

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

RODRIGO TUBELO

EFEITO DA ADIÇÃO DO GEL DE CLOREXIDINA 2% SOBRE O POTENCIAL ANTIMICROBIANO
DA PASTA DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO

Porto Alegre

2013

RODRIGO ALVES TUBELO

EFEITO DA ADIÇÃO DO GEL DE CLOREXIDINA 2% SOBRE O POTENCIAL ANTIMICROBIANO
DA PASTA DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Odontologia da Faculdade de Odontologia
da Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, como requisito parcial para obtenção
do título de Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Montagner

Porto Alegre

2013

CIP – Catalogação na Publicação

Tubelo, Rodrigo Alves.

Efeito da adição do gel de clorexidina 2% sobre o potencial antimicrobiano da pasta de hidróxido de cálcio em diferentes intervalos de tempo/ Rodrigo Alves Tubelo. – 2013.
27 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Curso de Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

Orientador: Francisco Montagner

1. Hidróxido de cálcio. 2. Clorexidina. 3. Medicação intracanal. I. Montagner, Francisco. II. Título.

Dedico esse trabalho aos meus pais **Graciano** e **Regina** por apoiar e acreditar em meus objetivos, tornando-os seus sonhos.

Ao meus irmãos **Rafael**, pelo companheirismo e **Carolina** pelo carinho e amizade que são sempre estímulos do meu trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no nome do Diretor **Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados** e do Vice-Diretor **Prof. Dr. Régis Burmeister do Santos** pela oferta de uma escola com tamanho conceito no âmbito nacional e internacional.

Ao meu orientador de Iniciação Científica **Prof. Dr. Francisco Montagner** pelo empenho na arte de ensinar e dedicação ao compartilhar seus conhecimentos em pesquisa, clínica e atitudes.

A **Prof. Dra. Clarissa Fatturi Parolo** pelo apoio científico e por todo incentivo dado, bem como toda equipe do Laboratório de Microbiologia da FO-UFRGS.

Aos professores da equipe de Endodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul **Prof. Dr. Regis Burmeister dos Santos, Prof. Dr. João Ferlini Filho, Prof. Dr. Marcus Vinicius Reis Só, Prof. Dr. Augusto Bodanezi, Profª Drª Patricia Kopper Móra, Profª Drª Simone Bonato Luisi** pelo conhecimento transmitido ao longo de nosso convívio e pela amizade criada nesse departamento em especial à **Profª Drª Fabiana Soares Grecca** pelo convite e oportunidade de fazer parte deste grupo ímpar.

Aos Colegas de Iniciação Científica **Gabriela Hochscheidt, Daniela Kok, Renata Baldissera, Vanessa Scheffer de Mattos** pelo companheirismo durante as etapas deste trabalho, bem como congressos e eventos de endodontia.

A minha amiga e ex-colega de iniciação científica, especialista e mestranda em endodontia **Carolina Bender Hoppe** por toda ajuda nesta obra; em especial pela amizade criada e pela pessoa que é, um exemplo de que nunca estive no caminho errado e que o sucesso é fruto de muito empenho.

Ao Laboratório de microbiologia da FO-UFRGS, Técnica de laboratório **Luisa Mercado** e a doutoranda em cariologia **Nailê Damé** pela disponibilidade em todos momentos que precisei e eficiência em sanar minhas dúvidas.

A minha namorada **Silvana Bragança** pela paciência de ter-me ausente nos momentos em que me dediquei a conclusão deste trabalho.

“Teria a impressão de ter cometido um roubo,
se passasse um dia sem trabalhar.”

Louis Pasteur

RESUMO

TUBELO, Rodrigo Alves. **Efeito da adição do gel de clorexidina 2% sobre o potencial antimicrobiano da pasta de hidróxido de cálcio em diferentes intervalos de tempo.** 2013. 27 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

O presente estudo avaliou a ação antimicrobiana de medicações intracanal na superfície externa de dentina após diferentes períodos de tempo. Oitenta incisivos mandibulares bovinos foram selecionados. As amostras tiveram seu conduto radicular preparado e foram esterilizadas. A porção apical e a porção coronal foram seladas após a inserção da medicação. A ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio + solução salina (CH + SS, n=40) e hidróxido de cálcio + 2% cloredixidina gel (CH + 2% CHX, n=40) foi avaliada contra o *Enterococcus faecalis* nos períodos imediato, 7 dias, 15 dias e 30 dias após a inserção da medicação. As amostras foram imersas em Agar e armazenadas a 37°C. Após os períodos citados, as amostras foram colocadas sobre a superfície do Agar com *Enterococcus faecalis* e as zonas de inibição de crescimento bacteriano foi mensurada após 48 horas junto com a mensuração do pH. O pH da superfície externa foi medido com fitas de pH. Análise estatística descritiva foi realizada. Não houve inibição do crescimento microbiano nos períodos imediato e 7 dias em ambos os grupos. Após 15 dias, 2/10 das amostras mostraram inibição do crescimento microbiano para o grupo CH + 2% CHX, com valor médio de 1,34 mm de raio. Não houve aumento do pH na superfície externa do dente, em todos períodos de tempo avaliados. Medicamentos com base em hidróxido de cálcio quando inseridos no canal radicular não mostraram inibição do crescimento de *Enterococcus faecalis* na superfície radicular eterna. O tempo não influenciou na ação antimicrobiana das medicações intracanal.

Palavras-chave: Hidróxido de cálcio. Clorexidina. Medicação intracanal.

ABSTRACT

TUBELO, Rodrigo Alves. **Effect of 2% chlorhexidine gel addition to calcium hydroxide pastes in different periods of time.** 2013. 27 f. Final Paper (Graduation in Dentistry) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

The present *in vitro* study evaluated the antimicrobial action of intracanal medicaments in the external root surface after different periods of time. Eight mandibular bovine incisive roots were selected. The root canal was prepared and samples were sterilized. The coronal and the apical openings were sealed. The antimicrobial action of calcium hydroxide + saline solution (CH + SS, n=40) and calcium hydroxide + 2% chlorhexidine gel (CH + 2% CHX, n=40) was evaluated against *Enterococcus faecalis* immediately after the placement, 7 days, 15 and 30 days after the placement. The samples were immersed in agar and stored at 37°C. After the targeted periods, the samples were placed over the agar with *E. faecalis* and the zones of inhibition of microbial growth were measured after 48h with the pH mensurament. The pH in the external root surface was assessed with pH strips. Descriptive statistical analysis was performed. There was no inhibition of microbial growth in the immediate and 7-day periods for both CH+SS and CH+2%CHX. After 15 days, 2/10 samples showed inhibition of microbial growth for the CH+2%CHX group (mean = 1.34mm inhibition zone). There was no increase in the pH in the external root surface despite the intracanal medicament, for all the tested periods. Calcium hydroxide based medicaments placed inside the root canal were not able to inhibit the *E. faecalis* growth and significantly change the pH in the external root surface after short periods of time. The period of application did not affect the antimicrobial potential of the medicaments.

Keywords: Calcium hydroxide. Chlorhexidine. Intracanal medicadion.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	11
3	MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E ESTERILIZAÇÃO	12
3.2	ETAPA DE INSERÇÃO DA MEDICAÇÃO INTRACANAL E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS	13
3.3	PREPARAÇÃO DAS CAMAS E DO INÓCULO	15
3.4	COLOCAÇÃO DOS DENTES SOBRE A SUPERFÍCIE DO AGAR E LEITURA DOS HALOS DE INIBIÇÃO	16
3.5	MENSURAÇÃO DO PH	16
3.6	ANÁLISE DE DADOS	17
4	RESULTADOS	18
5	DISCUSSÃO	19
6	CONCLUSÃO	22
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
	REFERÊNCIAS	24
	APENDICE A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	27

1 INTRODUÇÃO

Durante o tratamento de canal, o preparo químico mecânico reduz significativamente o número de microorganismos dentro do sistema de canais radiculares, entretanto a medicação intracanal é necessária quando a terapia não pode ser concluída com sucesso devido à presença de dor e continuação do exsudato (ARAVIND et al. 2006). O hidróxido de cálcio é amplamente utilizado como medicação intracanal devido ao seu elevado pH, seu potencial para estimular a mineralização, as suas propriedades antibacterianas e sua capacidade de dissolução bacteriana (WILLIAMS et al. 2006; HAASPASALO et al. 1987). Para uma medicação intracanal ser eficaz ela deve atuar tanto no canal radicular como em certa distância no interior dos túbulos dentinários. Em uma situação ideal ela deve obter também uma desinfecção da superfície externa de dentina.

Segundo Law e Messer (2004), o medicamento intracanal ideal ainda não foi encontrado, entretanto, o hidróxido de cálcio – Ca(OH)_2 - tem sido frequentemente utilizado em Endodontia (SHUPIN et al. 2000; KVIST et al. 2004). As propriedades do hidróxido de cálcio dependem da dissociação de cálcio e íons hidroxila (ZMENER et al. 2007). Veículos como água destilada, solução salina e clorexidina tem sido utilizados para a dissociação do hidróxido de cálcio (FARHAD et al. 2012; MADHUBALA et al. 2011; MOHAMMADI e DUMMER 2011) e idealmente não devem alterar o pH do Ca(OH)_2 significativamente. Portanto, as propriedades do Ca(OH)_2 são pH dependentes (SIQUEIRA e LOPES 1999; TRONSTAD et al. 1981) e demonstraram que a diferença nos valores de pH alcançado depende da região do canal radicular. Segundo os autores, valores elevados de pH são observados em áreas de contato com as paredes internas do canal radicular, enquanto nenhuma alteração do pH foi detectada no cimento radicular.

Nerwich et al. (1993) ressaltaram que o tempo mínimo requerido pelo Ca(OH)_2 difundir-se até a superfície radicular externa é de 7 dias. O valor máximo do pH alcançado na área do cimento foi 9.3, após o período de 14 dias. Segundo Minãna et al. (2001) alteração no pH dentinário ficou estável após 48 horas atingindo valores similares a 10. Pacios e Casa (2003) reportaram que a alteração de pH não afetou a estrutura mecânica da dentina no canal radicular. Haapasalo e Orstavik (2000) concluíram que a dentina consegue afetar a difusão do Ca(OH)_2 devido ao seu efeito tampão. Portanto, elevados valores de pH são alcançados na superfície de dentina que está em contato com o Ca(OH)_2 e baixos valores de pH foram observados em diferentes localizações do canal radicular (TEIXEIRA e LEVIN 2005). A alcalinização da dentina é dependente do período de permanência do Ca(OH)_2 em pasta dentro do canal radicular (TRONSTAD et al. 1981; NERWICH et al. 1993; MIÑANA, CARNES 2001; SOLAK e ZTAN 2003).

Segundo Gomes et al. (2009) o hidróxido de cálcio tendo a solução salina como veículo no interior do canal radicular não obtém a difusão em um nível apropriado, produzindo *in vitro* um crescimento bacteriano após curto período de tempo. Entretanto, a associação de clorexidina gel a 2% potencializa a atividade antimicrobiana do Ca(OH)_2 sobre *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Actinomyces viscosus* e *Porphyromonas gingivalis*. A clorexidina possui ação antimicrobiana e consegue uma adsorção aos tecidos dentais, sendo liberada posteriormente de forma gradual a nível terapêutico (SHUPIN et al. 2000; SIRÉN et al. 1997; PORTENIER et al. 2005). Alguns microorganismos resistentes como *Enterococcus faecalis* mostraram resistência ao hidróxido de cálcio, mas tornam-se suscetíveis quando há acréscimo de clorexidina (TERVIT et al. 2009).

Segundo a literatura, o efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio depende de sua dissociação e está fortemente associado com o tempo de permanência. Portanto, o presente estudo *in vitro* teve como objetivo avaliar a ação antimicrobiana de medicações intracanal a base de hidróxido de cálcio na superfície externa de dentina após diferentes períodos de tempo.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral do estudo foi avaliar o efeito antimicrobiano de pastas de hidróxido de cálcio através de sua difusão nos tecidos dentinários.

Os objetivos específicos foram:

- a) determinar, dentre os períodos estudados, aquele em que a pasta de hidróxido de cálcio promove uma ação antimicrobiana efetiva na superfície radicular externa; e
- b) comparar o efeito antimicrobiano da pasta que contém clorexidina gel 2% à pasta de hidróxido de cálcio associada ao soro fisiológico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Pesquisa e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil) (Apêndice A). Os métodos de avaliação da ação antimicrobiana foram adaptados de Gomes et al. (2009).

3.1 Preparação das amostras e esterilização

Oitenta incisivos bovinos foram utilizados no experimento. Osso e ligamento periodontal foram removidos com laminas de bisturi. Os dentes foram cortados a 1mm da junção amelo-cementária com um disco de carborundum (KG Sorensen Ind. Com. Ltda., Barueri, SP) e as raízes foram padronizadas a um comprimento de 15mm, utilizando um paquímetro digital (Mitutoyo Sul Americana Ltda, Santo Amaro, SP, Brasil).

A remoção do tecido pulpar e pré-dentina foi realizado com o uso de uma broca de Gates-Glidden #4, #5 e #6 (Maillefer, Ballaigues, VD, Switzerland), complementada por uma lima endodôntica #130 (Maillefer, Ballaigues, VD, Switzerland). Durante o preparo, a cada utilização de uma nova lima ou broca, 5mL de soro fisiológico foi levado ao canal com auxílio de uma seringa descartável BD de 10mL e agulha 20 x 5,5.

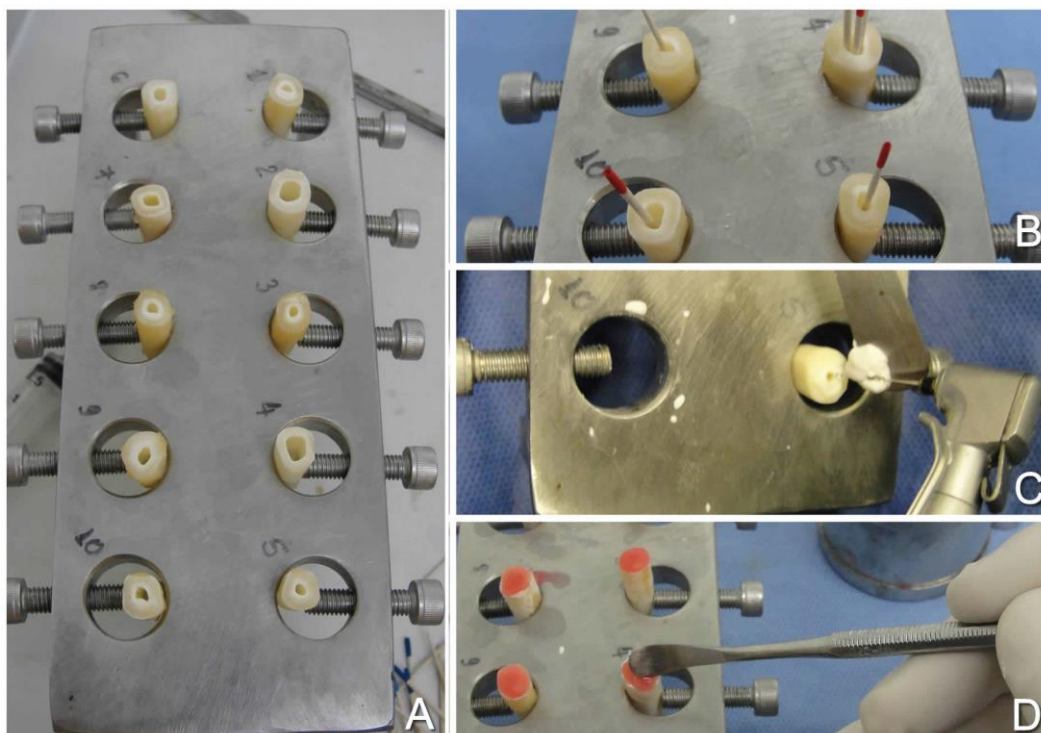
A *smear layer* formada durante o preparo foi removida lavando-se o interior dos canais em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 17% por dez minutos, em Hipoclorito de Sódio (NaOCl) 5,25% por mais dez minutos sob irrigação constante (Gomes et al. 2001). Com o objetivo de evitar a extrusão dos medicamentos durante a sua inserção, a região apical foi selada através da aplicação de uma cobertura com resina composta (Magicfill, Vigodent, São Paulo, SP, Brasil), após o condicionamento ácido da superfície externa com ácido fosfórico 17% (Magicfill, Vigodent, São Paulo, SP, Brasil) e aplicação de sistema adesivo (Magicfill, Vigodent, São Paulo, SP, Brasil). Os dentes foram autoclavados por 20 minutos a 121°C e 1atm, em grupos de vinte unidades cada, dispostos em frasco de vidro com tampas rosqueáveis contendo 20mL de água destilada.

3.2 Etapa de inserção da medicação intracanal e armazenamento das amostras

As amostras foram distribuídas aleatoriamente e dispostas em um suporte autoclavado de dentes, um posicionamento ideal para a secagem dos canais com cones de papel autoclavados conforme a Figura 1 - A). A mistura de hidróxido de cálcio e soro fisiológico foi realizada com espátula número 72 em placa de Petri esterilizada, até atingir a consistência de creme dental, não foi possível determinar uma medida exata para o grupo do soro, já que sofre evaporação constante em um curto período de tempo. A inserção no interior do canal radicular foi realizada utilizando-se espiral de Lentulo (Dentysply – Maillefer, Ballaigues, VD, Switzerland) conforme a Figura 1 – C). A mistura de hidróxido de cálcio à clorexidina gel 2% foi realizada de forma homogênea, com espátula número 72 em placa de Petri esterilizada, na proporção de 2 medidas de hidróxido de cálcio para uma medida de clorexidina gel 2%, em volume.

Após a inserção das medicações, a abertura cervical foi limpa com mechas de algodão esterilizadas, sendo essas pressionadas dentro do canal radicular de maneira a distribuir e compactar a medicação. Posteriormente, foi selada com um tampão de cera rosa aquecida também esterilizadas, nos limites laterais até o selamento total conforme a Figura 1 – D).

Figura 1 – Disposição das amostras



A) Colocação das amostras na base esterilizada. B) Secagem do canal com cones de papel autoclavados. C) Inserção da medicação intracanal. D) Selamento com cera utilidade autoclavada.

A distribuição das amostras em grupos está representada na Tabela 1. Os grupos foram formados considerando-se a medicação intracanal empregada e o tempo de permanência da medicação no interior dos canais radiculares.

Tabela 1. Distribuição das amostras em grupos, de acordo com o tempo de permanência no interior dos canais radiculares

GRUPO	N	Medicação	Tempo
Grupo 1 (G1)	10	Ca(OH) ₂ + Soro	Imediato
Grupo 2 (G2)	10	Ca(OH) ₂ + Soro	7 dias
Grupo 3 (G3)	10	Ca(OH) ₂ + Soro	15 dias
Grupo 4 (G4)	10	Ca(OH) ₂ + Soro	30 dias
Grupo 5 (G5)	10	Ca(OH) ₂ + CHX Gel 2%	Imediato
Grupo 6 (G6)	10	Ca(OH) ₂ + CHX Gel 2%	7 dias
Grupo 7 (G7)	10	Ca(OH) ₂ + CHX Gel 2%	15 dias
Grupo 8 (G8)	10	Ca(OH) ₂ + CHX Gel 2%	30 dias

As amostras foram inseridas em poços de placas de cultura de células esterilizadas e cobertas com ágar bacteriológico, com o intuito de garantir a presença de umidade conforme a Figura 3 – A). Após a geleificação do ágar, as placas foram armazenadas em estufa microbiológica a 37°C. Para evitar a presença de contaminantes externos, no interior da câmara de fluxo laminar, a tampa das placas de cultura de células era removida e a superfície do ágar era exposta e submetida a banho de luz ultravioleta por 10 minutos. Empregou-se desinfecção química superficial com solução de hipoclorito de sódio 2,5% em gaze umedecida. Este protocolo foi realizado diariamente. Para as amostras que permaneciam em estufa microbiológica por mais de 7 dias, realizou-se a troca do agar semanalmente mostrado na Figura 3 – B). As amostras foram removidas do ágar com instrumentos esterilizados e colocadas em nova placa de cultura de células esterilizada. Uma nova camada de agar esterilizado foi vertida. As placas de cultura de célula foram mantidas em estufa microbiológica, a 37°C.

Após o período de incubação, as raízes foram removidas do interior do agar, e dispostas sobre o ágar contendo o microrganismo *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212).

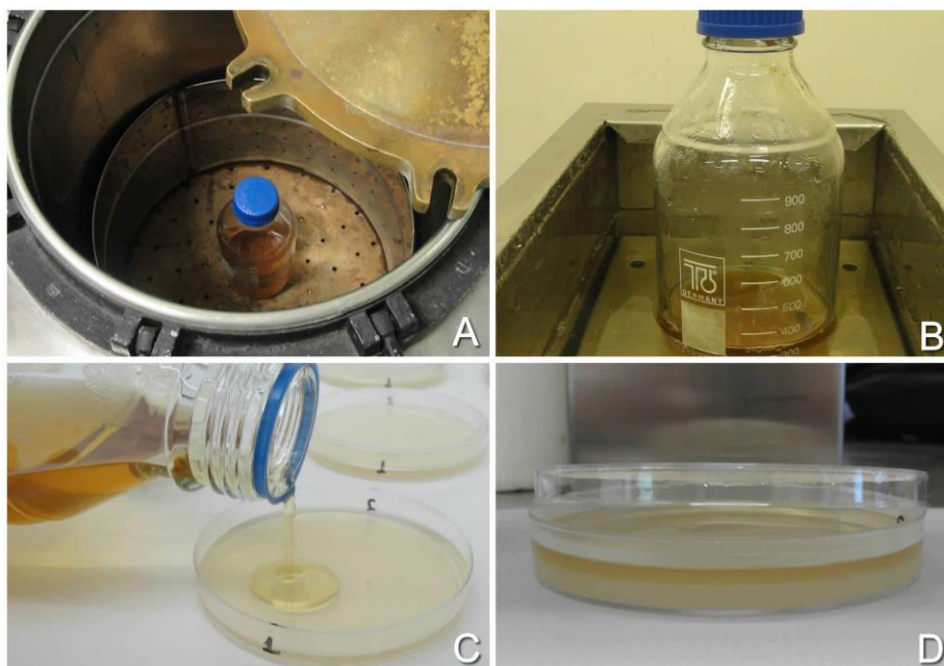
3.3 Preparação das camadas e do inóculo

O microrganismo anaeróbico facultativo *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) foi subcultivado em placas de *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA) e incubado por 18-24 horas a 37°C. Células microbianas foram suspensas em meio líquido *Brain Heart Infusion Broth* (BHI) (Himedia, Mumbai, Índia). Após agitação mecânica, a suspensão foi ajustada em espectrofotômetro (FANEM, Piracicaba, SP, Brasil) com absorvância de 0,036 e um comprimento de onda de 600nm, até atingir a concentração equivalente a 0.5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ bactérias/mL).

Para avaliar a atividade antimicrobiana das substâncias testadas frente ao *Enterococcus faecalis* foram utilizadas placas de 140mm de diâmetro. Inicialmente foram preparadas placas contendo 200mL de Muller Hinton Agar (MHA) (Himedia, Mumbai, Índia) que serviram de base para a camada de inóculo, que será preparada a seguir.

Foram preparados e autoclavados 40mL de BHIA em frascos de vidro com tampas rosqueáveis. Durante o processo de resfriamento, quando o BHIA atingiu 45°C, ainda em estado líquido, foram adicionados 400 μ L do inóculo microbiano, e foi realizada posterior agitação uniforme do conjunto. O BHIA teve, portanto, 1% de inóculo microbiano, e foi então distribuído sobre a camada sólida de Muller Hinton Agar conforme a Figura 2.

Figura 2 – Preparo do meio de cultura

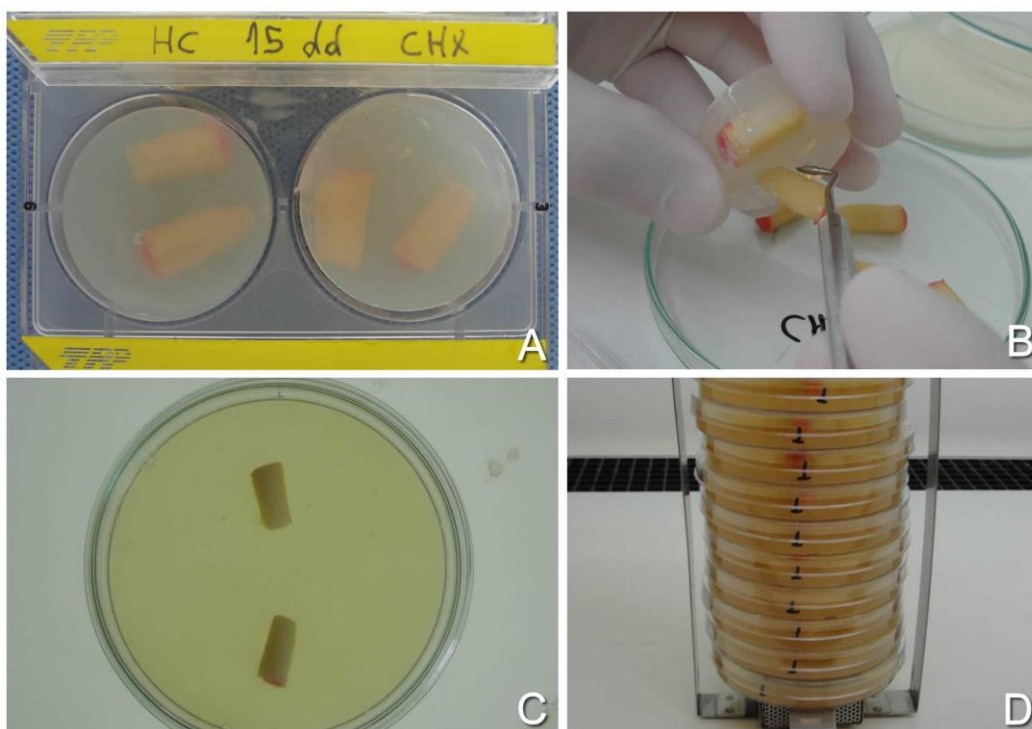


A) Autoclavagem do meio BHIA em frasco de vidro. B) Armazenamento em banho a 65°C. C) colocação do BHIA contaminado com EA sobre a superfície do MHA. D) Imagem da placa com a camada dupla de agar.

3.4 Colocação dos dentes sobre a superfície do agar e leitura dos halos de inibição

No interior da câmara de fluxo laminar, após a solidificação dos meios de cultura, as amostras foram colocadas sobre a superfície do agar utilizando-se pinças esterilizadas, conforme Figura 3 – C). O conjunto Placa de Petri e amostras foi incubado em estufa microbiológica, por 48 horas a 37°C. Após o período de incubação, verificou-se a presença de halo de inibição. A medida do halo de inibição, quando presente, foi realizada com paquímetro digital (Mitutoyo Sul Americana Ltda, Santo Amaro, SP, Brasil).

Figura 3 – Armazenamento das amostras



A) Amostras imersas em Agar colocado em placas de cultura de células. B) Remoção das amostras. C) Colocação dos dentes sobre a superfície do ágar contaminado com *E. faecalis*. D) Suporte de armazenamento das placas para serem colocadas em estufa a 37°C.

3.5 Mensuração do pH

A mensuração do pH foi verificada com fitas (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha.), após a remoção das amostras do interior do ágar. As fitas foram colocadas em contato com a superfície externa das raízes e os valores de pH foram comparados com a escala de cores proveniente do fabricante.

3.6 Análise de dados

A análise descritiva foi realizada.

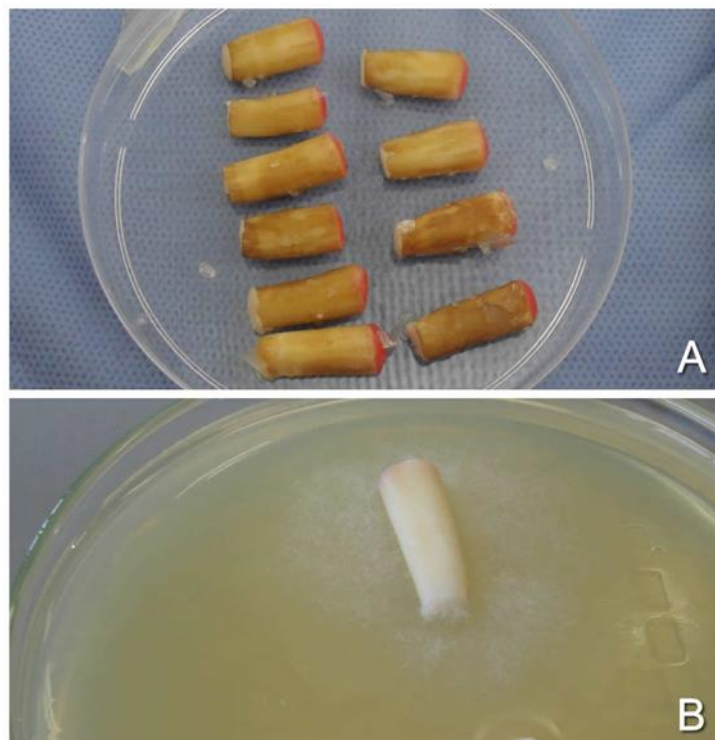
4 RESULTADOS

Não foi possível determinar as zonas de inibição microbiana e valores de pH para o período de 30 dias, devido a contaminação externa encontrada nas amostras (Figura 4).

Não foram encontradas zonas de inibição do crescimento microbiano na superfície do agar com as amostras dos grupos imediato e 7 dias, indiferente da associação. Apenas 2/10 das amostras com Ca(OH)_2 + 2% clorexidina gel mostraram zonas de inibição após o período de 15 dias (média igual a 1,34mm). As amostras do grupo em que o hidróxido de cálcio foi associado ao soro fisiológico, não mostrou halo de inibição.

Os valores médios de pH da superfície externa de Ca(OH)_2 + Solução Salina foram 6,85, 6,15 e 6 para os grupos imediato, 7 dias e 15 dias respectivamente. Amostras com Ca(OH)_2 + clorexidina gel tiveram 7,10, 6,20 e 6,25 como os valores médios de pH para os períodos imediato, 7 dias e 15 dias respectivamente.

Figura 4 – Aspecto das amostras após 30 dias



A) Alteração da coloração da superfície radicular das amostras após 30 dias de armazenamento. B) Contaminação por microorganismos quando a amostra foi disposta sobre o Agar em Placas de Petri.

5 DISCUSSÃO

Vários modelos têm sido proposto na literatura para o estudo da difusão de substâncias químicas auxiliares (BERBER et al. 2006) e medicamentos intracanal (GOMES et al. 2003; Tronstad et al. 1981) na dentina radicular (NERWICH et al. 1993; MIÑANA e CARNES 2001; TEIXEIRA e LEVIN 2005). Gomes et al. (2009) avaliaram a ação destes medicamentos em períodos de até 7 dias. Sabe-se que a dissociação iônica do hidróxido de cálcio está relacionada a diversos fatores, dentre eles o tempo (ESTRELA e HOLLAND 2003). Não há na literatura, um consenso que estabelece um período de tempo ideal para que esta medicação permaneça no interior do sistema de canais radiculares. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi verificar a difusão do hidróxido de cálcio considerando diferentes períodos de tempo.

De acordo com Mohammadi e Shalavi (2012), a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio está relacionada com a liberação de íons hidroxila. As características físicas do hidróxido de cálcio podem limitar a sua difusão e conseqüentemente sua eficácia, quando aplicado no interior do sistema de canais radiculares (SIQUEIRA E LOPES et al. 1999). Mohammadi e Shalavi (2012) sugerem que pastas de hidróxido de cálcio parecem ser ineficazes contra *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. Assim, Siqueira e Lopes (1999) sugerem a associação do hidróxido de cálcio a outros medicamentos. O efeito antimicrobiano da clorexidina é baseado em atração e ligação de sua molécula catiônica às moléculas aniônicas da membrana da célula bacteriana (GOMES et al. 2003; MOHAMMADI e ABBOTT 2009). Evans et al. (2003) e Delgado et al. (2010), utilizando dentes humanos extraídos, observaram que a ação antimicrobiana de pastas de hidróxido de cálcio foi potencializada pelo gel de clorexidina 2%, demonstrando uma redução significativa do número de células microbianas de *E. faecalis* no interior do sistema de canais radiculares de dentes humanos extraídos. Gomes et al (2009) utilizou caninos superiores humanos para avaliar o desempenho da CHX, CHX+Ca(OH)₂, CHX+Ca(OH)₂+Óxido de Zinco(ZnO) e Ca(OH)₂+Soro frente a *C. albicans*, *E. faecalis*, *A. viscosus* e *P. gingivalis* e obtiveram resultados mais favoráveis na ordem em que os medicamentos foram citados.

O presente estudo não observou halos de inibição para os períodos imediato e 7 dias, contudo, duas amostras do grupo de CHX+Ca(OH)₂ apresentaram discreto halo de inibição no período de 15 dias. O fato do nosso estudo não apresentar significativo halo de inibição antimicrobiana pode estar associada à espessura dentinária dos dentes bovinos. Portenier et al. (2001) afirma que a dentina inibe a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio, clorexidina e

iodeto de potássio por diferentes mecanismos, pois componentes da dentina podem estar associada a essa inibição. De acordo com os mesmos autores, a ação do hidróxido de cálcio pode ser alterada por material orgânico e inorgânico. Sendo assim, a ausência de halos de inibição em nosso estudo pode ser explicado pela espessura dentinária dos elemento bovinos ocasionando um maior efeito de tamponamento, e conseqüentemente, diminuindo o pH do $\text{Ca}(\text{OH})_2$ com seus diferentes veículos. Os dentes bovinos foram empregados no estudo pois são de fácil obtenção e apresentam um padrão mais coerente de configuração da microanatomia, favorecendo a padronização do substrato base para a pesquisa (Camargo e Marques 2007). Schmalz et al. (2001) relatam que a variabilidade no padrão de configuração da dentina bovina é mais homogêneo quando comparada à dentina humana. Turssi et al. (2010) verificaram a microdureza da dentina bovina e encontraram diferença estatística quando comparada à de humanos. Assim, podemos sugerir alteração nas propriedades da dentina bovina quando comparada à dentina humana. Não havia relatos na literatura da avaliação do emprego de dentes bovinos por períodos de tempo prolongado. No período de 30 dias observamos contaminação por microorganismos e uma possível degradação tecidual da dentina. Após inúmeras tentativas, observou-se a dificuldade da manutenção da desinfecção das amostras e do agar no qual elas estavam imersas, quando testado o período de 30 dias. De acordo com a avaliação, observou-se a presença de fungos na superfície do agar e a alteração de cor da dentina radicular bovina presente no interior do agar após 30 dias de armazenamento. Diferentes protocolos de desinfecção e troca de agar foram testados, mas não se obteve êxito. Sugere-se então que o método de inserção das amostras em agar para a manutenção da umidade dentinária pode ser empregado de forma segura no período máximo de 15 dias. Estudos adicionais devem ser realizados com o intuito de determinar se há degradação da dentina bovina quando armazenada em agar, a 37°C , por longos períodos de tempo (superiores a 15 dias).

Em pH superior a 8, a base da clorexidina pode precipitar em solução aquosa (BASRANI et al. 2004). Quando associado com hidróxido de cálcio, clorexidina gel 2% pode precipitar por causa do pH elevado produzido pelo cálcio hidróxido em meio aquoso, formando subprodutos de efeitos desconhecidos (YEUNG et al. 2007; BARBIN et al. 2008).

Tronstad et al. (1981) compararam o pH dentinário em macacos com necrose pulpar, e após o tratamento endodôntico com cimento a base de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. O pH passou de 6.0 a 7.4 para 8.0 a 11.1. Ainda observou que o cimento não influencia no pH do hidróxido de cálcio.

Heward e Sedgley (2011) utilizaram 42 dentes humanos para verificar o pH da superfície interna de dentina após diferentes períodos de tempo (3 horas, 24 horas, 1, 2, 3 e 4 semanas) de

inserção de dois grupos: Ca(OH)_2 e do MTA. Tanto o grupo de Ca(OH)_2 como o do MTA tiveram diminuição do valor de pH no decorrer do tempo, tendo o período de 4 semanas com o valor mais baixo e o período de 3 horas como o valor mais alto. Após quatro semanas o valor de pH do MTA foi maior com significância estatística quando comparado ao Ca(OH)_2 .

Solak e Ztan (2003) verificou o pH do hidróxido de cálcio com diferentes veículos em diferentes períodos de tempo, tendo como tempo máximo de 7 dias. Todas as soluções mostraram pH elevado e constantes após o 7 dia.

Zmener et al. (2007) investigou *in vitro* o pH do hidróxido de cálcio associado a água destilada e comparou a dois produtos do mercado. Estudo realizado dentro de tubos de ensaio. Todos os grupos tiveram aumento do valor de pH proporcional a duração de permanência, chegando até 30 dias.

Teixeira e Levin (2005) avaliou o pH dentinário após a inserção de Hidróxido de Cálcio de diferentes maneiras (com o uso de uma Lentulo ou pincelando com cones de papéis). O resultado apresentou maior valor de pH para os dentes que tiveram o Ca(OH)_2 inseridos com a Lentulo. O Terço apical teve menor valor de pH após o sétimo dia. Ao deste estudo, observou-se que a variação do pH da superfície foi de 5,5 a 8 nos diferentes grupos. Entretanto, o níveis mais elevados de pH foram registrados nos grupos imediato, decaindo ao longo do tempo, 7 e 15 dias.

6 CONCLUSÃO

Considerando-se as limitações do método, pode-se concluir que nos intervalos investigados, a adição de Clorexidina gel 2% à pasta a base de hidróxido de cálcio não foi capaz de potencializar seu efeito antimicrobiano quando empregadas no interior de canais radiculares bovinos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados encontrados, podemos sugerir que outras pesquisas, com a utilização de outras metodologias devam ser realizadas para verificação da influência da ação de clorexidina gel 2% no potencial antimicrobiano de canais radiculares.

A realização desse trabalho durou dois anos e seis meses, dos quais dois anos fui bolsista de Iniciação Científica do departamento de Odontologia Conservadora – Endodontia. Desenvolvi uma visão diferente da pesquisa, de muito trabalho, muitas variáveis e acabei mudando o meu conceito do sucesso. Pois obter o resultado sem diferença estatística não significa que não houve contribuição para o desenvolvimento científico.

Sinto-me honrado em fazer parte de um grupo de pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, um ícone da Odontologia nacional e que leva em seu currículo aspectos imprescindíveis na formação de seus alunos de graduação.

REFERÊNCIAS

- ARAVIND V, GOPIKRISHNA D, KANDASWAMY RKJ. Comparative evaluation of the antimicrobial efficacy of five endodontic root canal sealers against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. Journal of Conservative Dentistry. 2006;9(1):2-12.
- BARBIN EL, SAQUY PC, GUEDES DFC, SOUSA NETO MD, ESTRELA C, PÉCORÁ JD. Determination of para-chloroaniline and reactive oxygen species in chlorhexidine and chlorhexidine associated with calcium. J Endod. 2008;34(12):1508-14
- BASRANI B, GHANEM A, TÏÄ DERHANE L. Physical and chemical properties of chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medications. J Endod. 2004;30(6):413-7.
- BERBER VB, GOMES BP, SENA NT, VIANNA ME, FERRAZ CC, ZAIA AA, SOUZA-FILHO FJ. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. Int Endod J. 2006;39(1):10-7.
- CAMARGO MA, MARQUES, MM. Morphological analysis of human and bovine dentine by scanning electron microscope investigation. Arch oral boil. 2008;53:105-08.
- DELGADO RJ, GASPAROTO TH, SIPERT CR, PINHEIRO CR, MORAES IG, GARCIA RB et al. Antimicrobial Effects of Calcium Hydroxide and Chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2010;36(8):1389-93.
- ESTRELA C, HOLLAND R. Calcium hydroxide: study based on scientific evidences. J Appl Oral Sci. 2003 Dec;11(4):269-82.
- EVANS MD, BAUMGARTNER JC, KHEMALEELAKUL SU, XIA T. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. J Endod. 2003;29(5):338-9.
- FARHAD AR, BAREKATAIN B, ALLAMEH M, NARIMANI T. Evaluation of the antibacterial effect of calcium hydroxide in combination with three different vehicles: An in vitro study. Dent Res J. 2012;9(2):167-72.
- GOMES BP, FERRAZ CC, VIANNA ME, BERBER VB, TEIXEIRA FB, SOUZA-FILHO FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. Int Endod J. 2001;34(6):424-28.
- GOMES BPFA, FERRAZ CCR, VIANNA ME, ROSALEN PL, ZAIA AA, TEIXEIRA FB, SOUZA-FILHO FJ. In vitro antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes and their vehicles against selected microorganisms. Braz Dent J. 2002;13(3):155-61.
- GOMES BPFA, SOUZA SFC, FERRAZ CCR, TEIXEIRA FB, ZAIA AA, VALDRIGHI L, SOUZA-FILHO FJ. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. Int Endod J. 2003;36(4):267-75.
- GOMES BPFA, MONTAGNER F, BERBER VB, ZAIA AA, FERRAZ CCR, ALMEIDA JFA, SOUZA-FILHO FJ. Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. J Dent. 2009;37(1):76-81.

HAAPASALO M, ORSTAVIK D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. J Dent Res 1987;66(8):1375-9.

HAAPASALO HK, SIREÅN EK. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. Int Endod J. 2000;33(2):126-31.

HEWARD S, SEDGLEY, CM. Effects of intracanal mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide during four weeks on pH changes in simulated root surface resorption defects: an in vitro study using matched pairs of human teeth. J Endod. 2011;37(1):40-44.

KVIST T, MOLANDER A, DAHLEN G, REIT C. Microbiological evaluation of one- and two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a randomized, clinical trial. J Endod 2004;30(8):572-6.

LAW E MESSER H. An evidence-based analysis of the antibacterial effectiveness of intracanal medicaments. J Endod 2004;30(10):689-94.

MIÑANA M, CARNES DL. PH changes at the surface of root dentin after intracanal dressing with calcium oxide and calcium hydroxide. J Endod. 2001;27(1):43-45.

MADHUBALA MM, SRINIVASAN N, AHAMED S. Comparative evaluation of propolis and triantibiotic mixture as an intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2011;37(9):1287-89.

MOHAMMADI Z, ABBOTT PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. Int Endod J. 2009;42(4):288-302.

MOHAMMADI Z, DUMMER PMH. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. Int Endod J. 2011;44(8):697-730.

MOHAMMADI Z, SHALAVI S. Is chlorhexidine an ideal vehicle for calcium hydroxide? A microbiologic review. Iran Endod J. 2012;7(3):115-22.

NERWICH A, FIGDOR D, MESSER HH. PH changes in root dentin over a 4-week period following root canal dressing with calcium hydroxide. J Endod. 1993;19(6):302-6

PACIOS MG, CASA ML. Calcium hydroxide's association with different vehicles: In vitro action on some dentinal components. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2003;96(1):96-101.

PORTENIER I, WALTIMO T, ORSTAVIK D, HAAPASALO M. The susceptibility of starved stationary phase, and growing cells of *Enterococcus faecalis* to endodontic medicaments. J Endod. 2005;31(5):380-5.

SCHMALZ G, HILLER KA, NUNEZ LJ, STOLL J, WEIS K. Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions. J Endod. 2001 Jan;27(1):23-30.

SHUPIN GB, ORSTAVIK D, SIGURDSSON A, TROPE M. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. J Endod. 2000;26(12):751-5.

SIQUEIRA JF, LOPES HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J.* 1999;32(5):361-69.

SIRÉN EK, HAAPASALO MPP, RANTA K, SALMI P, KEROSUO ENJ. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J.* 1997;30:90–5.

SOLAK H, ZTAN MDO. The pH changes of four different calcium hydroxide mixtures used for intracanal medication. *J Oral Rehabil.* 2003;30(4):436–39.

TEIXEIRA FB, LEVIN LG. Investigation of pH at different dentinal sites after placement of calcium hydroxide dressing by two methods. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;99(4):511-6.

TERVIT C, PAQUETTE L, TORNECK CD, BASRANI B, FRIEDMAN S. Proportion of healed teeth with apical periodontitis medicated with two percent chlorhexidine gluconate liquid: A case-series study. *J Endod.* 2009;35:1182-5.

TRONSTAD L, ANDREASEN JO, HASSELGREN G. , KRISTERSON L. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *J Endod.* 1981;7(1),17-21.

TURSSI CP, MESSIAS DF, CORONA SM, SERRA MC. Viability of using enamel and dentin from bovine origin as a substitute for human counterparts in an intraoral erosion model. *Braz Dent J.* 2010;21(4):332-6.

ZMENER O, PAMEIJER CH, BANEGAS G. An in vitro study of the pH of three calcium hydroxide dressing materials. *Dent Traumat.* 2007;23(1):21-5.

YEUNG SY, HUANG CS, CHAN CP, LIN CP, LIN HN, LEE PH et al. Antioxidant and pro-oxidant properties of chlorhexidine and its interaction with calcium hydroxide solutions. *Int Endod J.* 2007;40:837–44.

WILLIAMS JM, TROPE M, CAPLAN DJ. Detection and quantitation of *E. faecalis* by real-time PCR (qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment. *J Endod.* 2006;32:715–21.

APENDICE A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**UFRGS**UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética No Uso De Animais

**CARTA DE APROVAÇÃO****Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:****Número:** 19706**Título:** ESTUDO IN VITRO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DE PASTAS DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO APÓS DIFERENTES PERÍODOS DE INSERÇÃO EM CANAIS RADICULARES**Pesquisadores:****Equipe UFRGS:**

FRANCISCO MONTAGNER - coordenador desde 10/12/2010
MARISA MALTZ TURKIENICZ - pesquisador desde 10/12/2010
CLARISSA CAVALCANTI FATTURI PAROLO - pesquisador desde 10/12/2010
FABIANA SOARES GRECCA VILELLA - pesquisador desde 10/12/2010
RODRIGO ALVES TUBELO - pesquisador desde 10/12/2010

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 23/05/2011 - Sala de Reuniões do 2º andar da Reitoria, Campus Central, em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Segunda-Feira, 6 de Junho de 2011

FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO
Coordenador da comissão de ética