Atividade antimicrobiana de um EDTA gel associado a peróxido de hidrogênio sobre cepas clínicas de *Candida albicans*

Antimicrobial activity of gel EDTA associated with hydrogen peroxide on clinical isolates of Candida albicans

Lilian Eiko MAEKAWA
Alessandra Sverberi CARVALHO
Paula Elaine CARDOSO
Aluna de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP – Universidade Estadual Paulista – São José dos Campos – SP – Brasil

Ana Cláudia Carvalho XAVIER
Cirurgiã-Dentista pela Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP – Universidade Estadual Paulista – São José dos Campos – SP – Brasil

Luciane Dias de OLIVEIRA
Aluna de Pós-Doutorado da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP – Universidade Estadual Paulista – São José dos Campos – SP – Brasil

Cristiane Yumi KOGA-ITO
Prof ª. Adj. do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP – Universidade Estadual Paulista – São José dos Campos – SP – Brasil

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo analisar a atividade antimicrobiana de um produto composto por EDTA gel associado a peróxido de hidrogênio (Canal Plus®) sobre amostras clínicas de C*andida albicans*, utilizando o método de diluição em caldo. Foram incluídos no estudo isolados bucais e amostra padrão de *Candida albicans* (ATTC 18804). O Canal Plus foi diluído em caldo BHI em placas de microtitulação, obtendo-se as concentrações finais de 50% a 0,02%. O hipoclorito de sódio 2,5% foi utilizado como controle positivo. Após, foi adicionado suspensão padronizada de *Candida albicans* e as placas foram incubadas a 37º C por 24 horas. Foram determinadas diluição inibitória mínima (DIM) e diluição fungicida mínima (DIF). O Canal Plus® foi capaz de inibir todas as cepas clínicas a partir da diluição 0,75%. Considerando os resultados obtidos, os dados sugerem que o Canal Plus tem eficiente atividade antimicrobiana sobre cepas clínicas de *Candida albicans*.

Unitermos

Candida albicans; irrigantes do canal radicular.

Introdução

As infecções endodônticas são consideradas polimicrobianas, sendo que mais de 150 espécies bacterianas já foram isoladas de canais radiculares infectados. Além de bactérias, outros microrganismos como leveduras podem ser encontrados em canais radiculares com necrose pulpar[8].

As leveduras podem ser encontradas ocasionalmente em infecções pulpares primárias, mas estão mais presentes em dentes tratados endodonticamente. Em infecções persistentes/secundárias, as leveduras, especialmente do gênero *Candida* podem variar de 3% a 18% dos casos [3,6,7,10,11,12,16,17] sendo *Candida albicans* a espécie mais comumente encontrada em canais com tratamento endodôntico.

Durante o preparo biomecânico, várias substâncias químicas têm sido utilizadas como soluções irrigadoras. Diversos estudos sobre atividade antimicrobiana das soluções irrigadoras em Endodontia são encontra-

dos na literatura. Devido a uma série de propriedades, como capacidade de dissolver matéria orgânica, ação lubrificante e neutralização de conteúdo tóxico, o hipoclorito de sódio é atualmente a substância mais utilizada durante a instrumentação e irrigação de canais radiculares[2,15,19].

Em Endodontia e seguindo recomendações do fabricante, os produtos compostos por associação de EDTA gel e peróxido de hidrogênio são indicados para canais calcificados ou atrésicos, lubrificando e facilitando o trânsito de instrumentos manuais, auxiliando também na remoção de instrumentos fraturados. A sua ação quelante age sobre os cristais de hidroxiapatita promovendo o amolecimento da dentina. A reação do peróxido de hidrogênio com o hipoclorito de sódio provoca uma ação efervescente que desloca e remove o tecido pulpar, lama dentinária, microrganismos e resíduos sanguíneos purulentos, evitando um possível escurecimento tardio do dente.

Com base nesses achados da literatura e verificando a carência de dados disponíveis sobre os produtos compostos por associação de EDTA gel e peróxido de hidrogênio, este trabalho teve como objetivo avaliar, *in vitro*, a atividade antimicrobiana do Canal Plus® e do hipoclorito de sódio 2,5% sobre cepas clínicas de *Candida albicans*.

Material e métodos

Foram incluídos neste estudo 29 isolados clínicos bucais e amostra padrão ATCC 18804 de *Candida albicans*. Inicialmente, as amostras de *C. albicans* foram semeadas em agar Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA) e incubadas a 37ºC por 24 horas. Em seguida, foi obtida suspensão padronizada de células em solução salina estéril (NaCl 0,9%) correspondendo a 10^6 céls/ml, por espectrofotometria (λ = 530 nm, DO = 0,268) (Micronal S/A – São Paulo, SP, Brasil).

O produto teste composto por associação de EDTA gel e peróxido de hidrogênio (Canal Plus®, Septodont do Brasil Ltda., São Paulo, SP) foi inicialmente pesado em uma balança de precisão e diluído em caldo Sabouraud (Difco, Detroit, USA) em uma concentração de 1g/ml. Com o auxílio de um agitador de tubos (Phoenix - Araraquara, SP, Brasil), o produto foi solubilizado e esta primeira concentração foi considerada como 50%. A partir da solução inicial, foram obtidas diluições seriadas de 50% a 0,02%.

Como controle positivo foi utilizado o hipoclorito de sódio 2,5% o qual também foi diluído em caldo Sabouraud dextrose como descrito anteriormente.

As diluições seriadas em caldo do Canal Plus® e do hipoclorito de sódio 2,5% foram realizadas em placas de microtitulação para determinação da diluição inibitória mínima (DIM). Após, foram adicionados 100 µl da suspensão de *C. albicans* previamente padronizada. A seguir, as placas foram incubadas a 37ºC por 24 horas. Após o período de incubação, os resultados foram obtidos após inspeção visual reportando as menores concentrações dos produtos que induziram inibição de crescimento pela ausência de turvação, como valor de diluição inibitória mínima (DIM). A seguir, 100 µl do conteúdo dos poços foram transferidos para placas contendo agar Sabouraud dextrose para a determinação da diluição fungicida mínima (DFM). Foi considerada DFM aquela que inibiu completamente o crescimento fúngico.

Resultados

Em relação à diluição inibitória mínima, o hipoclorito de sódio inibiu todas as cepas de *C. albican*s na concentração 1,5%, sendo que a partir da diluição 0,75% observou-se turvação em todas as amostras. O Canal Plus foi capaz de inibir todas as cepas clínicas a partir da diluição 0,75% (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores de diluição inibitória minima de NaOCl 2,5% e Canal Plus obtidos

Concentração	NaOCl 2,5%	Canal Plus
6,25	30 amostras	30 amostras
3%	30 amostras	30 amostras
1,5%	30 amostras	30 amostras
0,75%	0	30 amostras

Em relação à diluição fungicida mínima, no grupo do hipoclorito de sódio 2,5% foi verificado que na diluição 3% apenas 6 amostras clínicas de *C. albicans* se desenvolveram. Nas demais amostras o crescimento foi verificado a partir da concentração 1,5%. No grupo do Canal Plus foi observado crescimento a partir da concentração 1,5% em 3 amostras clínicas, sendo que as demais amostras se desenvolveram a partir da concentração 0,75% (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores de diluição fungicida mínima de NaOCl 2,5% e Canal Plus obtidos

Concentração	NaOCl 2,5%	Canal Plus
6,25	30 amostras	30 amostras
3%	24 amostras	30 amostras
1,5%	0	27 amostras
0,75%	0	0

Discussão

C. albicans foi incluída neste estudo por ser frequentemente citada na literatura como um microrganismo presente em infecções pulpares e canais com necrose pulpar. Este microrganismo também é comumente isolado em infecções refratárias, sendo mais resistente aos procedimentos antimicrobianos, realizados durante o tratamento endodôntico[3,6,7,9,10,11,16,17].

Na literatura são encontrados diversos estudos sobre a atividade antimicrobiana de soluções irrigadoras, como o hipoclorito de sódio, que pode ser utilizado em diversas concentrações [5,14,15,19]. O hipoclorito de sódio é capaz de promover alterações celulares biossintéticas, e destruir fosfolipídios, pela formação de cloraminas que interferem no metabolismo celular, pela ação oxidante, com inibições enzimáticas irreversíveis das sulfidrilas de enzimas essências das bactérias, e pela degradação de ácidos graxos e lipídeos[4].

Byström e Sundqvist[2] verificaram que o NaOCI 0,5% foi mais efetivo do que a solução salina como agente irrigante, comprovando as propriedades antimicrobianas desta substância. Embora soluções menos concentradas apresentem efetividade antimicrobiana[15], concentrações maiores desta substância apresentam, mais rápido e maior efeito bactericida[5,14]. Entretanto, quanto maior a concentração desta substância, maior o efeito citotóxico[4,14].

No entanto, o NaOCl possui limitada capacidade de penetração nos túbulos dentinários. Vahdaty et al.[18] verificaram a ação antimicrobiana do NaOCI sobre E. *faecalis* em até 500 μm de profundidade e, Sen et al.[13] observaram que mesmo utilizando NaOCI 5,25%, não foi possível eliminar C. *albicans* de secções de dentina humana após uma hora de exposição.

Berutti et al.[1] observaram aumento do efeito antibacteriano do NaOCI 5,0% quando este foi utilizado intercalado com a solução de EDTA 10%. Isto é devido a ação desmineralizadora do EDTA, que impede a formação da *smear layer* durante a instrumentação, com consequente aumento da penetração do NaOCI nos túbulos dentinários.

Recomenda-se que o Canal Plus deve ser utilizado associado ao hipoclorito de sódio, segundo recomendações do fabricante. Relata-se que o Canal Plus possui ação quelante sobre os cristais de hidroxiapatita e sua reação do peróxido de hidrogênio com o hipoclorito de sódio provoca uma ação efervescente, que desloca e remove tecido pulpar, microrganismos e resíduos sanguíneos, evitando o escurecimento do dente. Tendo por base estas propriedades e a carência de dados na literatura sobre este produto, é necessário que outros estudos sejam realizados para verificar o seu real mecanismo de ação que permitam conclusões mais objetivas sobre sua atividade antimicrobiana.

No presente estudo foi possível verificar que ambos apresentaram atividade antimicrobiana eficaz e satisfatória e podem ser sugeridos para utilização na clínica odontológica.

Conclusão

Considerando os resultados obtidos em conjunto com as características citadas, os dados sugerem que o Canal Plus tem eficiente atividade antimicrobiana sobre cepas clínicas de *Candida albicans*.

Absctract

The purpose of this study was to analyze the antimicrobial activity of a composed product for EDTA gel associated with hydrogen peroxide (Plus® Canal) on clinical isolates of *Candida albicans*, using the method of dilution in broth. They had been enclosed in the study clinical isolates and reference strain of *Candida albicans* (ATTC 18804). The Plus Canal was diluted in broth BHI in microtitulation plates, obtaining the final concentrations of 50% to 0.02%. The sodium hypochlorite 2.5% was used as positive control. After, standardized suspension of *Candida albicans* was added and the plates had been stored in an oven at 37º C for 24 hours. Minimal inhibitory dilution and minimal fungicidal dilution had been determined. The Plus® Canal was capable to inhibit all clinical isolates from dilution 0.75%. Considering the results, the data suggest that the Canal Plus has efficient antimicrobial activity on clinical isolates of *Candida albicans*.

Uniterms

Candida albican;, root canal irrigants.

Referências

1. Berutti E, Marini R, Angeretti A. Penetration ability of different irrigants into dentinal tubules. J Endod. 1997;23(12):725-7.
2. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0,5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1983;55(3):307-12.
3. Egan MW, Spratt DA, Ng YL, Lam JM, Moles DR, Gulabivala K. Prevalence of yeasts in saliva and root canals of teeth associated with apical periodontitis. Int Endod J. 2002;35(4):321-9.
4. Estrela C, Estrela CRA, Barbin EL, Spanó JCE, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. Braz Dent J. 2002;13(2):113-17.
5. Gomes BPFA, Ferraz CCR, Vianna MEVB, Berber FB, Teixeira FJ, Souza-Filho F. 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):24-8.
6. Maekawa LE, Lamping R, Nassri MRG. Identificação e análise dos microorganismos presentes em canais radiculares com mortificação pulpar. Rev Paul Odontol. 2006;28(1):38-41.
7. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. Int Endod J. 1998;31(1):1-7.
8. Nair PNR. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, assymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscope follow-up study. J Endod. 1990;16(12):580-8.
9. Najzar-Fleger D, Filipovic D, Prpic G, Kobler D. Candida in root canal in accordance with oral ecology. Int Endod J. 1992;25(1):40.
10. Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. Int Endod J. 2001;34(6):429-34.
11. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. Int Endod J. 2003;36(1):1-11.
12. Rôças IN, Hülsmann M, Siqueira JF Jr. Microorganisms in root canal-treated teeth from a German population. J Endod. 2008;34(8):926-31.
13. Sen BH, Safavi KE, Spanberg LSW. Antifungal effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine in root canais. J Endod. 1999;25(4):235-8.
14. Shih MM, Marshall FJ, Rosen S. The bactericidal efficiency of sodium hypochlorite as an endodontic irrigant. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1970;9(4):613-9.
15. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2,5% and 5,25% sodium hypoclorite. J Endod. 2000;26(6):331-4.
16. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004;97(1):85-94.
17. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1998;85(1):86-3.
18. Vahdaty A, Pitt Foro R, Wilson RF. Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules in vitro. Endod Dent Traumatol. 1993;9(6):243-7.
19. Valera MC, Rego JM, Jorge AOC. Effect of sodium hypochlorite and five intracanal medications on Candida albicans in root canals. J Endod. 2001;27(6):401-8.

Recebido em 05/11/08
Aprovado em 05/06/09

Correspondência:
Lilian Eiko Maekawa
Rua Evolução, 692 Vila Brasilina
CEP 04163-001
São Paulo-SP
e-mail: lilian.maekawa@uol.com.br