜNDLING *et al.* (2011), realizaram este estudo com o propósito de avaliar o efeito *in vitro* da irrigação ultrassônica com NaOCl e EDTA nos canais radiculares de dentes bovinos infectados com *Enterococcus faecalis*. Para realizar esse estudo foram inoculados com *Enterococcus faecalis* oitenta e quatro incisivos bovinos, em cultura remanescente por 50 dias, para a formação de biofilme. Os dentes foram divididos em quatro grupos: o grupo que não recebeu tratamento; o grupo com ultrassom + água destilada; o grupo com irrigação convencional com NaOCl + EDTA; e o grupo com irrigação ultrassônica passiva junto ao NaOCl e EDTA. Foi obtido como resultado nos testes microbiológicos, que os grupos que possuíam o NaOCl não mostraram crescimento bacteriano. Houveram significantes diferenças entre o grupo controle e o grupo com ultrassom + água destilada e entre esses grupos e aqueles com o uso de NaOCl. Sendo assim, concluíram que após todos os teste e análises a irrigação passiva com o ultrassom pode contribuir na limpeza dos canais radiculares, porém deve-se ter em mente que o principal meio de fazer a eliminação bacteriana é através da irrigação.

STOJICIC *et al.* (2012), avaliaram através de um modelo experimental laboratorial a substância irrigadora QMix contra o *Enterococcus faecalis*, placa mista bacteriana em fase planctônica e placa de biofilme. Além disso, examinaram a sua habilidade em remover *smear layer*. Para fazerem esse estudo, os *Enterococcus faecalis* e a placa mista bacteriana foram expostas ao QMix, junto com CHX 2%, MTAD e NaOCl 1% durante 3 segundos, 30 segundos e 3 minutos. Após exposição, amostras foram tiradas, e a partir delas, foram feitas diluições em série e análises de crescimento aeróbico e anaeróbico em placas de ágar de soja tríptico (TSA) ou em placas de ágar de sangue durante 24 e 72 horas. *Enterococcus faecalis* e as placas com biofilmes, foram cultivados por 3 semanas em discos de colágenos revestidos por hidroxiapatita ou dentina e foram expostos durante 1 minuto e 3 minutos por QMix, CHX 2%, MTAD e NaOCl 1% e 2%. Blocos de dentina foram expostos ao QMix e EDTA 5% durante 5 minutos. Obtiveram como resultado que o QMix e NaOCl 1% mataram todos os planctônicos *Enterococcus faecalis* e bactérias da placa em 5 segundos, enquanto a CHX 2% e MTAD foram incapazes de matar todas as bactérias da placa em 30 segundos. Concluíram

então, que o QMix e NaOCl mataram mais *Enterococcus faecalis*, bactérias da placa em fase planctônica e placa de biofilme que o CHX e MTAD.

FERRER-LUQUE *et al.* (2012), realizaram este estudo com o intuito de avaliar a atividade antimicrobiana residual do EDTA 17%, do ácido maleico (MA) e do ácido láctico 10% (LA) sozinhos e combinados com CTR 0.2% em canais radiculares infectados com *Enterococcus faecalis*. Para a ocorrência desse estudo, os biofilmes de *Enterococcus faecalis* foram cultivados em raízes unirradiculares durante 4 semanas, sendo que após esse tempo de preparação, elas foram divididas aleatoriamente em seis grupos (n = 15) de acordo com o regime final de irrigação, da seguinte forma: 5 mL de EDTA 17%; 5 mL de EDTA 17% + CTR 0,2%; 5 mL de MA 7%; 5 mL de MA 7% + CTR 0.2%; 5 mL de LA 10%; e 5 mL de LA 10% + CTR 0.2%. As amostras foram coletadas por 60 dias para indicar a presença de crescimento bacteriano. Testes χ^2 de Fisher e Pearson foram utilizados para comparar as porcentagens das espécimes sem rebrota de *Enterococcus faecalis* em todo o período de tempo do estudo. Obtiveram como resultados: diferenças significativas no rebrote bacteriano entre os grupos com e sem CTR; e não houveram diferenças significativas ao longo do tempo entre os 3 grupos com CTR ou entre os 3 sem CTR. Portanto concluíram que a atividade residual contra *Enterococcus faecalis* usando MA 7% + CTR 0.2%, EDTA 17% + CTR 0.2% e LA 10% + CTR 0.2% foi maior do que com uso de agentes quelantes sozinhos.

MORGENTAL *et al.* (2013), realizaram esse estudo com o objetivo de comparar o efeito antibacteriano do QMix com o de soluções de irrigação convencionais na presença ou ausência de pó de dentina, sendo que o pó de dentina foi preparado a partir de dentes incisivos bovinos esterilizados. Os seguintes irrigantes foram testados contra *Enterococcus faecalis*: NaOCl 6%, NaOCl 1%, QMix, CHX 2% e EDTA 17%. Foi usado como controle negativo uma solução salina estéril e a sobrevivência dessas bactérias expostas aos irrigantes com presença ou ausência de pó de dentina foram analisadas sob condições planctônicas. As unidades de colônias formadas foram contadas e transformadas em log, e depois foram analisadas usando os testes de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney. Obtiveram como resultado, que após 30 segundos o NaOCl 6% exibiu zero unidades formadoras de colônias por mililitro enquanto o NaOCl 1% e QMix mostraram número reduzido de colônias em comparação com o controle negativo. Além disso, após 1 minuto, ambas as concentrações de NaOCl não apresentaram crescimento bacteriano e o QMix reduziu o número de colônias, mas o EDTA e a CHX tiveram contagens bacterianas semelhantes ao controle negativo. Após 6 horas, ambas as concentrações de NaOCl, QMix e CHX mataram todas as bactérias, independentemente da presença de dentina. Portanto, puderam concluir que o NaOCl 6% foi

o irrigante mais efetivo contra *Enterococcus faecalis* e que a dentina atrasou a atividade antibacteriana do NaOCl e do QMix, porém não impediu completamente a sua ação.

WANG *et al.* (2013), realizaram este estudo com objetivo de avaliar o efeito da *smear layer* sobre o efeito antibacteriano de diferentes soluções desinfetantes em túbulos dentinários infectados. Para a confecção desse estudo, foi colocado células de *Enterococcus faecalis* dentro de túbulos dentinários de acordo com um protocolo previamente estabelecido. Os blocos dentinários infectados foram incubados durante 3 semanas, produzindo assim, uma camada uniforme de *smear layer*. Quarenta amostras de dentina infectada foram preparadas e submetidas a 3 e 10 minutos de exposição a soluções desinfetantes, incluindo água estéril, NaOCl 2% e 6%, CHX 2%, EDTA 17% e QMix. As seguintes combinações também foram incluídas: NaOCl 2% + CHX 2%, NaOCl 2% + QMix, NaOCl 6% + QMix e NaOCl 6% + EDTA 17% + CHX 2%. Com a presença de *smear layer* junto com 10 minutos de exposição ao QMix, NaOCl 2% + QMix, NaOCl 6% + QMix e NaOCl 6% + EDTA 17% + CHX 2% foi obtido como resultado uma eliminação significativamente maior de bactérias do que quando expostos a 3 minutos por essas mesmas soluções desinfetantes ($P < .05$). NaOCl 6% + QMix e NaOCl 6% + EDTA 17% + CHX 2% mostraram o efeito antibacteriano mais forte. Portanto, concluíram que as soluções contendo NaOCl 6% e/ou QMix mostraram a maior atividade antibacteriana.

STOJICIC *et al.* (2013), realizaram este estudo com o objetivo de avaliar o efeito da fonte de bactérias do biofilme, o nível de maturação do biofilme e o tipo de agente desinfetante na suscetibilidade das bactérias do biofilme para agentes antibacterianos. Foi utilizado como metodologia biofilmes multiespecíficos de placas bacterianas de 6 doadores que foram cultivadas por até 8 semanas em discos de hidroxiapatita revestidos com colágeno. Depois de 1, 2, 3, 4 e 8 semanas de crescimento, os biofilmes foram expostos à 1% de hipoclorito de sódio, 0.2/0.4% de iodo-iodeto de potássio, e 2% de clorexidina por 1 e 3 minutos. A porcentagem de bactérias do biofilme que foram mortas foi determinada usando a viabilidade de coloração *LIVE/DEAD* e microscopia confocal de varredura à laser. A análise de variância one-way foi utilizada para a análise estatística. Obtiveram como resultados que biofilmes de uma e duas semanas de idade foram moderadamente ou muito sensíveis aos agentes desinfetantes testados, sendo que mataram de 20 a 100% das bactérias do biofilme. Após 3 semanas de crescimento as bactérias do biofilme eram mais resistentes aos mesmos agentes, e apenas de 10 a 30% das bactérias foram mortas ($P < .001$). O mesmo padrão do efeito da idade do biofilme (maturação) na resistência das bactérias foram observadas em todos os 6 biofilmes e todos os 3 agentes desinfetantes. Pôde-se concluir

então, que a mudança das bactérias dos biofilmes de sensível para resistente contra os agentes desinfetantes ocorreram entre duas e três semanas de maturação do biofilme. Além disso, que é importante saber o cronograma de maturação de cada biofilme usado quando se quer testar a efetividade de agentes desinfetantes endodônticos contra bactérias do biofilme.

DU *et al.* (2014), realizaram este estudo com o objetivo de avaliar a ação antimicrobiana em biofilmes de *Enterococcus faecalis* nos canais dentinários, que sofreram exposição a curto e longo prazo por diferentes soluções de desinfecção endodôntica, usando um modelo de infecção dentinária e um microscópio confocal de varredura à laser. Utilizaram para a confecção desse estudo, túbulos dentários em blocos semicilíndricos de dentina que foram preenchidos com *Enterococcus faecalis* por centrifugação e depois incubados para formar biofilmes de 1 dia de idade e de 3 semanas de idade. Os biofilmes jovens e maduros na dentina foram expostos a água estéril, CHX 2%, NaOCl 2% e NaOCl 6% durante 3, 10 e 30 minutos. As bactérias mortas pelos desinfetantes foram analisadas pela microscopia confocal de varredura à laser usando a mancha de viabilidade bacteriana: *LIVE/DEAD*. Foram obtidos como resultados: que a solução antibacteriana mais efetiva contra os biofilmes de 1 dia e 3 semanas de idade foi o NaOCl 6% ($P < 0,05$); e que significativamente mais células foram mortas em biofilmes jovens do que em biofilmes antigos em todos os grupos ($P < 0,05$). Então pôde ser concluído que a morte de bactérias na dentina infectada por soluções desinfetantes é temporária, mas que pequenas matanças adicionais são obtidas após os primeiros 10 minutos de exposição.

CECCHIN *et al.* (2015), publicaram este estudo com o objetivo de avaliar o efeito do GSE, NaOCl, CHX e QMix como agentes antimicrobianos contra *Enterococcus faecalis* e sua influência na resistência à flexão e resistência à tração final da dentina do canal radicular. Canais radiculares foram divididos em cinco grupos ($n=10$), de acordo com as substâncias usadas: NaOCl 2.5%, CHX 2%, GSE 6.5%, QMix e o grupo controle (água destilada) (DW). A irrigação final foi feita com EDTA 17% em todos os grupos, exceto quando DW foi utilizado. O número de unidades formadoras de colônias foi utilizado para avaliar a ação antimicrobiana. Barras de dentina foram usadas para avaliar a resistência à flexão após o tratamento com as substâncias descritas anteriormente ($n=10$). A UTS foi avaliada após o tratamento dos cortes de dentina radicular em forma de ampulheta com as mesmas substâncias ($n=30$). Obteve-se como resultado que a menor contaminação bacteriana foi observada pelo CHX e GSE, enquanto NaOCl e QMix mostraram uma ação antimicrobiana intermediária ($p > 0.05$).

GOMES *et al.* (2015), realizaram este estudo com o objetivo de avaliar a microbiota de lesões endodônticas-periodontais antes e depois do preparo químico mecânico (PQM). Para a pesquisa foram coletadas amostras clínicas de 15 canais radiculares (CRs) com tecidos de polpa necrótica e com bolsas periodontais associadas (BP) (n = 15) em dentes com lesões endodônticas-periodontais antes e após o PQM. A identificação do micróbio oral humano usando o protocolo de Sequenciamento de Próxima Geração (SPG) e cultura viável, foram utilizadas para analisar as amostras de CRs e BPs. O teste U de Mann-Whitney e as correções de Benjamini-Hochberg foram realizadas para correlacionar os achados clínicos e radiográficos com achados microbianos (P <0,05). A partir disso, foi obtido como resultado que bactérias foram encontradas em 100% das amostras em ambos os sítios (15/15) usando SPG. As espécies que foram detectadas com maior frequência nos CRs, antes e após o PQM, usando SPG foram: *Enterococcus faecalis*, *Parvimonas micra*, *Mogibacterium timidum*, *Filifactor alocis* e *Fretibacterium fastidiosum*. Já as espécies que foram detectadas com maior frequência nas BPs, antes e depois do PQM, usando SPG foram: *P. micra*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus constellatus*, *Eubacterium brachy*, *Tannerella forsythia* e *Filifactor alocis*. Sendo assim, concluíram que a comunidade microbiana presente nas lesões endodônticas-periodontais combinadas é complexa. Portanto, a semelhança entre a microbiota de ambos os sítios, antes e depois da PQM, sugeriu que poderia haver uma via de infecção entre a polpa e o periodonto.

ZHANG *et al.* (2015), realizou esta revisão sistemática com o objetivo de comparar a prevalência de *Enterococcus faecalis* em infecções intra-radiculares primárias e persistentes. Para produzir esta revisão foi realizado uma pesquisa exaustiva de literatura combinado com critérios de inclusão especificados para coletar todos os estudos comparando a prevalência de *Enterococcus faecalis* em infecções intra-radiculares primárias e persistentes. Análise de subgrupo de acordo com diferentes métodos de detecção (cultura e reação em cadeia da polimerase) e análise de sensibilidade foram aplicados. A meta-análise foi feita com a ajuda do Stata/SE 12.0 (StataCorp, College Station, TX) após excluir estudos com formas incertas de lesões pulpares e perirradiculares em seus grupos primários de infecção. A revisão teve como resultado que a taxa de detecção de *Enterococcus faecalis* pelos dois métodos foi maior em infecções persistentes em comparação com periodontites periapicais crônicas como infecção primária. Sendo assim, concluiu-se que *Enterococcus faecalis* é mais correlacionado com infecções intra-radiculares persistentes quando comparado com periodontites periapicais crônicas não tratadas.

ALMEIDA *et al.* (2016), fizeram esta pesquisa com o objetivo de investigar a eficácia do EDTA e uma solução de sal modificada (MSS) para separar bactérias de biofilmes, partindo da ideia que com o rompimento da matriz de biofilmes endodônticos, a sua remoção do canal radicular seria facilitada. O estudo foi realizado utilizando biofilmes de *Enterococcus faecalis* com quarenta e oito horas de idade. A solução tampão fosfato-salino serviu como controle negativo. As células residuais de biofilme no substrato e as células isoladas no sobrenadante foram coletadas, após imersão. A viabilidade foi verificada pelo método de contagem de unidades formadoras de colônias (CFU). O tratamento com propídio monoazida (PMA) em conjunto com a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), também foi realizado para detectar a presença de genes de RNA ribonucleicos 16S de *Enterococcus faecalis*. Os dados foram analisados usando análise de variância de uma via e testes de Tukey ou Kruskal-Wallis e Dunn. O teste Pearson R avaliou a correlação entre os resultados de CFU e PMA ($\alpha = 5\%$). Obtiveram como resultados que a qPCR mostrou que o EDTA despreendeu 99% das células de biofilme, e o MSS separou 94% das células do biofilme (ambos $P < 0,001$). Em contraste com o EDTA, o MSS era altamente antimicrobiano. Portanto, concluíram que as células separadas pelo EDTA em biofilmes tiveram o menor efeito antimicrobiano, diferente do MSS que além de um ótimo efeito antimicrobiano, também separou células de biofilme.

LYSAKOWSKA *et al.* (2016), realizaram este estudo com o objetivo de examinar a presença de espécies microbianas em infecções primárias e secundárias e identificar os sinais e sintomas associados a elas. A pesquisa foi realizada com um número total de 37 canais radiculares de 33 pacientes submetidos ao tratamento do canal radicular. As amostras foram realizadas usando um ponto de papel estéril após a instrumentação químico-mecânica do canal. A identificação microbiológica foi realizada por testes bioquímicos macromorfológicos, micromorfológicos e comerciais (sistema ATB). Obtiveram como resultados que um número total de 54 espécies foram isoladas, sendo que o mais comum foi *Enterococcus faecalis* seguido por *Propionibacterium acnes* e *Streptococcus spp.*, e também, que cinco cepas enterocócicas multirresistentes foram isoladas. No entanto, a resistência a linezolida ou aos glicopeptídeos não foi encontrada. A radiolucência foi observada significativamente mais frequentemente em infecções sintomáticas ($P = 0,0061$) causadas por *Actinomyces spp.* do que em assintomáticos. Portanto, concluíram que os *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus spp.* foram as bactérias mais comumente isoladas dos canais radiculares, e que a resistência dos *Enterococcus faecalis* a muitos antimicrobianos pode representar um problema na sua eliminação.

ARIAS-MOLIZ e CAMILLERI (2016), realizaram este estudo com o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana de selantes contendo silicato tricálcico em contato com diferentes tipos de selantes. A pesquisa foi realizada avaliando a atividade antimicrobiana de BioRoot RCS, MTA Fillapex e AH Plus em contato com água, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e solução salina tamponada fosfatada (PBS) pelo teste de difusão em ágar e pelo teste de infecção intratubular contra *Enterococcus faecalis*. A superfície do selante em contato com as três soluções foi caracterizada após 1 minuto de contato e também, após a simulação do contato do selante *in vivo* com a solução de irrigação dentro de um modelo de dente através da análise de difração de raios X de ângulo de pastagem. Foi encontrado como resultado, que a irrigação com EDTA mostrou as maiores propriedades antimicrobianas dos três selantes do canal radicular seguido de água, porém sem diferenças significativas. A atividade antimicrobiana do BioRoot RCS foi significativamente maior do que dos outros selantes. AH Plus perdeu suas propriedades antimicrobianas após irrigação com água e PBS. Portanto, concluíram que o BioRoot RCS mostrou a maior atividade antimicrobiana, e também, que os selantes do canal radicular exerceram uma maior atividade antimicrobiana quando o EDTA foi utilizado como irrigante final.

SOUZA *et al.* (2017), realizaram este estudo com a finalidade de avaliar a eficácia dos protocolos de descontaminação final contra *Enterococcus faecalis* e sua influência na resistência de união dos materiais de preenchimento na dentina dos canais radiculares. Noventa canais radiculares foram alargados com o sistema ProTaper e preenchido com *Enterococcus faecalis* durante 15 dias. Sessenta amostras foram divididas aleatoriamente em seis grupos (n=10) e submetidas aos seguintes protocolos: G1- água destilada (controle), G2- clorexidina 2%, G3- QMix, G4-extrato de semente de uva 6,5%, G5- terapia fotodinâmica com fibra óptica e G6-terapia fotodinâmica sem fibra óptica. A porcentagem de bactérias reduzidas foi realizada através da contagem de UFCs. As trinta amostras que sobraram foram submetidas aos mesmos protocolos de descontaminação (n=5) e preenchidas com guta percha e selador AH Plus a fim de executar o teste de push-out. Os dados dos dois testes foram submetidos ao one-way (ANOVA) seguido do procedimento de post-hoc de Tukey's ($\alpha=0.05$). Obtiveram como resultados que a maior redução bacteriana foi encontrada pela clorexidina 2%, QMix e extrato de semente de uva 6,5%, sem diferença estatística significativa entre eles. Pôde-se concluir então, que os testes realizados com os protocolos de descontaminação mostraram efetividade contra *Enterococcus faecalis* e não interferiram na resistência de união dos materiais de preenchimento na dentina dos canais radiculares.

SOUZA *et al.* (2018), realizou este estudo com o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana de soluções de hipoclorito e instrumentação recíproca associados com terapia fotodinâmica (PDT). Cento e trinta e dois canais radiculares foram instrumentados até a lima K-file #35 e depois inoculados com *Enterococcus faecalis* por 14 dias. As 132 amostras foram divididas aleatoriamente em onze grupos (n=12) e submetidos aos seguintes protocolos: G1- água destilada + Recíproc R40 (controle); G2- hipoclorito de sódio 1% (NaOCl) + Recíproc R40; G3- NaOCl 2.5% + Recíproc R40; G4- hipoclorito de cálcio 1% (Ca[OCl]2) + Recíproc R40; G5- Ca(OCl)2 2.5% + Recíproc R40; G6- PDT; G7- água destilada + Recíproc R40 + PDT; G8- NaOCl 1% + Recíproc R40 + PDT; G9- NaOCl 2.5% + Recíproc R40 + PDT; G10- Ca(OCl)2 1% + Recíproc R40 + PDT; G11- Ca(OCl)2 2.5% + Recíproc R40 + PDT. A porcentagem de redução bacteriana foi verificada através da contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs) em 10 amostras de cada grupo. As duas amostras restantes de cada grupo foram submetidas à microscopia eletrônica de varredura (SEM) para ilustrar a efetividade dos tratamentos propostos. Os melhores resultados para remoção bacteriana foram observados nos grupos 8, 9, 10 e 11, sem diferença significativa entre eles ($p < 0.05$).

SOUZA *et al.* (2019), publicou este artigo que tem como objetivo avaliar a influência de protocolos de irrigação final e o tipo de cimento resinoso na resistência de união dos pinos de fibra de vidro (GFPs) em dentina radicular previamente tratada com terapia fotodinâmica (PDT). Para a realização deste estudo foram usados 100 canais radiculares preparados até a Gates Glidden #4 para receber o GFPs. Todas as amostras foram submetidas ao PDT e foram aleatoriamente divididos em cinco grupos (n = 20) de acordo com o protocolo de irrigação final: água destilada + ativação ultrassônica [US]; EDTA 17%; QMix; EDTA 17% + US; e QMix + US. Cada grupo foi dividido aleatoriamente em dois subgrupos (n = 10), de acordo com o tipo de cimento resinoso utilizado para a cementação do GFPs: Rely-X ARC cimento resinoso dual; ou Rely-X U200 (#M, St Paul, MN, USA) cimento resinoso autoadesivo. A resistência de união foi avaliada usando o teste de push-out. A resistência de união foi comparada usando two-way (ANOVA), seguido do teste de post-hoc de Tukey; modos de falha foram comparados usando o teste qui-quadrado ($\alpha = 5\%$). Obtiveram como resultados que o uso de US sobre irrigantes finais melhorou a resistência de união dos GFPs, independentemente do cimento resinoso usado ($p < 0.05$). Além disso, o tipo de cimento resinoso não influenciou na resistência de união dos GFPs ($p < 0.05$).

SOUZA *et al.* (2019), realizou este estudo com intuito de avaliar a influência da ativação ultrassônica (US) sobre irrigantes finais na atividade antimicrobiana, remoção de

smear layer e resistência de união. Os canais radiculares de 180 dentes humanos extraídos foram distribuídos em três testes experimentais (n=60). Em cada teste, as amostras foram subdivididas em seis grupos (n = 10) de acordo com os protocolos finais de irrigação: G1: água destilada (DW); G2: DW + US; G3: EDTA 17%; G4: QMix; G5: EDTA 17% + US; e G6: QMix + US. A ação antimicrobiana foi avaliada através da contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs), a *smear layer* através do escaneamento pelo microscópio eletrônico e a resistência de união pelo teste de push out. Obtiveram como resultados que o grupo 4 e 6 geraram a maior redução bacteriana, grupo 5 e 6 forneceram a maior remoção de *smear layer* e o grupo 3, 4, 5 e 6 forneceram a maior resistência de união (P < 0.05).

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivos gerais

Avaliar, *in vitro*, a ação antimicrobiana de diferentes irrigantes finais contra *Enterococcus faecalis*.

7.2. Objetivos específicos

Avaliar, *in vitro*, a ação antimicrobiana do EDTA 17% e do QMix em um modelo de canais radiculares infectados com *Enterococcus faecalis*, por meio da contagem de unidades formadoras de colônias.

8. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi submetido à apreciação do comitê de ética e pesquisa da Universidade de Passo Fundo, sendo aprovado sob número de protocolo 3.110.552.

8.1 Obtenção e preparo das amostras

Trinta dentes unirradiculares humanos extraídos obtidos através do biobanco da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo foram utilizados para o presente estudo.

A porção coronária foi seccionada na junção amelocementária, de forma que o remanescente radicular apresente um comprimento de 15 mm. Foi utilizado para o corte, um disco de diamante rotativo (KG Sorensen Dupla face modelo 1802.7015), acoplado na peça reta de baixa rotação, utilizando água para refrigeração.

Todas as raízes foram preparadas utilizando o mesmo protocolo, no intuito de remover o tecido pulpar e padronizar o diâmetro do canal. O comprimento de trabalho fora estabelecido através da introdução de uma lima tipo-K nº 10 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) no canal radicular, até que sua ponta fosse visualizada no forame apical. A partir desta medida foi reduzido 1 mm, estabelecendo o comprimento de trabalho. O preparo cervical foi realizado com broca Largo nº 3 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) e a ampliação apical foi realizada com o sistema rotatório ProTaper (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça), seguindo a sequência de limas S1, S2, F1, F2 e F3. Todos os instrumentos foram utilizados no comprimento de trabalho, com velocidade de 250 rpm e torque de 2 N, programados previamente no motor X-Smart Plus (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça). A substância química auxiliar utilizada durante a instrumentação das raízes foi água destilada (Decloquimis, São Paulo, SP, Brasil) e, após a instrumentação, foi realizada uma lavagem final com 3 mL de EDTA 17% (Iodontosul, Porto Alegre, RS, Brasil), para a remoção de *smear layer*.

Após a conclusão da padronização do diâmetro dos canais radiculares, foi realizado o vedamento do forame apical com resina fotopolimerizável Opallis (FGM, Joinville, SC, Brasil), para evitar o extravasamento das substâncias testadas durante o experimento. A impermeabilização externa das raízes também foi realizada através de duas aplicações de adesivo a base de cianoacrilato. (SuperBonder – Henkel, São Paulo, SP, Brasil). Cada raiz foi fixada com silicone de condensação Putty-C para Impressão (Silon2APS - Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil) em um microtubo plástico (Axygen Inc, Union City, CA, EUA), de modo que a porção cervical ficasse posicionada para cima.

As amostras foram alocadas em caixas de polipropileno (Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, Estados Unites) e esterilizadas à temperatura de 120 °C em autoclave (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil), por um período de 30 minutos.

8.2. Controle de esterilização

Um dente foi selecionado aleatoriamente e submetido ao controle de esterilização. O dente selecionado foi preenchido com 2 mL de solução salina estéril (Decloquimis, São

Paulo, SP, Brasil), e, após 5 minutos, um cone de papel estéril com calibre #45 (Tanari, Manaus, AM, Brasil) foi colocado em contato com as paredes do canal durante 30 segundos. Em seguida, o cone de papel foi transportado individualmente para microtubos plásticos (Axygen Inc, Union City, CA, EUA) contendo 1 ml de solução salina estéril (Decloquimis, São Paulo, SP, Brasil). O material foi homogeneizado e semeado em placas de Petri com meio de cultura PCA (Plate Count Agar) através da técnica da gota, sendo pingadas cinco gotas de 15 µL. A placa foi incubada a 37 °C durante 48h, a fim de verificar o crescimento bacteriano.

8.3. Preparo do inóculo

A estirpe de referência microbiana utilizada foi *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) (Figura 1a), obtida no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Passo Fundo. As bactérias foram ativadas e cultivadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion) (Figura 1b) durante 24h a 37 °C em uma estufa bacteriológica. Após o período de incubação, o grau de turbidez do inóculo foi ajustado de acordo com a escala 1,0 de McFarland (Figura 1c), que corresponde a $3,0 \times 10^8$ UFC/ml, referente a uma densidade ótica de 0,25 a 550 nm.

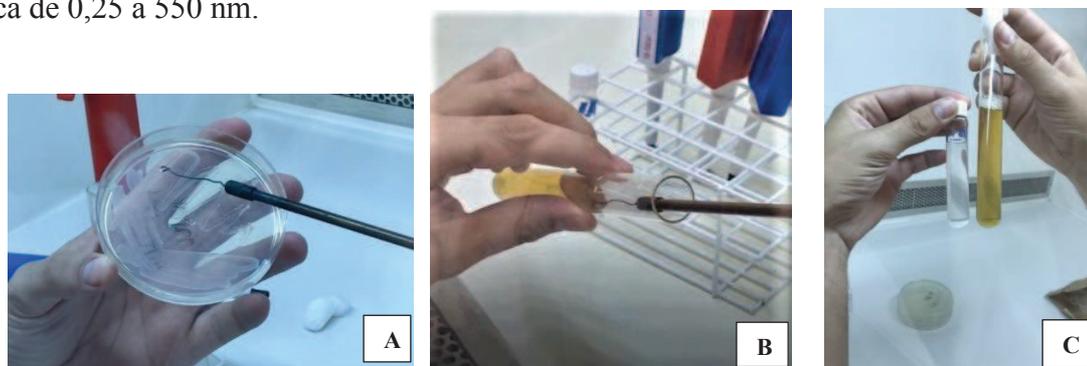


Figura 1. Preparo do inóculo. A) placa de Petri com *Enterococcus faecalis*; B) inserção das bactérias no caldo BHI para serem cultivadas; C) ajuste de turbidez do inóculo

8.4. Contaminação dos canais radiculares

Uma alíquota de 100 µL do inóculo de *Enterococcus faecalis* contido no tubo de ensaio foi inserida no interior dos canais radiculares até o seu completo preenchimento, utilizando seringas descartáveis de 1 mL (Figura 2). A cultura de *Enterococcus faecalis* foi mantida durante 14 dias, a fim de promover o crescimento de bactérias e a formação de biofilme,

renovando o caldo BHI a cada 48h. Todos os procedimentos foram realizados sob condições assépticas em uma câmara de fluxo laminar.

A cada 48h, uma amostra foi escolhida aleatoriamente para ser submetida ao controle microbiano, no intuito de verificar a ausência de contaminação por outras espécies microbianas, garantindo uma cultura pura de *Enterococcus faecalis*. Um cone de papel estéril com calibre #35 (Tanari, Manaus, AM, Brasil) foi introduzido no canal radicular e mantido em contato com as paredes do canal radicular, durante 30 segundos (Figura 3a). Em seguida, o cone foi transferido para um microtubo de plástico estéril contendo 1 mL de solução salina estéril (Figura 3b), que foi homogeneizada em um agitador e, então, realizada a semeadura através da técnica das gotas, sendo pingadas cinco gotas de 15 µL em placas de Petri contendo PCA (Figura 3c). A placa foi incubada a 37°C durante 48h e, em seguida, foi realizada análise da morfologia das unidades formadoras de colônias (UFCs) (Figura 3d), bem como análise de coloração de Gram, a fim de verificar a confirmação de contaminação somente por *Enterococcus faecalis*.



Figura 2. Preenchimento das amostras com o inóculo de *Enterococcus faecalis*

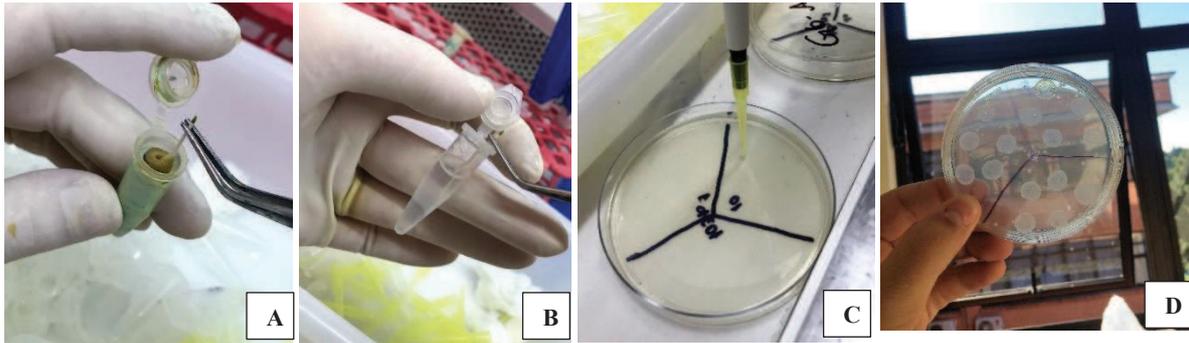


Figura 3. Contaminação das amostras. A) papel absorvente no interior do canal radicular; B) papel absorvente no interior do microtubo; C) semeadura através da técnica das gotas na placa de Petri; D) análise da morfologia dos UFCs

8.5. Avaliação de descontaminação dos protocolos testados

Após o período de 14 dias de contaminação com *Enterococcus faecalis*, as trinta amostras foram divididas em três grupos (n=10), de acordo com os protocolos de lavagem final utilizados para remoção da *smear layer* das paredes dos canais radiculares, como segue: G1 – água destilada (controle); G2 – EDTA 17%; G3 – QMix.

Os canais radiculares foram preenchidos com os irrigantes finais testados, que permaneceram em contato com as paredes do canal pelo período de 30 segundos. Após este período, foi realizada irrigação com 5 ml de água destilada. Para a inserção dos irrigantes finais testados no interior dos canais radiculares foi utilizada seringa descartável estéril e agulha de calibre 30 (Navi-Tip - Ultradent, South Jordan, UT, Estados Unidos).

Ao término dos protocolos de irrigação final, os canais radiculares de todos os grupos foram aspirados e secos com cones de papel absorvente F3 do sistema rotatório ProTaper (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça).

8.6 Realização das coletas e análise microbiológica

A coleta do conteúdo microbiano do interior do canal radicular das amostras foi realizada em dois momentos. A primeira coleta (S1) foi realizada imediatamente após o período de contaminação das amostras e a segunda coleta (S2) foi realizada imediatamente após os protocolos de irrigação final testados.

As coletas (S1 e S2) foram realizadas da mesma forma. O canal radicular foi preenchido com solução salina estéril e uma ponta de papel absorvente estéril calibre #35 foi introduzida

no interior do canal radicular, realizando movimentos circulares, no intuito de encostar intencionalmente em todas as paredes do canal, pelo período de 30 segundos (Figura 4a). Depois disso, a ponta de papel absorvente foi transferida para um microtubo contendo 1 ml de solução salina estéril (Figura 4b). O material foi homogeneizado e diluído até 10^{-3} (Figura 4c). Aliquotas foram semeadas em placas de Petri contendo PCA através da técnica das gotas, no local correspondente da diluição utilizada (Figura 4d). As placas foram incubadas durante 24 horas a uma temperatura de 37°C . Após o período de incubação, a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFCs) foi realizada nas placas (Figura 4e).

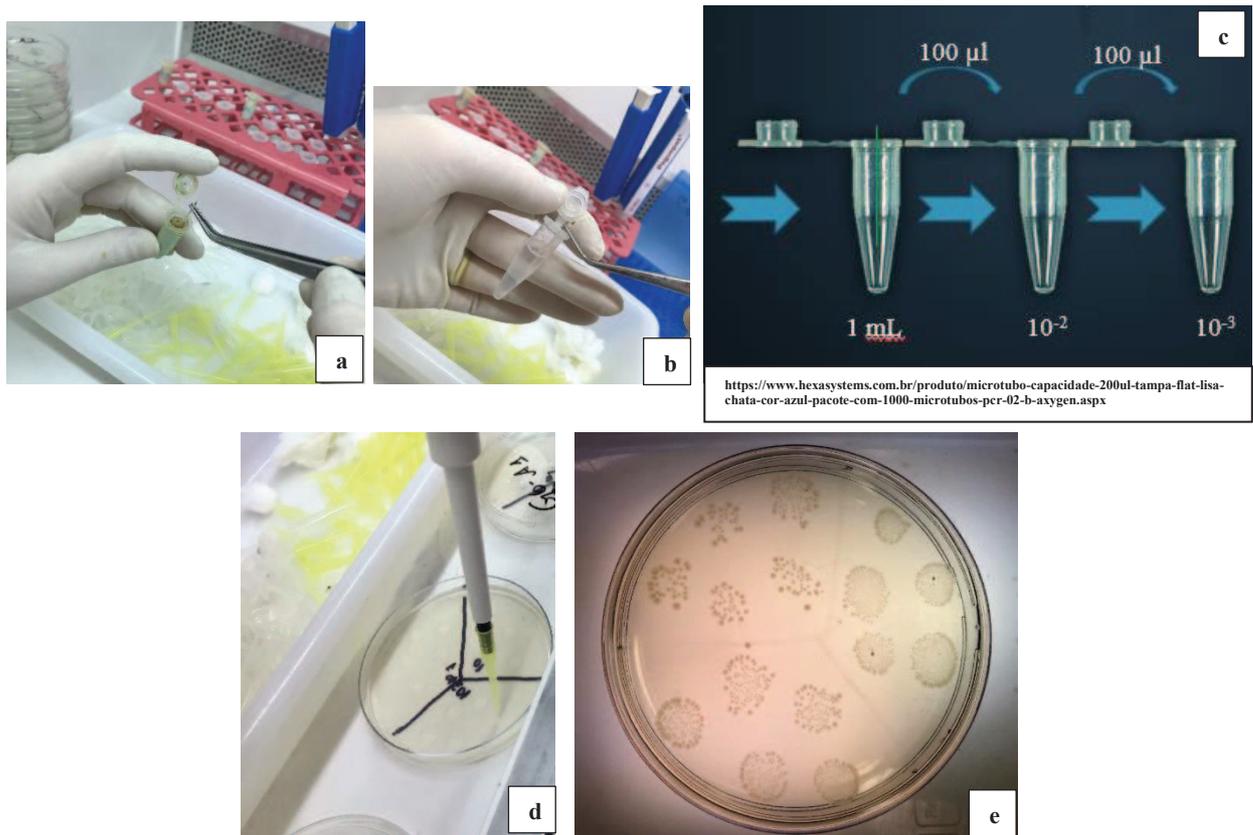


Figura 4. Coleta das amostras. A) papel absorvente no interior do canal radicular; B) papel absorvente no interior do microtubo; C) diluição do material; D) sementeação das alíquotas nas placas de Petri; E) contagem do número de UFCs

8.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada calculando o percentual de redução de *Enterococcus faecalis* a partir da contagem inicial e final de unidades formadoras de colônias nos diferentes grupos de protocolos de irrigação final, utilizando a seguinte fórmula:

Percentual de redução = $100 - [(\text{Valor final}/\text{Valor inicial}) \times 100]$.

One-way ANOVA foi aplicado na avaliação microbiológica, seguido pelo procedimento de post hoc de Tukey, a 5% de nível de significância. Os dados foram analisados utilizando o programa SPSS versão 17.0 (SPSS, Chicago, IL, Estados Unidos).

9. RESULTADOS

A média e o desvio padrão do percentual de redução de *Enterococcus faecalis*, de cada grupo estão expressos na **Tabela 1**. Nenhum dos tratamentos propostos apresentou 100% de redução de *Enterococcus faecalis*.

Durante a análise dos dados obtidos, foi observado que a maior capacidade de redução bacteriana ocorreu no grupo 3 (QMix), sendo estatisticamente superior aos demais grupos testados ($p < 0,05$). Em contraponto, o grupo que reduziu a menor quantidade de bactérias foi o grupo 1 (DW).

Tabela 1: média e desvio padrão da porcentagem da redução de *Enterococcus faecalis* dos protocolos finais de irrigação testados.

Grupo	N	Redução bacteriana (%)
DW	10	11.60 ± 1.86^a
EDTA	10	25.41 ± 2.13^b
QMix	10	85.75 ± 3.86^c

* Os dados são apresentados como média e desvio padrão. Diferentes letras indexadas representam diferenças estatisticamente significantes no procedimento post hoc (teste de Tukey).

** DW = água destilada

10. DISCUSSÃO

A necessidade de realizar intervenção endodôntica se dá quando a polpa dentária, por algum motivo, sofreu alguma alteração e está em processo de necrose ou já necrosou. De

acordo com MOLANDER (2007, p. 1147, apud SOARES, 2010, p. 894), no interior dos canais e na região periapical dos dentes encontram-se bactérias resistentes que impedem a cicatrização dos tecidos periapicais, por esse motivo, a necessidade de realizar uma desinfecção com irrigantes antimicrobianos é essencial. A bactéria mais encontrada em casos de dentes com canais radiculares infectados é *Enterococcus faecalis* (LYSAKOWSKA *et al.*, 2016), que é uma bactéria gram-positiva, anaeróbia facultativa e uma espécie frequentemente isolada em raízes dentárias com lesões periapicais persistentes (KAYAOGLU, ØRSTAVIK, 2004). Uma das características das *Enterococcus faecalis* é poder sobreviver em situações nutricionais inadequadas e poder se manter viável como um único microrganismo (ZHANG *et al.*, 2015). Além disso, tem a capacidade de penetrar nos túbulos dentinários e é capaz de promover a formação de biofilme (FIGDOR *et al.*, 2003), o que cria uma matriz polimérica extracelular que aumenta a resistência dos microrganismos a protocolos de irrigação (STOJICIC *et al.*, 2013). Por esses motivos, o *Enterococcus faecalis* foi a bactéria escolhida para induzir biofilme bacteriano *in vitro* em túbulos dentinários neste estudo de desinfecção (DU *et al.*, 2014).

Quando um estudo tem a necessidade de realizar crescimento de bactérias e formação de biofilme de apenas uma espécie específica, um ambiente especial e um tempo determinado de proliferação bacteriana devem ser instituídos. Para esta pesquisa, a escolha por realizar 14 dias de crescimento de bactérias e a formação de biofilme foi determinada através de estudos prévios que comprovam que 14 dias é um período suficiente para a formação do biofilme de *Enterococcus faecalis* na dentina radicular (GUERREIRO-TANOMARU *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2018). Comparando com outros estudos, GRÜNDLING *et al.* (2011) utilizou 50 dias de cultura e preparação do inóculo em seu protocolo; já, BACA *et al.* (2011) utilizou 60 dias de contaminação das amostras para o crescimento da bactéria, o que demonstra que ainda não há um protocolo padrão para se seguir quando se quer testar a eficácia dos protocolos de descontaminação.

A técnica utilizada neste estudo para a contagem das bactérias que se proliferaram e cresceram no interior do canal radicular das amostras, foi através das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs). Conforme explicado em SOUZA *et al.* (2017), o principal objetivo dos UFCs é fazer uma contagem com o intuito de calcular a redução percentual de *Enterococcus faecalis* em cada um dos grupos. Essa técnica foi escolhida, porque permite realizar uma quantificação das colônias bacterianas a partir do espaço do canal em que foi feita a coleta de um modo que seja aceitável (PETERS *et al.*, 1995). Já o tempo de permanência dos irrigantes finais nas paredes do canal radicular das amostras foi determinado em 30 segundos.

Em estudos similares (ARIAS-MOLIZ, CAMILLERI, 2016; SOUZA *et al.*, 2019b), é comprovado que o tempo de 1 minuto é suficiente para a correta atuação dos irrigantes com ação antimicrobiana sobre a dentina radicular infectada. No entanto, a proposta do presente estudo seria reduzir ainda mais o tempo de contato dos agentes quelantes no interior do canal radicular, minimizando os riscos de danos à estrutura dentinária.

A partir dos resultados encontrados neste estudo, verificou-se que nenhum dos grupos eliminou em totalidade a microbiota bacteriana das amostras. Essa dificuldade em extinguir totalmente o conteúdo bacteriano também foi encontrada em outros estudos (CECHIN *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2017). Estatisticamente, a redução bacteriana foi superior no grupo 3, que utilizava o QMix como irrigante final, o que demonstra o grande benefício do QMix quanto a descontaminação dos canais radiculares mesmo sem utilização de ultrassom. O QMix é um irrigante relativamente novo que possui em sua composição clorexidina, EDTA 17%, e um agente surfactante, e, além disso, uma de suas características é conter pH ligeiramente acima do neutro (STOJICIC *et al.*, 2012). A clorexidina possui ação antimicrobiana de amplo espectro através da indução de modificações no equilíbrio osmótico celular a partir da interação iônica com a parede celular bacteriana (FERRAZ *et al.*, 2001). O EDTA 17% é um agente quelante, ou seja, remove *smear layer*, e o agente surfactante, tem como função tornar melhor a penetração da substância no sistema de canais radiculares através da diminuição da tensão superficial (GIARDINO, *et al.*, 2006). É através da união desses componentes que permitem essa eficiente ação antimicrobiana do QMix, sendo assim, é possível observar o porquê possui a maior remoção estatística de bactérias neste estudo. Portanto, para comprovar a aplicabilidade desse irrigante, estudos prévios mostraram a sua eficácia como irrigante final contra um biofilme formado por *Enterococcus faecalis* (STOJICIC *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2017).

Além do QMix, outra substância estudada foi o EDTA 17%, que é considerado o irrigante final mais empregado na odontologia para a remoção de *smear layer* (SOUZA *et al.*, 2019a). Sua ação antimicrobiana limitada (DAI *et al.*, 2011) junto com a pouca eficiência na remoção de *smear layer* do terço apical do canal (ALMEIDA *et al.*, 2016), são desvantagens que o EDTA 17% ainda possui quando se trata sobre ação antimicrobiana. Conforme demais estudos, SOUZA *et al.* (2019b) e MORGENTAL *et al.* (2013), pôde se observar que o EDTA 17% eliminou uma menor quantidade de bactérias quando comparado ao QMix, demonstrando assim, a sua ação antimicrobiana reduzida.

Situações limitantes em pesquisas são comuns de serem encontradas, sejam essas limitações metodológicas, laboratoriais ou microbiológicas. Como a coleta das amostras

microbiológicas neste estudo se aplicou apenas no interior da luz do canal radicular e não em profundidade nos túbulos dentinários do canal principal da amostra, não foi possível analisar a presença de bactérias nas porções profundas dos túbulos dentinários, nem a viabilidade dessas bactérias (SOUZA *et al.*, 2017). Como também, devido ao fato de que os canais radiculares de cada dente se diferem anatomicamente e que há diferentes quantidades e qualidades de microbiota nessas estruturas (STOJICIC *et al.*, 2012). Além disso, sabe-se que nos sistemas de canais dos dentes não há a presença apenas de *Enterococcus faecalis* (LYSAKOWSKA *et al.*, 2016), por esse motivo, através desse estudo, não foi possível relatar como os irrigantes finais testados reagiriam frente a diferentes espécies de bactérias.

A partir da leitura deste estudo, pode-se verificar que com a utilização do QMix há uma maior desinfecção quanto à remoção do *Enterococcus faecalis* no interior da luz do canal radicular, por isso, levando em conta a utilização clínica de uma solução irrigadora final, a indicação em minha concepção, seria o QMix. Como esse irrigante une o efeito antimicrobiano de amplo espectro da clorexidina, junto com o EDTA 17%, que é um ótimo agente quelante, obtêm-se um irrigante ótimo para a desinfecção de canais radiculares.

11. CONCLUSÃO

Conforme discutido e analisado o estudo, foi possível concluir que nenhum irrigante final eliminou totalmente as bactérias proliferadas no interior dos canais radiculares infectados com *Enterococcus faecalis*. Contudo, o QMix obteve ótimos resultados estatísticos quanto à eliminação de bactérias, sendo o grupo de irrigante final que possuiu a maior ação antimicrobiana. Já o EDTA 17%, obteve um resultado estatístico inferior ao do QMix, mostrando assim, que sua principal característica não é a atividade antimicrobiana.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.; HOOGENKAMP, M.; FELIPPE, W. T.; CRIELAARD, W.; VAN-DER-WAAL, S. V. Effectiveness of EDTA and Modified Salt Solution to Detach and Kill Cells from *Enterococcus faecalis* Biofilm. *J Endod*, v. 42, n. 2, p. 320–323, 2016.

ARIAS-MOLIZ, M. T.; CAMILLERI, J. The effect of the final irrigant on the antimicrobial activity of root canal sealers. *J Dent*, v. 52, p. 30–36, 2016.

BACA, P.; MENDOZA-LLAMAS, M. L.; ARIAS-MOLIZ, M. T.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M. P.; FERRER-LUQUE, C. M. Residual effectiveness of final irrigation regimens on *Enterococcus faecalis*-infected root canals. *J Endod*, v. 37, n. 8, p. 1121–1123, 2011.

CECCHIN, D.; FARINA, A. P.; SOUZA, M. A.; ALBARELLO, L. L.; SCHNEIDER, A. P.; VIDAL, C. M.; BEDRAN-RUSSO, A. K. Evaluation of antimicrobial effectiveness and dentine mechanical properties after use of chemical and natural auxiliary irrigants. *J Dent*, v. 43, n. 6, p. 695-702, 2015.

DAI, L.; KHECHEN, K.; KHAN, S.; GILLEN, B.; LOUSHINE, B. A.; WIMMER, C. E.; GUTMANN, J. L.; PASHLEY, D.; TAY, F. R. The effect of QMix, an experimental antibacterial root canal irrigant, on removal of canal wall smear layer and debris. *J Endod*, v. 37, n. 1, p. 80-4, 2011.

DU, T.; WANG, Z.; SHEN, Y.; MA, J.; CAO, Y.; HAAPASALO, M. Effect of long-term exposure to endodontic disinfecting solutions on young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. *J Endod*, v. 40, n. 4, p. 509–514, 2014.

FERRAZ, C. C.; GOMES, B. P.; ZAIA, A. A.; TEIXEIRA, F. B.; SOUZA-FILHO, F. J. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod*, v. 27, n. 7, p. 452-455, 2001.

FERRER-LUQUE, C. M.; CONDE-ORTIZ, A.; ARIAS-MOLIZ, M. T.; VALDERRAMA, M. J.; BACA, P. Residual activity of chelating agents and their combinations with cetrimide on root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *J Endod*, v. 38, n. 6, p. 826–828, 2012.

FIGDOR, D.; DAVIES, J. K.; SUNDQVIST, G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Molec Oral Microb*, v. 18, n. 4, p. 234–239, 2003.

GIARDINO, L.; AMBU, E.; BECCE, C.; RIMONDINI, L.; MORRA, M. Surface Tension Comparison of Four Common Root Canal Irrigants and Two New Irrigants Containing Antibiotic. *J Endod*, v. 32, n. 11, p. 1091-1093, 2006.

GOMES, B. P. F. A.; BERBER, V. B.; KOKARAS, A. S.; CHEN, T.; PASTER, B. J. Microbiomes of Endodontic-Periodontal Lesions before and after Chemomechanical Preparation. *J Endod*, v. 41, p. 1975–1984, 2015.

GRÜNDLING, G. L.; ZECHIN, J. G.; JARDIM, W. M.; OLIVEIRA, S. D.; FIGUEIREDO, J. A. P. Effect of ultrasonics on *Enterococcus faecalis* biofilm in a bovine tooth model. *J Endod*, v. 37, n. 8, p. 1128–1133, 2011.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H. R.; 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, n. 3, p. 340-349, 1965.

KAYAOGU, G.; ORSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, v. 15, n. 5, p. 308-320, 2004.

LYSAKOWSKA, M. E.; CIEBIADA-ADAMIEC, A.; SIENKIEWICZ, M.; SOKOLOWSKI, J.; BANASZEK, K. The cultivable microbiota of primary and secondary infected root canals, their susceptibility to antibiotics and association with the signs and symptoms of infection. *Int Endod J*, v. 49, n. 5, p. 422–430, 2016.

MOLLASHAHI, N. F.; SABERI, E.; KARKEHABADI, H. Evaluation of Cytotoxic Effects of Various Endodontic Irrigation Solutions on the Survival of Stem Cell of Human Apical Papilla. *Iran Endod J*, v. 11, n. 4, p. 293-297, 2016.

MORGENTAL, R. D.; SINGH, A.; SAPPAL, H.; KOPPER, P. M. P.; VIER-PELISSER, F. V.; PETERS, O. A. Dentin inhibits the antibacterial effect of new and conventional endodontic irrigants. *J Endod*, v. 39, n. 3, p. 406–410, 2013.

PEREZ-HEREDIA, M.; FERRER-LUQUE, C. M.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, M. P.; MARTIN-PEINADO, F. J.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, S. Decalcifying effect of 15% EDTA, 15% citric acid, 5% phosphoric acid and 2.5% sodium hypochlorite on root canal dentine. *Int J Endod*, v. 41, n. 5, p. 418–423, 2008.

PETERS, L. B.; WESSELINK, P. R.; MOORER, W. R. The fate and the role of bacteria left in root dentinal tubules. *Int Endod J*, v. 28, n. 2, p. 95-99, 1995.

PINHEIRO, E. T.; GOMES, B. P. F. A.; FERRAZ, C. C. R.; SOUSA, E. L. R.; TEIXEIRA, F. B.; FILHO, F. J. S. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int J Endod*, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2003.

SILLANPÄÄ, M. Environmental fate of EDTA and DTPA. *Rev Environ Contam Toxicol*, v. 152, p. 152-185, 1997.

SOARES, J. A.; CARVALHO, M. A. R.; SANTOS, S. M. C.; MENDONÇA, R. M. C.; RIBEIRO-SOBRINHO, A. P.; BRITO-JUNIOR, M. *et al.* Effectiveness of Chemomechanical Preparation with Alternating Use of Sodium Hypochlorite and EDTA in Eliminating Intracanal *Enterococcus faecalis* Biofilm. *J Endod*, v. 36, n. 5, p. 894–898, 2010.

SOUZA, M. A.; BONACINA, L. V.; RICCI, R.; RAUBER, M. G. P.; ZUCHI, N.; HOFFMANN, I. P. *et al.* Influence of final irrigation protocols and type of resin cement on bond strength of glass fiber posts in root dentin previously treated with photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 26, p. 224-228, 2019a.

SOUZA, M. A.; LANA, D. D.; GABRIELLI, E.; RIBEIRO M. B.; MIYAGAKI, D. C.; CECCHIN, D. Effectiveness of final decontamination protocols against *Enterococcus faecalis* and its influence on bond strength of filling material to root canal dentin. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, v. 31, n. 40, p. 92-97, 2017.

SOUZA, M. A.; DIAS, C. T.; ZANDONÁ, J.; HOFFMANN, I. P.; MENCHIK, V. H. S., PALHANO, H. S. *et al.* Antimicrobial activity of hypochlorite solutions and reciprocating

instrumentation associated with photodynamic therapy on root canals infected with *Enterococcus faecalis* - An in vitro study. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, v. 23, p. 347-352, 2018.

SOUZA, M. A.; HOFFMANN, I. P.; MENCHIK, V. H. S.; ZANDONA, J.; DIAS, C. T.; PALHANO, H. S. *et al.* Influence of ultrasonic activation using different final irrigants on antimicrobial activity, bond strength of filling material, and smear layer removal. *Aust Endod J*, v. 45, p. 209-215, 2019b.

STOJICIC, S.; SHEN, Y.; HAAPASALO, M. Effect of the Source of Biofilm Bacteria, Level of Biofilm Maturation, and Type of Disinfecting Agent on the Susceptibility of Biofilm Bacteria to Antibacterial Agents. *J Endod*, v. 39, n. 4, p. 473-477, 2013.

STOJICIC, S.; SHEN, Y.; QIAN, W.; JOHNSON, B.; HAAPASALO, M. Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMiX. *Int Endod J*, v. 45, n. 4, p. 363–371, 2012.

TORABINEJAD, M.; HANDYSIDES, R.; KHADEMI, A. A.; BAKLAND, L. K. Clinical implications of the smear layer in endodontics: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Rad and Endod*, v. 94, n. 6, p. 658-666, 2002.

VAUDT, J.; BITTER, K.; NEUMANN, K.; KIELBASSA, A. M. Ex vivo study on root canal instrumentation of two rotary nickel-titanium systems in comparison to stainless steel hand instruments. *Int J Endod*, v. 42, n. 1, p. 22-33, 2009.

WANG, Z.; SHEN, Y.; HAAPASALO, M. Effect of smear layer against disinfection protocols on *Enterococcus faecalis*-infected dentin. *J Endod*, v. 39, n. 11, p. 1395–1400, 2013.

ZHANG, C.; DU, J.; PENG, Z. Correlation between *Enterococcus faecalis* and Persistent Intraradicular Infection Compared with Primary Intraradicular Infection: A Systematic Review. *J Endod*, v. 41, n. 8, p. 1207–1213, 2015.

13. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO ALUNO

Prof. Dr. Matheus Albino Souza

14. ANEXOS

14.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE PASSO
FUNDO/ VICE-REITORIA DE
PESQUISA E PÓS-



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência da ativação ultrassônica nas propriedades de diferentes irrigantes finais e estudo in vitro.

Pesquisador: Huriel Scartazzini Palhano

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 04702818.9.0000.5342

Instituição Proponente: Universidade de Passo Fundo/Vice-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.110.552

Apresentação do Projeto:

O projeto foi apresentado na íntegra pelos pesquisadores

Avaliação da ação antimicrobiana de diferentes irrigantes finais utilizando a contagem de unidades formadoras de colônias

Evaluation of antimicrobial action of different final irrigants using the count of colony- forming units

Autores:

Dierro Soares Macci, graduando pela Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo, Departamento de Endodontia, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil.

Matheus Albino Souza, Doutor em Odontologia pela Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo, Departamento de Endodontia, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil.

Huriel Scartazzini Palhano, Doutor em odontologia pela Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo, Departamento de Endodontia, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil.

Correspondência

Dierro Soares Macci, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, BR 285/ São Jose, Prédio A7, CEP: 99052-900, Passo Fundo-RS - Brasil.

Telefone: (54) 996921844

E-mail: 152777@upf.br

RESUMO

Objetivo: Avaliar, *in vitro*, a ação antimicrobiana do EDTA 17% e do QMix contra *Enterococcus faecalis*, por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs).

Métodos: Trinta dentes humanos extraídos unirradiculares foram utilizados para o presente

estudo. A porção coronária foi seccionada com um disco de diamante na junção amelocementária, de forma que a raiz remanescente apresentasse um comprimento de aproximadamente 15 mm. Em seguida, as amostras foram esterilizadas em autoclave por 30 minutos a uma temperatura de 120°C. Após o processo de esterilização, as amostras foram inoculadas com 100 µl de cultura de *Enterococcus faecalis* e imersas em microtubos contendo 2 mL de BHI (*Brain Heart Infusion*). As amostras foram mantidas imersas em cultura bacteriana por quatorze dias e armazenadas em estufa bacteriológica a uma temperatura de 37°C, com renovação do meio de cultura a cada 48 horas, provendo os nutrientes necessários para sustentar o crescimento bacteriano. Após o período de contaminação, as amostras foram divididas aleatoriamente em três grupos (n=10) de acordo com o protocolo de irrigação final: G1: água destilada; G2: EDTA 17%; G3: QMix. A contagem das UFCs foram realizadas para avaliar a eficácia de descontaminação dos tratamentos propostos. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA), seguido pelo *post-hoc* de Tukey ($\alpha=0,05$). **Resultados:** Nenhum dos grupos eliminou totalmente o conteúdo bacteriano, como também, que o QMix foi o irrigante que gerou a maior descontaminação bacteriana das amostras. **Conclusão:** A ação antimicrobiana foi maior quando usado o QMix.

Palavras chaves: endodontia; EDTA; *Enterococcus faecalis*; irrigantes do canal radicular.

INTRODUÇÃO

As alterações pulpares e dos tecidos periapicais apresentam natureza inflamatória e etiologia microbiana, onde bactérias e seus subprodutos exercem um papel significativo na indução e, principalmente, na progressão destas patologias¹. Dentre os microorganismos encontrados na microbiota endodôntica, se destaca o *Enterococcus faecalis*, que é um microorganismo anaeróbio facultativo, altamente resistente ao preparo químico-mecânico convencional e

usualmente encontrado nos casos de insucesso do tratamento endodôntico². Além disso, as complexidades anatômicas do sistema de canais radiculares impedem que os microorganismos sejam alcançados de forma adequada pelos instrumentos endodônticos³.

Dessa forma, o uso de substâncias químicas auxiliares, em associação com os instrumentos endodônticos, se faz necessário para promover uma adequada descontaminação do sistema de canais radiculares. No entanto, durante este processo, ocorre a liberação de raspas de dentina, que, associadas aos componentes orgânicos, microorganismos e substâncias químicas auxiliares, dão origem a uma camada denominada de *smear layer*. Esta camada adere à superfície dentinária e promove a obliteração dos túbulos dentinários, impedindo a penetração de agentes antimicrobiano⁴. Neste cenário, o uso de irrigantes se faz necessário, para promover a remoção desta camada.

O objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, a ação antimicrobiana do EDTA 17% e do QMix em um modelo de canais radiculares infectados com *Enterococcus faecalis*, por meio da contagem de unidades formadoras de colônias.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi submetido à apreciação do comitê de ética e pesquisa da Universidade de Passo Fundo, sendo aprovado sob número de protocolo 3.110.552.

Obtenção e preparo das amostras

Trinta dentes unirradiculares humanos extraídos obtidos através do biobanco da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo foram utilizados para o presente estudo.

A porção coronária foi seccionada na junção amelocementária, de forma que o remanescente radicular apresente um comprimento de 15 mm. Foi utilizado para o corte, um disco de diamante rotativo (KG Sorensen Dupla face modelo 1802.7015), acoplado na peça reta de baixa rotação, utilizando água para refrigeração.

Todas as raízes foram preparadas utilizando o mesmo protocolo, no intuito de remover o tecido pulpar e padronizar o diâmetro do canal. O comprimento de trabalho fora estabelecido através da introdução de uma lima tipo-K no 10 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) no canal radicular, até que sua ponta fosse visualizada no forame apical. A partir desta medida foi reduzido 1 mm, estabelecendo o comprimento de trabalho. O preparo cervical foi realizado com broca Largo no 3 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) e a ampliação apical foi realizada com o sistema rotatório ProTaper (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça), seguindo a sequência de limas S1, S2, F1, F2 e F3. Todos os instrumentos foram utilizados no comprimento de trabalho, com velocidade de 250 rpm e torque de 2 N, programados previamente no motor X-Smart Plus (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça). A substância química auxiliar utilizada durante a instrumentação das raízes foi água destilada (Decloquimis, São Paulo, SP, Brasil) e, após a instrumentação, foi realizada uma lavagem final com 3 mL de EDTA 17% (Iodontosul, Porto Alegre, RS, Brasil), para a remoção de *smear layer*.

Após a conclusão da padronização do diâmetro dos canais radiculares, foi realizado o vedamento do forame apical com resina fotopolimerizável Opallis (FGM, Joinville, SC, Brasil), para evitar o extravasamento das substâncias testadas durante o experimento. A impermeabilização externa das raízes também foi realizada através de duas aplicações de adesivo a base de cianoacrilato. (SuperBonder – Henkel, São Paulo, SP, Brasil). Cada raiz foi fixada com silicone de condensação Putty-C para Impressão (Silon2APS - Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil) em um microtubo plástico (Axygen Inc, Union City, CA, EUA), de modo que a porção cervical ficasse posicionada para cima.

As amostras foram alocadas em caixas de polipropileno (Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, Estados Unites) e esterilizadas à temperatura de 120 °C em autoclave (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil), por um período de 30 minutos.

Controle de esterilização

Um dente foi selecionado aleatoriamente e submetido ao controle de esterilização. O dente selecionado foi preenchido com 2 mL de solução salina estéril (Decloquimis, São Paulo, SP, Brasil), e, após 5 minutos, um cone de papel estéril com calibre #45 (Tanari, Manaus, AM, Brasil) foi colocado em contato com as paredes do canal durante 30 segundos. Em seguida, o cone de papel foi transportado individualmente para microtubos plásticos (Axygen Inc, Union City, CA, EUA) contendo 1 ml de solução salina estéril (Decloquimis, São Paulo, SP, Brasil). O material foi homogeneizado e semeado em placas de Petri com meio de cultura PCA (Plate Count Agar) através da técnica da gota, sendo pingadas cinco gotas de 15 μ L. A placa foi incubada a 37 °C durante 48h, a fim de verificar o crescimento bacteriano.

Preparo do inóculo

A estirpe de referência microbiana utilizada foi *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) (Figura 1a), obtida no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Passo Fundo. As bactérias foram ativadas e cultivadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) (Figura 1b) durante 24h a 37 °C em uma estufa bacteriológica. Após o período de incubação, o grau de turbidez do inóculo foi ajustado de acordo com a escala 1,0 de McFarland (Figura 1c), que corresponde a $3,0 \times 10^8$ UFC/ml, referente a uma densidade óptica de 0,25 a 550 nm.

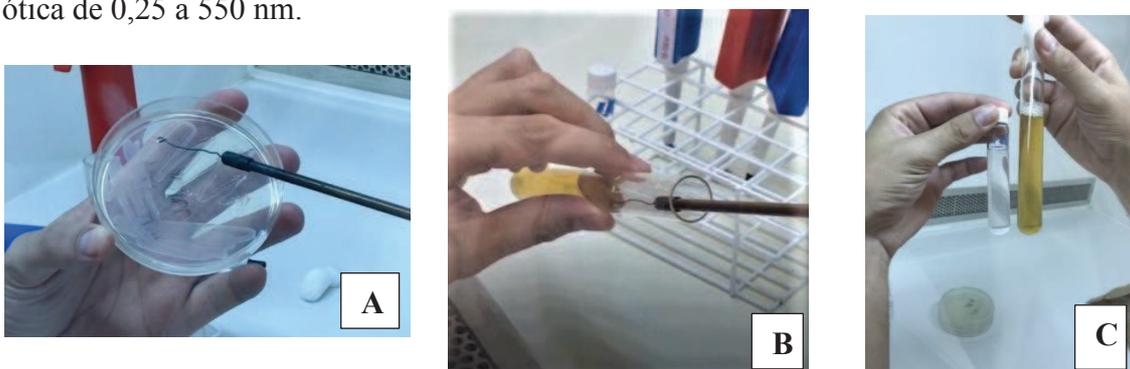


Figura 1. Preparo do inóculo. A) placa de Petri com *Enterococcus faecalis*; B) inserção das bactérias no caldo BHI para serem cultivadas; C) ajuste de turbidez do inóculo.

Contaminação dos canais radiculares

Uma alíquota de 100 µL do inóculo de *Enterococcus faecalis* contido no tubo de ensaio foi inserida no interior dos canais radiculares até o seu completo preenchimento, utilizando seringas descartáveis de 1 mL. A cultura de *Enterococcus faecalis* foi mantida durante 14 dias, a fim de promover o crescimento de bactérias e a formação de biofilme, renovando o caldo BHI a cada 48h. Todos os procedimentos foram realizados sob condições assépticas em uma câmara de fluxo laminar.

A cada 48h, uma amostra foi escolhida aleatoriamente para ser submetida ao controle microbiano, no intuito de verificar a ausência de contaminação por outras espécies microbianas, garantindo uma cultura pura de *Enterococcus faecalis*. Um cone de papel estéril com calibre #35 (Tanari, Manaus, AM, Brasil) foi introduzido no canal radicular e mantido em contato com as paredes do canal radicular, durante 30 segundos. Em seguida, o cone foi transferido para um microtubo de plástico estéril contendo 1 mL de solução salina estéril, que foi homogeneizada em um agitador e, então, realizada a semeadura através da técnica das gotas, sendo pingadas cinco gotas de 15 µL em placas de Petri contendo PCA. A placa foi incubada a 37°C durante 48h e, em seguida, foi realizada análise da morfologia das unidades formadoras de colônias (UFCs), bem como análise de coloração de Gram, a fim de verificar a confirmação de contaminação somente por *Enterococcus faecalis*.

Avaliação de descontaminação dos protocolos testados

Após o período de 14 dias de contaminação com *Enterococcus faecalis*, as trinta amostras foram divididas em três grupos (n=10), de acordo com os protocolos de lavagem final utilizados para remoção da *smear layer* das paredes dos canais radiculares, como segue: G1 – água destilada (controle); G2 – EDTA 17%; G3 – QMix.

Os canais radiculares foram preenchidos com os irrigantes finais testados, que permaneceram em contato com as paredes do canal pelo período de 30 segundos. Após este

período, foi realizada irrigação com 5 ml de água destilada. Para a inserção dos irrigantes finais testados no interior dos canais radiculares foi utilizada seringa descartável estéril e agulha de calibre 30 (Navi-Tip - Ultradent, South Jordan, UT, Estados Unidos).

Ao término dos protocolos de irrigação final, os canais radiculares de todos os grupos foram aspirados e secos com cones de papel absorvente F3 do sistema rotatório ProTaper (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça).

Realização das coletas e análise microbiológica

A coleta do conteúdo microbiano do interior do canal radicular das amostras foi realizada em dois momentos. A primeira coleta (S1) foi realizada imediatamente após o período de contaminação das amostras e a segunda coleta (S2) foi realizada imediatamente após os protocolos de irrigação final testados.

As coletas (S1 e S2) foram realizadas da mesma forma. O canal radicular foi preenchido com solução salina estéril e uma ponta de papel absorvente estéril calibre #35 foi introduzida no interior do canal radicular, realizando movimentos circulares, no intuito de encostar intencionalmente em todas as paredes do canal, pelo período de 30 segundos (Figura 4a). Depois disso, a ponta de papel absorvente foi transferida para um microtubo contendo 1 ml de solução salina estéril (Figura 4b). O material foi homogeneizado e diluído até 10^{-3} (Figura 4c). Alíquotas foram semeadas em placas de Petri contendo PCA através da técnica das gotas, no local correspondente da diluição utilizada (Figura 4d). As placas foram incubadas durante 24 horas a uma temperatura de 37°C. Após o período de incubação, a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFCs) foi realizada nas placas (Figura 4e).

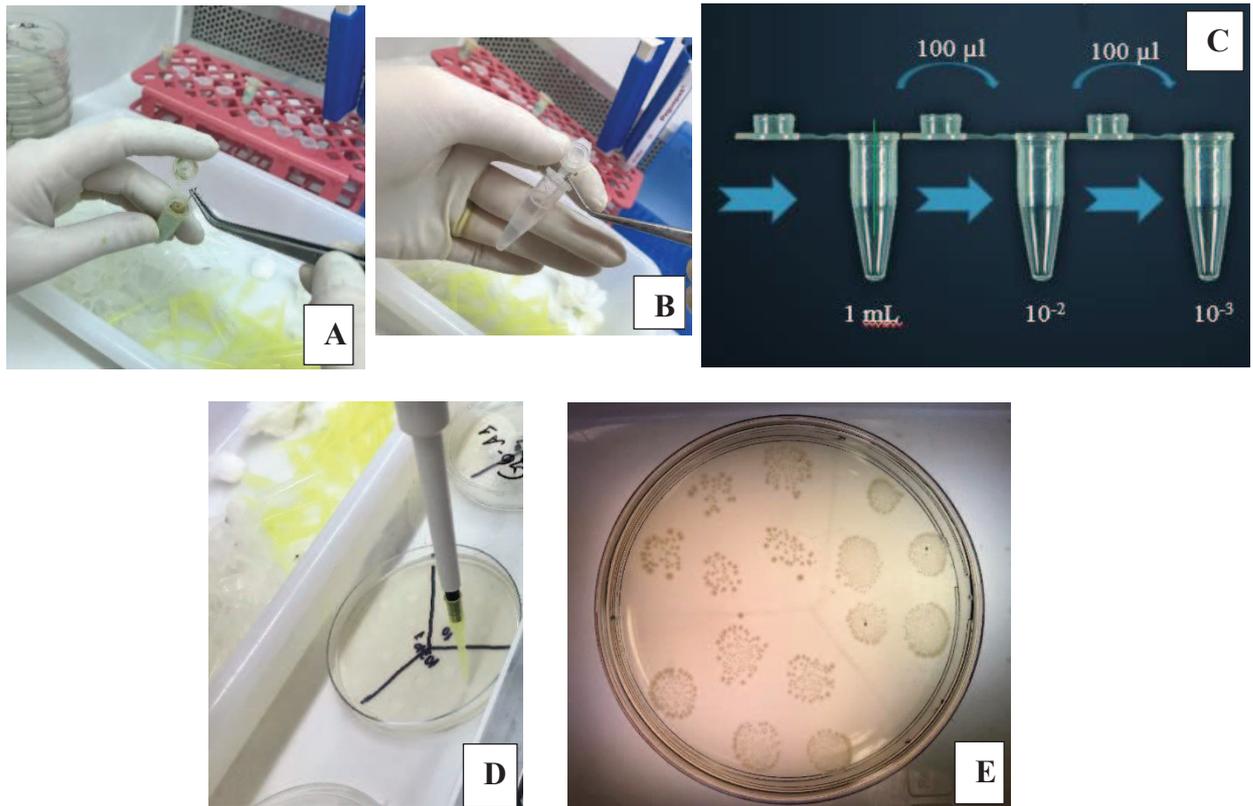


Figura 4. Coleta das amostras. A) papel absorvente no interior do canal radicular; B) papel absorvente no interior do microtubo; C) diluição do material; D) sementeação das alíquotas nas placas de Petri; E) contagem do número de UFCs

Análise estatística

A análise estatística foi realizada calculando o percentual de redução de *Enterococcus faecalis* a partir da contagem inicial e final de unidades formadoras de colônias nos diferentes grupos de protocolos de irrigação final, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Percentual de redução} = 100 - [(\text{Valor final}/\text{Valor inicial}) \times 100].$$

One-way ANOVA foi aplicado na avaliação microbiológica, seguido pelo procedimento de *post hoc* de Tukey, a 5% de nível de significância. Os dados foram analisados utilizando o programa SPSS versão 17.0 (SPSS, Chicago, IL, Estados Unidos).

RESULTADOS

A média e o desvio padrão do percentual de redução de *Enterococcus faecalis*, de cada grupo estão expressos na Tabela 1. Nenhum dos tratamentos propostos apresentou 100% de redução de *Enterococcus faecalis*.

Durante a análise dos dados obtidos, foi observado que a maior capacidade de redução bacteriana ocorreu no grupo 3 (QMix), sendo estatisticamente superior aos demais grupos testados ($p < 0,05$). Em contraponto, o grupo que reduziu a menor quantidade de bactérias foi o grupo 1 (DW).

Tabela 1: média e desvio padrão da porcentagem da redução de *Enterococcus faecalis* dos protocolos finais de irrigação testados.

Grupo	N	Redução bacteriana (%)
DW	10	11.60 ± 1.86^a
EDTA 17%	10	25.41 ± 2.13^b
QMix	10	85.75 ± 3.86^c

* Os dados são apresentados como média e desvio padrão. Diferentes letras indexadas representam diferenças estatisticamente significantes no procedimento post hoc (teste de Tukey).

** DW = água destilada

DISCUSSÃO

A necessidade de realizar intervenção endodôntica se dá quando a polpa dentária, por algum motivo, sofreu alguma alteração e está em processo de necrose ou já necrosou. No interior dos canais e na região periapical dos dentes encontram-se bactérias resistentes que impedem a cicatrização dos tecidos periapicais, por esse motivo, a necessidade de realizar uma desinfecção com irrigantes antimicrobianos é essencial⁵. A bactéria mais encontrada em

casos de dentes com canais radiculares infectados é *Enterococcus faecalis*⁶, que é uma bactéria gram-positiva, anaeróbia facultativa e uma espécie frequentemente isolada em raízes dentárias com lesões periapicais persistentes⁷. Uma das características das *Enterococcus faecalis* é poder sobreviver em situações nutricionais inadequadas e poder se manter viável como um único microrganismo⁸. Além disso, tem a capacidade de penetrar nos túbulos dentinários e é capaz de promover a formação de biofilme⁹, o que cria uma matriz polimérica extracelular que aumenta a resistência dos microrganismos a protocolos de irrigação¹⁰. Por esses motivos, o *Enterococcus faecalis* foi a bactéria escolhida para induzir biofilme bacteriano *in vitro* em túbulos dentinários neste estudo de desinfecção¹¹.

Quando um estudo tem a necessidade de realizar crescimento de bactérias e formação de biofilme de apenas uma espécie específica, um ambiente especial e um tempo determinado de proliferação bacteriana devem ser instituídos. Para esta pesquisa, a escolha por realizar 14 dias de crescimento de bactérias e a formação de biofilme foi determinada através de estudos prévios que comprovam que 14 dias é um período suficiente para a formação do biofilme de *Enterococcus faecalis* na dentina radicular^{12 13}. Comparando com outros estudos, foi utilizado 50 dias de cultura e preparação do inóculo em seu protocolo¹⁴; em outro, foi utilizado 60 dias de contaminação das amostras para o crescimento da bactéria¹⁵, o que demonstra que ainda não há um protocolo padrão para se seguir quando se quer testar a eficácia dos protocolos de descontaminação.

A técnica utilizada neste estudo para a contagem das bactérias que se proliferaram e cresceram no interior do canal radicular das amostras, foi através das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs). O principal objetivo das UFCs é fazer uma contagem com o intuito de calcular a redução percentual de *Enterococcus faecalis* em cada um dos grupos¹⁶. Essa técnica foi escolhida, porque permite realizar uma quantificação das colônias bacterianas a partir do espaço do canal em que foi feita a coleta de um modo que seja aceitável¹⁷. Já o

tempo de permanência dos irrigantes finais nas paredes do canal radicular das amostras foi determinado em 30 segundos. Em estudos similares^{18 19}, é comprovado que o tempo de 1 minuto é suficiente para a correta atuação dos irrigantes com ação antimicrobiana sobre a dentina radicular infectada. No entanto, a proposta do presente estudo seria reduzir ainda mais o tempo de contato dos agentes quelantes no interior do canal radicular, minimizando os riscos de danos à estrutura dentinária.

A partir dos resultados encontrados neste estudo, verificou-se que nenhum dos grupos eliminou em totalidade a microbiota bacteriana das amostras. Essa dificuldade em extinguir totalmente o conteúdo bacteriano também foi encontrada em outro estudo²⁰. Estatisticamente, a redução bacteriana foi superior no grupo 3, que utilizava o QMix como irrigante final, o que demonstra o grande benefício do QMix quanto a descontaminação dos canais radiculares mesmo sem utilização de ultrassom. O QMix é um irrigante relativamente novo que possui em sua composição clorexidina, EDTA 17%, e um agente surfactante, e, além disso, uma de suas características é conter pH ligeiramente acima do neutro²¹. A clorexidina possui ação antimicrobiana de amplo espectro através da indução de modificações no equilíbrio osmótico celular a partir da interação iônica com a parede celular bacteriana²². O EDTA 17% é um agente quelante, ou seja, remove *smear layer*, e o agente surfactante, tem como função tornar melhor a penetração da substância no sistema de canais radiculares através da diminuição da tensão superficial²³. É através da união desses componentes que permitem essa eficiente ação antimicrobiana do QMix, sendo assim, é possível observar o porquê possui a maior remoção estatística de bactérias neste estudo. Portanto, para comprovar a aplicabilidade desse irrigante, estudos prévios mostraram a sua eficácia como irrigante final contra um biofilme formado por *Enterococcus faecalis*^{16 21 24}.

Além do QMix, outra substância estudada foi o EDTA 17%, que é considerado o irrigante final mais empregado na odontologia para a remoção de *smear layer*²⁵. Sua ação

antimicrobiana limitada²⁶ junto com a pouca eficiência na remoção de *smear layer* do terço apical do canal²⁷, são desvantagens que o EDTA 17% ainda possui quando se trata sobre ação antimicrobiana. Conforme demais estudos^{19,28}, pôde se observar que o EDTA 17% eliminou uma menor quantidade de bactérias quando comparado ao QMix, demonstrando assim, a sua ação antimicrobiana reduzida.

CONCLUSÃO

Conforme discutido e analisado o estudo, foi possível concluir que nenhum irrigante final eliminou totalmente as bactérias proliferadas no interior dos canais radiculares infectados com *Enterococcus faecalis*. Contudo, o QMix obteve ótimos resultados estatísticos quanto à eliminação de bactérias, sendo o grupo de irrigante final que possuiu a maior ação antimicrobiana. Já o EDTA 17%, obteve um resultado estatístico inferior ao do QMix, mostrando assim, que sua principal característica não é a atividade antimicrobiana.

REFERÊNCIAS

1. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod 1965; 20(3): 340-49.
2. Pinheiro ET, Gomes BPF, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Filho FJS. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. Int J Endod 2003; 36 (1): 1-11.
3. Vaudt J, Bitter K, Neumann K, Kielbassa AM. Ex vivo study on root canal instrumentation of two rotary nickel-titanium systems in comparison to stainless steel hand instruments. Int J Endod 2009; 42 (1): 22-33.

4. Torabinejad M, Handysides R, Khademi AA, Bakland LK. Clinical implications of the smear layer in endodontics: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Rad and Endod* 2002; 94 (6): 658-66.
5. Molander A, Warfvinge J, Reit C, Kvist T. Clinical and radiographic evaluation of one- and two-visit endodontic treatment of asymptomatic necrotic teeth with apical periodontitis: a randomized clinical trial (2007) apud Soares JA, Carvalho MAR, Santos SMC, Mendonça RMC, Ribeiro-Sobrinho AP, Brito-Junior M, et al. Effectiveness of Chemomechanical Preparation with Alternating Use of Sodium Hypochlorite and EDTA in Eliminating Intracanal *Enterococcus faecalis* Biofilm. *J Endod* 2010; 36 (5): 894–98.
6. Lysakowska ME, Ciebiada-Adamiec A, Sienkiewicz M, Sokolowski J, Banaszek K. The cultivable microbiota of primary and secondary infected root canals, their susceptibility to antibiotics and association with the signs and symptoms of infection. *Int Endod J* 2016; 49 (5): 422–30.
7. Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15 (5): 308-20.
8. Zhang C, Du J, Peng Z. Correlation between *Enterococcus faecalis* and Persistent Intraradicular Infection Compared with Primary Intraradicular Infection: A Systematic Review. *J Endod* 2015; 41 (8): 1207–13.
9. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Molec Oral Microb* 2003; 18 (4): 234–39.
10. Stojicic S, Shen Y, Haapasalo M. Effect of the Source of Biofilm Bacteria, Level of Biofilm Maturation, and Type of Disinfecting Agent on the Susceptibility of Biofilm Bacteria to Antibacterial Agents. *J Endod* 2013; 39 (4): 473-77.

11. Du T, Wang Z, Shen Y, Ma J, Cao Y, Haapasalo M. Effect of long-term exposure to endodontic disinfecting solutions on young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. J Endod 2014; 40 (4): 509–14.
12. Guerreiro-Tanomaru JM, Vázquez-García FA, Bosso-Martelo R, Bernardi MIB, Faria G, Filho MT. Effect of addition of nano-hydroxyapatite on physico-chemical and antibiofilm properties of calcium silicate cements. J Appl Oral Sci 2016; 24 (3): 204-10.
13. Souza MA, Dias CT, Zandoná J, Hoffmann I P, Menchik VHS, Palhano HS, et al. Antimicrobial activity of hypochlorite solutions and reciprocating instrumentation associated with photodynamic therapy on root canals infected with *Enterococcus faecalis* - An in vitro study. Photodiagnosis Photodyn Ther 2018; 23: 347-52.
14. Gründling GL, Zechin JG, Jardim WM, Oliveira SD, Figueiredo JAP. Effect of ultrasonics on *Enterococcus faecalis* biofilm in a bovine tooth model. J Endod 2011; 37 (8): 1128–33.
15. Baca P, Mendoza-Llamas ML, Arias-Moliz MT, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. Residual effectiveness of final irrigation regimens on *Enterococcus faecalis*-infected root canals. J Endod 2011; 37 (8): 1121–23.
16. Souza MA, Lana DD, Gabrielli E, Ribeiro MB, Miyagaki DC, Cecchin D. Effectiveness of final decontamination protocols against *Enterococcus faecalis* and its influence on bond strength of filling material to root canal dentin. Photodiagnosis Photodyn Ther 2017; 17: 92-7.
17. Peters LB, Wesselink PR, Moorer WR. The fate and the role of bacteria left in root dentinal tubules. Int Endod J 1995; 28 (2): 95-9.
18. Arias-Moliz MT, Camilleri J. The effect of the final irrigant on the antimicrobial activity of root canal sealers. J Dent 2016; 52: 30–6.

19. Souza MA, Hoffmann IP, Menchik VHS, Zandona J, Dias CT, Palhano HS, et al. Influence of ultrasonic activation using different final irrigants on antimicrobial activity, bond strength of filling material, and smear layer removal. *Aust Endod J* 2019; 45: 209-15.
20. Cecchin D, Farina AP, Souza MA, Albarello LL, Schneider AP, Vidal CM, Bedran-Russo AK. Evaluation of antimicrobial effectiveness and dentine mechanical properties after use of chemical and natural auxiliary irrigants. *J Dent* 2015; 43 (6): 695-702.
21. Stojicic S, Shen Y, Qian W, Johnson B, Haapasalo M. Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMiX. *Int Endod J* 2012; 45 (4): 363–71.
22. Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod* 2001; 27 (7): 452-55.
23. Giardino L, Ambu E, Becce C, Rimondini L., Morra M. Surface Tension Comparison of Four Common Root Canal Irrigants and Two New Irrigants Containing Antibiotic. *J Endod* 2006; 32 (11): 1091-93.
24. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effect of smear layer against disinfection protocols on *Enterococcus faecalis*-infected dentin. *J Endod* 2013; 39 (11): 1395–1400.
25. Souza MA, Bonacina LV, Ricci R, Rauber MGP, Zuchi N, Hoffmann IP, et al. Influence of final irrigation protocols and type of resin cement on bond strength of glass fiber posts in root dentin previously treated with photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2019; 26: 224-28.
26. Dai L., Khechen K, Khan S, Gillen B, Loushine BA, Wimmer CE, Gutmann JL, Pashley D, Tay FR. The effect of QMix, an experimental antibacterial root canal

- irrigant, on removal of canal wall smear layer and debris. J Endod 2011; 37 (1): 80-4.
27. Almeida J, Hoogenkamp M, Felipe WT, Crielaard W, Van-Der-Waal SV. Effectiveness of EDTA and Modified Salt Solution to Detach and Kill Cells from *Enterococcus faecalis* Biofilm. J Endod 2016; 42 (2): 320–23.
28. Morgental RD, Singh A, Sappal H, Kopper PMP, Vier-Pelisser FV, Peters OA. Dentin inhibits the antibacterial effect of new and conventional endodontic irrigants. J Endod 2013; 39 (3): 406–10.