

AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DE SOLUÇÕES QUELANTES NA CAPACIDADE ANTIMICROBIANA DO HIPOCLORITO DE SÓDIO

RITA AZEVEDO SENNA¹; FERNANDA GERALDO PAPPEN²; ANDRESSA RAQUEL SPOHR³; RENATA DORNELLES MORGENTAL⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – ritinhaah@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – ferpappen@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – dessa_spoehr@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – remorgental@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os irrigantes do canal radicular desempenham um papel significativo na eliminação de microrganismos, na dissolução de tecidos, na remoção de detritos e da camada residual formada pela ação dos instrumentos endodônticos nas paredes do canal radicular, também denominada smear layer (ZEHNDER et al., 2005). Nenhuma solução é capaz de cumprir essas ações completamente; por conseguinte, sua associação é necessária.

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é reconhecido mundialmente como a solução irrigadora mais utilizada na Endodontia (SIQUEIRA et al., 2000; PAPPEN et al., 2010; ROSSI-FEDELE et al., 2012). Os agentes quelantes, capazes de remover a smear layer, podem ser utilizados alternadamente à irrigação com NaOCl durante o preparo do canal (BAUMGARTNER; MADER, 1987). Porém, as interações entre o NaOCl e os agentes quelantes foram pouco investigadas. GRAWEHR et al. (2003) avaliaram a relação entre o NaOCl 1% e EDTA 17%, quando utilizados concomitantemente. Constatou-se que o EDTA reduziu a capacidade do NaOCl em dissolver tecido orgânico, mas não alterou a capacidade antimicrobiana das soluções. Por sua vez, ZEHNDER et al. (2005) avaliaram as interações entre NaOCl 1% e EDTA 17% em proporções 1:1, 1:10 e 1:100, e demonstraram que o efeito antimicrobiano do NaOCl foi negativamente alterado na presença da solução de EDTA. No entanto, outras concentrações de NaOCl e o ácido cítrico, também utilizado na remoção de smear layer, não foram avaliados.

Uma vez que o uso de agentes quelantes, alternados durante toda a instrumentação dos canais radiculares à irrigação com NaOCl é preconizado por diferentes autores (BAUMGARTNER; MADER, 1987; PÉCORA 1993; CAMERON 1995a, 1995b), por trazer vantagens em relação à limpeza das paredes dentinárias, torna-se relevante o presente estudo. O objetivo desta pesquisa, então, é avaliar a interferência de duas soluções quelantes (EDTA e ácido cítrico) na capacidade antimicrobiana do NaOCl.

2. METODOLOGIA

As soluções de NaOCl e EDTA foram preparadas a partir de soluções a 6% e 17%, respectivamente (Uso Indicado - Farmácia de Manipulação, Pelotas, RS, Brasil). As diferentes soluções foram diluídas serialmente em água esterilizada imediatamente antes do seu uso, obtendo-se soluções de NaOCl com concentrações entre 6% e 0.08% e de EDTA entre 17% e 0.25%. No ensaio

antimicrobiano, a concentração final do NaOCl, do EDTA e do ácido cítrico foi um terço das concentrações originais após a mistura das soluções teste com a suspensão de microrganismos. Os experimentos serão futuramente realizados com ácido cítrico, em substituição ao EDTA, nas mesmas concentrações já descritas.

Neste estudo foi empregada uma cepa de *Enterococcus faecalis* (VP3-181, UBC Microbiology Department Collection). Os microrganismos foram incubados em aerobiose, a 37°C, em placas contendo TSA (Tryptic Soy Agar; Difco, Detroit, MI, EUA) durante 12 horas. Após a verificação de ausência de contaminação da cultura de *E. faecalis*, foi feita uma suspensão deste microrganismo em água esterilizada, buscando-se através de leitura com espectrofotômetro, uma densidade celular de 4×10^7 unidades formadoras de colônia por mililitro (ufc/mL).

Em um primeiro experimento, utilizando pipetas multicanal (Discovery Comfort; HTL, Warsaw, Polônia), volumes iguais de 50µL de NaOCl (concentrações entre 6% e 0.08%) e EDTA (concentrações entre 17% e 0.25%) foram introduzidos em uma placa de cultura celular de 96 poços (Sarstedt, Newton, NC, EUA). Após 5 minutos, 50µL de suspensão bacteriana foram adicionados à mistura de solução quelante e NaOCl. Dois grupos controles foram incluídos neste experimento: no primeiro, água esterilizada substituiu o NaOCl, combinada a todas as concentrações de EDTA; no segundo, água esterilizada foi utilizada no lugar da solução quelante, medindo a ação antimicrobiana do NaOCl sem a presença de potenciais inibidores.

Após um período de 5 minutos em temperatura ambiente, 20µL das misturas teste foram transferidos para uma segunda placa de cultura celular de 96 poços, contendo 180µL de tiosulfato de sódio a 5%, utilizado para inativação do NaOCl. Em seguida, 20µL do conteúdo de cada poço da segunda placa foram transferidos para 180µL de TSB (Tryptic Soy Broth; Difco, USA) contidos em uma terceira placa.

Os experimentos serão futuramente realizados com outros períodos experimentais (30 segundos e 30 minutos). Até o momento só foi realizado um estudo piloto com o período intermediário de 5 minutos.

As placas foram então seladas com parafilme, e incubadas a 37°C por 7 dias. Foi avaliada a presença de turbidez, indicativa de crescimento bacteriano, nos períodos de 24, 48, 72 horas e 7 dias.

Um segundo experimento similar ao primeiro foi executado, alterando a ordem em que as substâncias foram colocadas em contato, com o intuito de verificar se variações metodológicas podem influenciar os resultados. Assim sendo, neste segundo experimento, volumes iguais de 50µL de soluções de NaOCl e de EDTA foram adicionados simultaneamente à suspensão bacteriana já presente em uma placa de cultura celular de 96 poços. Novamente, dois grupos controles foram estabelecidos e o restante do segundo experimento foi realizado conforme descrito para o primeiro.

Cada experimento, com EDTA e com ácido cítrico, será realizado em triplicata. Além disso, após o período de 7 dias, alíquotas de 7µL de TSB de cada poço serão plaqueadas em TSA (Difco, USA) com o objetivo de confirmar a leitura visual dos resultados.

Com o objetivo de verificar a inativação do NaOCl pela solução de tiosulfato de sódio a 5%, os seguintes controles serão incluídos no estudo: em um teste paralelo, 5µL de suspensão bacteriana (4×10^7 cfu/mL) serão adicionados aos poços contendo TSB. Ao verificar a presença de crescimento bacteriano em cada poço, se tem a confirmação de que nos poços onde não foi verificado o crescimento, isto não seria em decorrência do efeito residual (carry-over) do NaOCl.

O crescimento bacteriano será definido como 0 = sem crescimento nas três avaliações (triplicata), 1 = crescimento parcial, quando um ou dois testes apresentaram crescimento bacteriano, e 2 = crescimento total, quando nas três repetições, os testes resultaram em crescimento bacteriano. Estes resultados serão acessados pelo teste Cohen's Kappa para verificar a confiabilidade das repetições. A presença de crescimento será comparada com os tempos de incubação e as concentrações dos quelantes e NaOCl, aplicando-se a correlação de Spearman ($P < 0.05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Até o momento foi realizado um estudo piloto com o período experimental intermediário de 5 minutos. O atraso em relação ao andamento do projeto deve-se a problemas técnicos relacionados à adaptação das ponteiros nas pipetas multicanal. Foram testadas diferentes marcas de ponteiros até encontrar uma que se adaptasse adequadamente às pipetas da marca "Discovery Comfort", presentes no Laboratório de Microbiologia da FO-UFPel.

Os resultados preliminares do estudo piloto demonstraram que no primeiro experimento, onde NaOCl e EDTA ficaram em contato antes da adição da suspensão bacteriana, o efeito antimicrobiano do NaOCl foi prejudicado e houve maior crescimento de *E. faecalis*, principalmente para as concentrações menores. Já no segundo experimento, onde NaOCl e EDTA foram levados à suspensão bacteriana simultaneamente, o NaOCl conseguiu exercer sua ação antimicrobiana, havendo menor crescimento bacteriano.

Tais resultados são coerentes com relatos prévios da literatura, os quais demonstram que a mistura de NaOCl com soluções ácidas resulta em rápida reação química, com formação de gás cloro e, conseqüentemente, perda de cloro, o principal elemento responsável pela ação bactericida do NaOCl (GUERREIRO-TANOMARU et al., 2011; DORNELLES-MORGENTHAU et al. 2011). Desta forma, pode-se sugerir que na prática clínica, a mistura das soluções na seringa, antes de levar ao canal radicular, não estaria indicada. Para os próximos meses estão programados os experimentos em triplicata, tanto com EDTA quanto com ácido cítrico. Certamente, tais experimentos precisam ser concluídos para que tais considerações sejam confirmadas.

4. CONCLUSÕES

O estágio atual dos experimentos ainda não permite o estabelecimento de conclusões.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAUMGARTNER, J.C.; MADER, C.L. A scanning electron microscopic evaluation of four root canal irrigation regimens. **Journal of Endodontics**, New York, v.13, n.4, p.147-157, 1987.

CAMERON, J.A. The choice of irrigant during hand instrumentation and ultrasonic irrigation of the root canal: a scanning electron microscope study. **Australian Dental Journal**, Sydney, v.40, n.2, p.85-90, 1995.

CAMERON, J.A. Factors affecting the clinical efficiency of ultrasonic endodontics: a scanning electron microscopy study. **International Endodontic Journal**, Oxford, v.28, n.1, p.47-53, 1995.

DORNELLES-MORGENTAL, R.; GUERREIRO-TANOMARU, J.M.; DE FARIA-JÚNIOR, N.B.; HUNGARO-DUARTE, M.A.; KUGA, M.C.; TANOMARU-FILHO, M. Antibacterial efficacy of endodontic irrigating solutions and their combinations in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology**, St. Louis, v.112, n.3, p.396-400, 2011.

GUERREIRO-TANOMARU, J.M.; MORGENTAL, R.D.; FLUMIGNAN, D.L.; GASPARINI, F.; OLIVEIRA, J.E.; TANOMARU-FILHO, M. Evaluation of pH, available chlorine content, and antibacterial activity of endodontic irrigants and their combinations against *Enterococcus faecalis*. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology**, St. Louis, v. 112, n.1, p. 132-5, 2011.

GRAWEHR, M.; SENER, B.; WALTIMO, T; ZEHNDER, M. Interactions of ethylenediamine tetraacetic acid with sodium hypochlorite in aqueous solutions. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 36, n.6, p.411-417, 2003.

PAPPEN, F.G.; QIAN, W.; ALEKSEJŪNIENE, J.; LEONARDO, R de T.; LEONARDO, M.R.; HAAPASALO, M. Inhibition of sodium hypochlorite antimicrobial activity in the presence of bovine serum albumin. **Journal of Endodontics**, New York, v. 36, n.2, p.268-271, 2010.

PÉCORA, J.D.; SOUSA NETO, M.D.; SAQUY, P.C.; SILVA, V.; CRUZ FILHO, A.M. Effect of Dakin's and EDTA Solutions on Dentin Permeability of Root Canals. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v.4, n.2, p.79-84, 1993.

ROSSI-FEDELE, G.; DOĞRAMACI, E.J.; GUASTALLI, A.R.; STEIER, L.; FIGUEIREDO, J.Á. Antagonistic interactions between sodium hypochlorite, chlorhexidine, EDTA, and citric acid. **Journal of Endodontics**, New York, v.38, n.4, p.426-431, 2012.

SIQUEIRA, J.F. Jr; RÔÇAS, I.N.; FAVIERI, A.; LIMA, K.C. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. **Journal of Endodontics**, New York, v.26, n.6, p.331-334, 2000.

ZEHNDER, M.; SCHMIDLIN, P.; SENER, B.; WALTIMO, T. Chelation in root canal therapy reconsidered. **Journal of Endodontics**, New York, v.31, n.11, p.817-820, 2005.