

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

LUDMILA DUARTE DIAS

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE DIFERENTES PINOS DE FIBRA DE VIDRO
PRÉ-FABRICADOS**

Porto Alegre

2023

LUDMILA DUARTE DIAS

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE DIFERENTES PINOS DE FIBRA DE VIDRO
PRÉ-FABRICADOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Tiago André Fontoura de Melo

Coorientador: Prof. Dr. Francisco Montagner

Porto Alegre

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Dias, Ludmila
AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE DIFERENTES PINOS DE
FIBRA DE VIDRO PRÉ-FABRICADOS / Ludmila Dias. -- 2023.
28 f.
Orientador: Prof. Dr. Tiago André Fontoura de Melo.

Coorientador: Prof. Dr. Francisco Montagner.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade
de Odontologia, Curso de Odontologia, Porto Alegre,
BR-RS, 2023.

1. Endodontia. 2. Dentística Restauradora. 3. Pino
intrarradicular. 4. Contaminação. 5. Biossegurança. I.
André Fontoura de Melo, Prof. Dr. Tiago, orient. II.
Montagner, Prof. Dr. Francisco, coorient. III. Título.

LUDMILA DUARTE DIAS

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE DIFERENTES PINOS DE FIBRA DE VIDRO
PRÉ-FABRICADOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Tiago André Fontoura de Melo

Coorientador: Prof. Dr. Francisco Montagner

Porto Alegre, 04 de agosto de 2023.

Prof. Dr. Tiago André Fontoura de Melo
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Clarissa C. Fatturi Parolo
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. *Lucas Siqueira Pinheiro*
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço aos meus pais, Ronaldo e Inez, que me proporcionaram todas as condições que foram necessárias para que eu chegasse até esse momento, com muito cuidado e dedicação. Aos meus irmãos, Danyel e Max que estiveram ao meu lado durante a vida, como forma de segurança, proteção e companhia. À minha família, por me ajudar na construção da minha essência, facilitar a caminhada da vida e abençoá-la. Espero retribuir na mesma proporção.

Agradeço o apoio do meu esposo, Guilherme, pelo acolhimento e parceria durante todo o período da graduação, por ser uma base forte que me acolhe em momentos de alegria e nas adversidades, assim como sua família. Agradeço também às minhas amigas, que encontrei na faculdade, Fernanda Fedatto, Michelli e Meniquen por tornar os dias da Graduação muito mais leves e alegres.

Agradeço ao meu Orientador, Prof. Tiago Melo, que foi compreensivo, paciente e resolutivo durante todo o processo. Ao meu Coorientador, Prof. Francisco Montagner, pela orientação e indicação do Guilherme Amando, que foi essencial para o desenvolvimento técnico do Projeto. Agradeço à Luísa Mercado e à equipe do LABIM por esclarecer a metodologia laboratorial.

À Universidade, por oferecer Educação Pública de extrema qualidade, desenvolvimento intelectual, científico e cultural a pessoas de diferentes lugares do Brasil e do Mundo. Ao grupo PET, pela oportunidade de fazer parte do grupo durante a minha trajetória acadêmica e instigar o aprimoramento dos três pilares fundamentais do Ensino Superior: Ensino, Pesquisa e Extensão.

RESUMO

Justificativa: Durante a realização do tratamento endodôntico, buscamos manter e promover a desinfecção do sistema de canais radiculares. O processo de reabilitação com o uso de pinos intrarradiculares deve preservar essa condição microbiológica. **Objetivo:** Sendo assim, este estudo tem como objetivo avaliar a presença de microrganismos sobre pinos de fibra de vidro existentes no mercado odontológico. **Material e Método:** Para isso, foram avaliados 54 pinos cônicos lisos de fibra de vidro de cinco marcas comerciais (n = 9): Whitepost DC-E®, Exacto®, Fiber Post®, Superpost®, Power Point®. As análises microbiológicas foram realizadas submergindo os pinos em tubos contendo caldo Brain-Heart Infusion (BHI) e, posteriormente, semeando uma alíquota deste caldo em quatro meios de cultura diferentes: BHI, Agar Mitis Salivarius, Agar M-Enterococcus, Agar Sabouraud Dextrose. O número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) na suspensão de inoculação foi determinado por contagem em placa. A extração de DNA foi feita seguindo o protocolo do fabricante e as amostras foram analisadas no espectrofotômetro. Após a extração do DNA, foi feita a Técnica de PCR para amplificação do Gene 16s e as amostras foram submetidas à Eletroforese em gel de agarose. **Resultados:** Nenhuma das amostras dos pinos analisados apresentou crescimento microbiológico nos meios de cultura selecionados. Na análise da extração DNA e densidade óptica em espectrofotômetro, os valores de densidade óptica das amostras variaram. No PCR foi observada amplificação do gene 16S rRNA em todas as amostras dos pinos, indicando a presença de DNA bacteriano. **Conclusão:** Os pinos de fibra de vidro analisados não apresentaram contaminação detectável através do cultivo em placas de Petri. No entanto, na análise qualitativa do PCR, em eletroforese em gel de agarose, foram detectadas bandas que indicam a presença de bactérias provavelmente inviáveis contendo o gene 16S nas amostras.

Palavras-chave: Endodontia, Dentística Restauradora, Pino intrarradicular, Contaminação, Biossegurança.

ABSTRACT

Justification: During the execution of endodontic treatment, we aim to maintain and promote disinfection of the root canal system. The rehabilitation process using intraradicular posts should preserve this microbiological condition. **Objective:** Therefore, this study aims to evaluate the presence of microorganisms on fiberglass posts available in the dental market. **Material and Methods:** For this purpose, 54 smooth tapered fiberglass posts from five commercial brands (n = 9 each) were evaluated: Whitepost DC-E®, Exacto®, Fiber Post®, Superpost®, Power Point®, and. Microbiological analyses were performed by submerging the posts in tubes containing Brain-Heart Infusion (BHI) broth and subsequently inoculating aliquots of this broth onto four different culture media: BHI agar, Mitis Salivarius Agar, M-Enterococcus Agar and Sabouraud Dextrose Agar. The number of colony-forming units (CFU/mL) in the inoculation suspension was determined by plate counting. DNA extraction was performed following the manufacturer's protocol, and the samples were analyzed using a spectrophotometer. After DNA extraction, PCR (Polymerase Chain Reaction) technique was carried out for amplification of the 16S gene, and the samples were subjected to agarose gel electrophoresis. **Results:** None of the analyzed post samples showed microbiological growth on the selected culture media. In the analysis of DNA extraction and optical density in the spectrophotometer, the optical density values of the samples varied. PCR revealed amplification of the 16S rRNA gene in all post samples, indicating the presence of bacterial DNA. **Conclusion:** The analyzed fiberglass posts did not show detectable contamination through plate culture. However, in the qualitative analysis of PCR using agarose gel electrophoresis, bands indicating the presence of probably non-viable bacteria containing the 16S gene were detected in the samples.

Keywords: Endodontics, Restorative Dentistry, Intraradicular post, Contamination, Biosafety.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	10
2.1. Objetivo geral	10
2.2. Objetivos específicos	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1. Tipo e Delineamento do Estudo	11
3.2. Locais de realização do Estudo	11
3.3. Cálculo Amostral	11
3.4. Pinos de fibra de vidro testados	11
3.5. Análise microbiana	12
3.6. Análise PCR	14
3.6.1. Extração DNA e PCR	14
3.6.2. Eletroforese	15
3.7. Análise Estatística	16
4. RESULTADOS	17
4.1 Análise microbiana	17
4.2 Extração DNA e densidade óptica em espectrofotômetro	17
4.3 Análise de PCR	18
5. DISCUSSÃO	20
5.1 Análise microbiana	20
5.1.1 O dinamismo bacteriano	20
5.1.2 Cultura bacteriana	20
5.1.3 O armazenamento e manipulação dos pinos de fibra de vidro	21
5.2 Análise biomolecular	22
5.2.1 A extração do DNA	22
5.2.2 Densidade óptica em espectrofotômetro	23
5.2.3 A PCR	23
5.2.3 Eletroforese em gel de agarose	23
5.3 Limitações do estudo	24
6. CONCLUSÕES	25
REFERÊNCIAS	25
ANEXO	27
Anexo 1 - Carta de aprovação da Comissão de Pesquisa de Odontologia da UFRGS.	27

1. INTRODUÇÃO

Após o término de um tratamento endodôntico, é necessário realizar a restauração do dente em questão, a fim de restituir sua função e estética. Muitas vezes, dentes tratados endodonticamente sofreram grande perda tecidual, necessitando de reforço adicional à estrutura remanescente. Nesse contexto, a utilização de pinos intrarradiculares apresenta-se como uma alternativa restauradora (Dikbas; Tanalp, 2013; Dibaji et al., 2017).

Os pinos intrarradiculares surgiram com o objetivo de reforçar a estrutura do dente fragilizada após o tratamento endodôntico. Além disso, os retentores ajudam a promover a retenção do material restaurador direto ou indireto sob o dente e, dependendo do tipo de retentor, propiciam uma distribuição de tensões mais homogênea nas estruturas dentárias (Albuquerque, 2002). Um exemplo de pino que apresenta este comportamento biomecânico é o pré-fabricado de fibra de vidro.

Os pinos de fibra de vidro são compostos por elevado volume de fibras de reforço contínuas incorporadas em matriz polimérica, geralmente, resina epóxi (Lassila *et al.*, 2004). Existem no mercado odontológico uma variedade de pinos de fibra de vidro com diferentes topografias e conicidades para serem utilizados de forma direta e imediata em qualquer condição dentária.

Independentemente de qual tipo de retentor intrarradicular a ser utilizado, um dos fatores que pode levar ao insucesso no tratamento reabilitador com uso de pinos é à ruptura nos princípios biológicos com presença de fatores que desencadeiam a contaminação dentro do canal radicular. A presença de microrganismos no interior de canais radiculares é a principal causa do fracasso no tratamento endodôntico (Wong et al., 2021). Até o presente momento, não foi encontrado na literatura nenhum estudo que avalie se há ou não contaminação presente nos pinos pré-fabricados embalados para uso.

Portanto, o presente estudo tem como objetivo avaliar se há presença de microrganismos sobre pinos pré-fabricados. Para isso, foi realizada a análise microbiana em diferentes meios de cultura; extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) bacteriano para análise em espectrofotômetro; reação em cadeia da polimerase (PCR) e Eletroforese.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a presença de microrganismos sobre pinos de fibra de vidro pré-fabricados.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar se há formação de colônias bacterianas e fúngicas, através do plaqueamento em meios de cultura seletivos e não seletivos. Quantificar o número de unidades formadoras de colônia.
- Analisar e detectar a presença de material genético bacteriano através da técnica PCR.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi submetido à apreciação e aprovação na Comissão de Pesquisa (COMPESQ) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (Anexo 1).

3.1. Tipo e Delineamento do Estudo

Foi realizado um estudo experimental *in vitro* e controlado.

3.2. Locais de realização do Estudo

A execução do experimento e a análise de contaminação foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia do Curso de Odontologia da UFRGS e no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

3.3. Cálculo Amostral

A amostra foi definida com base no estudo de Silva et al. (2017) e por meio da utilização do programa estatístico *GraphPad Instant* (versão 3.1, *GraphPad Software*, USA). Considerou-se a necessidade de detectar, entre os grupos, diferenças de 0,5 unidades de medida, com nível de significância de 5% e poder estatístico de 90%.

Dentro de um risco aceitável de não estar vendo diferenças onde elas existam, nem de estar vendo diferenças onde elas não existam (Erros tipo I e II, respectivamente), chegou-se a um número mínimo de nove pinos por grupo experimental. Para tal, foram realizadas três triplicatas de experimento, sendo que em cada momento, três pinos de cada marca foram testados.

3.4. Pinos de fibra de vidro testados

Foram analisados 45 pinos cônicos lisos de fibra de vidro n°. 1, removidos de seus invólucros fornecidos pelo fabricante, não esterilizados de fábrica, de cinco marcas comerciais: Whitepost® (FGM Produtos Odontológicos, Joinville, Santa Catarina, Brasil), Exacto® (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A, Londrina, Paraná, Brasil), Fiber Post® (Maquira Indústria de Produtos Odontológicos S.A., Maringá, Paraná, Brasil), Superpost® (Superdont®, Rio de Janeiro, Rio de

Janeiro, Brasil) e Power Post® (BM4, Maringá, Paraná, Brasil). Foram adquiridos 9 pinos de cada uma das empresas.

Os espécimes foram codificados para facilitar a identificação durante o processo, como descrito abaixo (Tabela 1):

CÓDIGO	ESPÉCIME	MARCA
1	BHI caldo	-
2	G1a	Whitepost
3	G1b	Whitepost
4	G1c	Whitepost
5	G2a	Fiber Post
6	G2b	Fiber Post
7	G2c	Fiber Post
8	G3a	Superpost
9	G3b	Superpost
10	G3c	Superpost
11	G4a	Exacto
12	G4b	Exacto
13	G4c	Exacto
14	G5a	Power Post
15	G5b	Power Post
16	G5c	Power Post

Tabela 1: Identificação espécimes.

3.5. Análise microbiana

Os pinos foram removidos da embalagem, com uma pinça clínica esterilizada, próximo à chama de um bico de Bunsen de modo que não perdessem as características de fabricação ou sofressem qualquer tipo de contaminação externa. Todo este processo de manipulação das amostras foi realizado em uma capela de fluxo laminar (SPLabor, São Paulo, Brasil).

Inicialmente, após removidos da embalagem, os pinos foram inoculados em um caldo BHI (Himedia Labs, Curitiba, Paraná, Brasil) e foram incubados por 24 horas, a 37°C e em estufa microbiológica, em ambiente induzido de microaerofilia (método da vela). Como controle, um frasco contendo meio de cultura líquido

esterilizado foi mantido incubado, nas mesmas condições que o meio líquido contendo as amostras.

Passado o tempo inicialmente proposto de incubação, uma alíquota de 100µL foi diluída de forma seriada 10x, 100x, 1.000x e 10.000x. Vinte e cinco microlitros (µL) de cada diluição foram plaqueadas, em triplicata, nos seguintes meios de cultura:

- Brain Heart Infusion Agar (Himedia Labs, Curitiba, Paraná, Brasil), incubado em estufa microbiológica a 37°C, por dois dias, para o crescimento de microrganismos anaeróbios facultativos;
- Agar Mitis Salivarius (Himedia Labs, Curitiba, Paraná, Brasil) acrescido de solução de telurito de potássio 1%, incubado a 35-37°C por 18-48 horas, em ambiente de microaerofilia, para a identificação presuntiva de *Streptococcus* sp. (colônias azuis). Colônias azul-pretas não foram consideradas, pois sugerem *Enterococcus faecalis*;
- Agar M-Enterococcus (Himedia Labs, Curitiba, Paraná, Brasil) acrescido de esculina 1g/L, incubado a 37°C por 2 dias, para o crescimento de *Enterococcus* spp;
- Agar Sabouroud Dextrose (Himedia Labs, Curitiba, Paraná, Brasil) acrescido de cloranfenicol 0,5g/L, incubado aerobicamente em temperatura ambiente (aproximadamente 26°C) por 48h e a 37°C por mais 3 dias, para o crescimento de fungos.

Após o período de incubação, o número de Unidades Formadoras de Colônia foi determinado em cada gota, de cada diluição. O número total de UFCs/mL de caldo foi então determinado por meio da fórmula:

$$UFC_{total} = (UFC_{gota} \times diluição \times 40) \text{ UFCs/mL}$$

Sendo:

- UFC_{total} = número total de UFCs/mL
- UFC_{gota} = número de UFCs contadas na gota plaqueada no meio específico. Como há 3 gotas para cada diluição, foi considerada aquela gota que apresentou um número de UFCs contáveis entre 10 e 50.
- Diluição = fator de diluição aplicado (se 10^2 foi convertido para 100)

- 40 = valor correspondente à alíquota retirada para plaqueamento de uma diluição, e sua proporcionalidade com o volume do tubo que a originou.

Não foi realizada identificação ao nível de espécie para as UFCs contadas. Assim, foi descrito a carga total do grupo microbiano correspondente a cada meio de cultura não seletivo (BHI) ou seletivo (ágar Mitis Salivarius, ágar M-Enterococcus ou ágar Sabouroud).

3.6. Análise PCR

3.6.1. Extração DNA e PCR

A extração de DNA foi feita seguindo o protocolo do fabricante do Kit da Extração de DNA “QIAamp® PowerFecal® DNA Kit Handbook - August 2017”, o processo foi realizado para cada amostra do pino de fibra de vidro, em triplicata. Após a extração do DNA, uma alíquota 1 µL de cada amostra foi analisada no espectrofotômetro (NanoDrop 1000). Como forma de criar grupos comparativos para análise em PCR, foi feito um controle positivo através de uma amostra de saliva diluída em BHI caldo (identificada como a 17° amostra) e o controle negativo, com BHI caldo puro.

Após a extração do DNA, as amostras foram armazenadas em congelador e em seguimento, foi feito a Técnica de PCR para amplificação do Gene 16s, seguindo a técnica recomendada pelo fabricante do Kit de extração “Applied Biosystems by Thermo Fischer Scientific”.

Todas as reações foram preparadas em gelo. Cada tubo tipo Eppendorf continha os volumes representados na tabela 2:

COMPONENTE	VOLUME PARA UMA REAÇÃO DE 50 µL
PCR SuperMix	44 µL
Primers para o gene 16S rRNA	2 µL
Solução de DNA da amostra	2 µL

Tabela 2: Volume reação PCR.

A Sequência de primers utilizado para a amplificação do gene 16S: Universal forward primer: CCATGAAGTCGGAATCGCTAG e o Universal reverse primer: GCTTGACGGGCGGTGT (Shelburne et al., 2000).

Após o preparo, os recipientes de reação, foram carregados em um termociclador (TECHNE TC-312) e o processo de termociclagem foi realizado de acordo com o protocolo representado na tabela 3 abaixo:

Número de ciclos	Etapa	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação inicial	94° C	5 min
35	Desnaturação	94° C	30s
—	Anelamento	60° C	30s
—	Extensão	72° C	2 min
1	Espera	4° C	----

Tabela 3: Protocolo termociclagem.

3.6.2. Eletroforese

Para a análise do PCR, as amostras foram submetidas à Eletroforese em gel de Agarose. Para isso, foi preparado uma solução de 180 mL de tampão TBE (concentração a 1%). Adicionado à solução, 1.2g Agarose (Sigma) e 3 μ L de corante Sybr Green após preparo da solução. O conjunto foi vertido em um aparato como ilustrado na figura 1 abaixo:

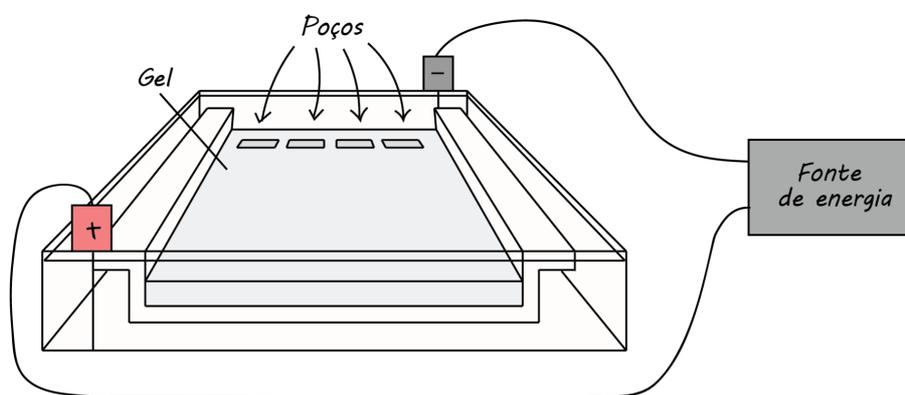


Figura 1: Ilustração do Equipamento utilizado para Eletroforese.

Foi adicionado 2,5 μ L do produto da PCR sobre um quadrado de parafilme com 1 μ l de Loading Dye e levado até a canaleta do gel. Após esse processo, a eletroforese foi feita na voltagem de 100 volts (100 v + 120mA + 100w) por 16 minutos. Para a análise de eletroforese, visualizou-se o gel na imagem.

3.7. Análise Descritiva

Os resultados coletados para cada amostra foram inseridos em uma planilha e posteriormente analisados de modo descritivo.

4. RESULTADOS

4.1 Análise microbiana

Não houve turvamento após 24h de inoculação das amostras em BHI caldo. Nenhuma das amostras quando cultivadas nos meios de cultura selecionados apresentaram crescimento microbiológico no momento do experimento. Portanto, os pinos de fibra de vidro analisados não apresentavam presença de contaminação detectável no momento da análise (Tabela 4).

MEIO DE CULTURA	CULTURA	HOUVE CRESCIMENTO?
Brain Heart Infusion Agar	Anaeróbios Facultativos	Não
Agar Mitis Salivarius telurito de potássio 1%	<i>Streptococcus</i> sp.	Não
Agar M-Enterococcus acrescido de esculina 1g/L	<i>Enterococcus</i> spp	Não
Agar Sabouraud Dextrose acrescido de cloranfenicol 0,5g/L	Fungos	Não

Tabela 4: Resultado Cultivo Microbiológico em Placas de Petri.

4.2 Extração DNA e densidade óptica em espectrofotômetro

Cada amostra tinha 50 μL de volume, quando foi submetida aos testes (Tabela 5):

CÓDIGO DA AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DE DNA (ng/ μl)	A260/A280
1	3.1	3.43
2	13.8	1.82
3	11.8	1.81
4	8.3	2.01
5	8.3	1.73
6	2.4	2.34
7	3.2	2.52
8	4.4	1.55
9	3.3	1.40
10	3.7	1.74
11	1.9	1.03
12	2.9	2.21
13	2.7	1.44
14	3.0	1.49
15	2.6	1.39
16	2.3	1.65
17	2.2	1.66

Tabela 5: Análise densidade óptica.

A razão entre 260/280 de aproximadamente 1,8 - 2,0 é aceita como “pura” para DNA. Proporções anormais de 260/280 geralmente indicam que a amostra está contaminada por fenol residual, guanidina ou outro reagente utilizado no protocolo de extração (LEHNINGER et al., 2004).

Portanto, idealmente, um valor de A260/A280 entre 1,8 e 2,0 é considerado adequado para indicar uma pureza aceitável. Tendo isso em vista, os valores 1,82, 1,81, 2,01, 1,73, 1,74, 2,21, 1,65 estão próximos ao intervalo de 1,8 a 2,0, indicando uma pureza aceitável. Os valores 2,34, 2,52 estão acima do intervalo ideal, mas ainda estão próximos o suficiente para serem considerados relativamente puros. O valor 3.43 está acima do intervalo ideal de 1,8 a 2,0. Isso pode sugerir a presença de contaminantes que aumentam a absorção na faixa de 280 nm. Os valores 1,55, 1,40, 1,03, 1,44, 1,49, 1,39, 1,06 estão abaixo do intervalo ideal de 1,8 a 2,0. Isso

pode sugerir a presença de contaminantes que diminuem a absorção na faixa de 280 nm.

Portanto, os espécimes 2,3,4,5,10,12,16 estão puros, considerando o intervalo de 1.8 a 2.0, mediante à análise feita. Os espécimes 6 e 7 estão próximos às faixas aceitáveis. Os espécimes 8,10,12,13,14,17 não foram purificados.

4.3 Análise de PCR

Observou-se amplificação do gene 16S rRNA nas amostras dos pinos e do controle positivo (Figura 2). Não se observou amplificação de DNA no controle negativo. Assim, é possível definir que havia presença de DNA bacteriano em todas as amostras de pinos.



Figura 2. Gel de agarose após eletroforese: No poço 1 encontra-se o controle negativo, do poço 2 ao 16 são referentes às amostras. O poço 17 corresponde ao controle positivo.

Mediante à análise de PCR após a extração do DNA, é possível traçar uma relação entre as amostras purificadas e a presença das Bandas após a eletroforese. Tem-se que as amostras que continham os pinos purificadas são: 2,3,4,5,10,12,16. Sendo elas as amostras 2,3 e 4 da marca Whitepost, 5 da marca Fiber Post, 10 da marca Superpost, 12 da marca Exacto e 16 da marca Power Post.

5. DISCUSSÃO

A desinfecção do sistema de canais radiculares é objetivo do tratamento endodôntico. Pensando nisso, no momento de reabilitação estética e funcional da estrutura dentária, a inserção de um material intracanal deve garantir a manutenção da ação químico-mecânica realizada durante a endodontia. Tendo em vista o exposto, o presente estudo analisou diferentes pinos de fibra de vidro, investigando a possibilidade de contaminação bacteriana ou fúngica.

5.1 *Análise microbiana*

5.1.1 *O dinamismo bacteriano*

Sabe-se que na cavidade bucal, existe a presença de diversos microrganismos. Entretanto, durante a infecção endodôntica, existe um dinamismo bacteriano, sendo inicialmente predominado por microrganismos anaeróbios facultativos, que consomem oxigênio e produzem dióxido de carbono e hidrogênio. Assim, mediante a baixa disponibilidade de oxigênio e o metabolismo bacteriano, os níveis de dióxido de carbono e hidrogênio tornam-se elevados, assim, o meio é alterado, sendo desfavorável às bactérias anaeróbias facultativas e seletivo para as bactérias anaeróbias estritas, que se reproduzem independente do oxigênio e em presença da dióxido de carbono e hidrogênio (Leonardo et. al, 2012).

5.1.2 *Cultura bacteriana*

Inicialmente, os pinos foram inoculados em BHI caldo, um meio de cultura bacteriana que promove o crescimento de microrganismos variados, já consolidado na literatura. Utilizados em estudos semelhantes como de Xavier et al (2014), Da Silva et al (2017) , Prado et al (2016). No BHI caldo, não houve turvamento após 24h de cultivo para todos os espécimes testadas, constatando que não houve crescimento de microrganismo. Ainda assim, foram feitos os plaqueamentos em Placas de Petri, utilizando a metodologia de diluição, a partir do BHI caldo.

Foram utilizados meios de culturas não seletivos e seletivos, visando identificar a presença de microrganismos cultiváveis nos pinos de fibra de vidro pré-fabricado. O Brain Heart Infusion Agar (Himedia Labs, Curitiba, Paraná, Brasil), foi utilizado para o crescimento de microrganismos anaeróbios facultativos, o meio

de cultura Agar Mitis Salivarius (Himedia Labs, Curitiba, Paraná, Brasil) acrescido de solução de telurito de potássio 1%, foi utilizado para a identificação presuntiva de *Streptococcus* sp. (colônias azuis) e possível de fazer a diferenciação com Colônias azul-pretas, que sugerem *Enterococcus faecalis*. O *E. faecalis* é uma bactéria anaeróbia facultativa gram-positiva que tem sido frequentemente associada a infecções endodônticas secundárias e persistentes (Rôças et al., 2004; Bouillaguet et al., 2018). O Agar M-Enterococcus (Himedia Labs, Curitiba, Paraná, Brasil) acrescido de esculina 1g/L, para o crescimento de *Enterococcus* spp; e o Agar Sabouroud Dextrose (Himedia Labs, Curitiba, Paraná, Brasil) acrescido de cloranfenicol 0,5g/L, para o crescimento de fungos.

Apesar dos pinos de fibra de vidro não serem esterilizados, mostraram-se livres de contaminação quando submetidos à análise microbiana, nos meios de cultura utilizados. Visto que os resultados frente a cultura em placas de Petri foram negativos, tem-se que não há contaminação nos pinos de fibra de vidro analisados com bactérias ou fungos que usualmente crescem nestes meios de cultura. Em um estudo semelhante (Silva et al., 2017) com o cultivo bacteriano em placas de petri, com amostras de cones de papel e guta percha, também, não demonstrou-se crescimento bacteriano frente aos meios de cultura em placas de petri.

Isso é uma informação e análise extremamente relevante, até porque segundo os estudos de Poggio et al. (2017) e Finger et al. (2019), os pinos de fibra de vidro apresentam falta de atividade antimicrobiana frente ao *E. faecalis* em placas de Petri contaminadas.

5.1.3 O armazenamento e manipulação dos pinos de fibra de vidro

Por outro lado, os pinos de fibra de vidro são armazenados em embalagens contendo 5-10 unidades. E, no estudo, os pinos foram retirados do seu invólucro cuidadosamente, dentro de uma capela de fluxo laminar, com pinça estéril, luvas e com as mãos devidamente higienizadas. Até o presente momento, também não foram encontrados estudos que submetam os pinos de fibra de vidro pré-fabricados a testes microbiológicos, num momento em que os invólucros são abertos e o material é armazenado para uso em um momento posterior. Antes da manipulação, os pinos ficam sujeitos à ação do ambiente. O estudo de Prado et al (2016), avaliou a contaminação de cones de papel em células abertas e expostas ao ambiente

clínico por 1 mês. Após esse período, observou-se contaminação nas pontas de papel, entretanto, elas foram submetidas ao processo de esterilização e ficaram livres de contaminação.

Com isso, surge o questionamento quanto à possibilidade de esterilização ou descontaminação dos pinos de fibra de vidro antes de sua utilização clínica, sem alterações das propriedades físicas. Em estudo de Baltezan et al. (2023) foram testados diferentes formas de desinfecção de pinos de fibra de vidro (álcool 70%, hipoclorito de sódio 2.5%, gluconato de clorexidina 2%, ácido fosfórico 35%, peróxido de hidrogênio 10% e esterilização em autoclave) e após a desinfecção, os pinos foram submetidos a análise topográfica, e em todos os grupos, após análise em microscopia eletrônica de varredura os pinos apresentavam áreas de fibras cobertas pela resina epóxi e áreas de fibra de vidro exposta. Na análise por energia dispersiva em raio-x, verificou-se que não há diferença no predomínio dos elementos químicos entre os grupos. o maior pico foi referente aos elementos carbono (c) e oxigênio (o), seguido de silício (si), zircônio (zr), sódio (na), alumínio (al) e cálcio (ca). O estudo conclui que os métodos de desinfecção testados não promoveram alterações significativas na morfologia da superfície dos pinos de fibra de vidro.

5.2 Análise biomolecular

Após a resposta negativa para a cultura bacteriana, foi utilizada a técnica de PCR para identificação da presença ou ausência de bactérias nas amostras coletadas. Para isso, foi feita a extração de DNA, seguida de sua análise em espectrometria, a reação de PCR e sua leitura em gel de agarose, através de luz UV no equipamento Imager.

5.2.1 A extração do DNA

A extração do material genético é uma etapa fundamental para se obter alta eficiência de amplificação nos protocolos que usam a reação em cadeia da polimerase (PCR). A extração de DNA é o processo de isolamento do material genético da amostra (Oliveira et al., 2007). No presente estudo, utilizou-se o método de extração do QIAamp® PowerFecal® DNA Kit.

5.2.2 Densidade óptica em espectrofotômetro

Todas as amostras de DNA obtidas no laboratório podem ser avaliadas quanto à sua concentração e à sua pureza por meio da análise da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro. (Oliveira et al., 2007)

O DNA absorve luz no comprimento de onda de 260 nm e as proteínas, de 280 nm. A razão entre 260/280 proporção de aproximadamente 1,8 é aceita como “pura” para DNA (LEHNINGER et al., 2004). Proporções anormais de 260/280 geralmente indicam que uma amostra está contaminada por fenol residual, guanidina ou outro reagente utilizado no protocolo de extração. Quanto mais DNA, maior absorbância a 260 nm. No presente estudo, as amostras apresentaram resultados insatisfatórios após o processo de extração de DNA, através do método aplicado.

5.2.3 A PCR

A técnica PCR ou reação em cadeia da polimerase, é um dos métodos de biologia molecular idealizada em 1983 por Mullis et al., que visa sintetizar, a partir de uma tira matriz de DNA, por meio da reação enzimática in vitro, ampliações de DNA. A técnica PCR tem muita importância para a microbiologia, devido ao fato de possibilitar a análise de amostras clínicas, mesmo em concentrações muito baixas (Fredricks & Relman, 1999).

Utilizou-se sequência de Primers que permite a replicação do Gene 16s do rDNA, que está presente em diversas bactérias. Em infecções de origem endodontia, a PCR com análise da sequência 16s, permitiu a detecção de bactérias quando a cultura em placas de Petri geraram resultados negativos, isso possibilitou a identificação de MOs em amostras pequenas (Rolph et al., 2001; Munson et al, 2002).

5.2.3 Eletroforese em gel de agarose

Existem diferentes métodos usuais para visualizar o DNA em géis de agarose. Neste estudo, utilizou-se o corante Sybr Safe®, um corante fluorescente que cora o DNA no gel de agarose, que após a eletroforese, é visualizado no transiluminador de luz azul (SAMBROOK et al., 2001). Dessa forma, é possível identificar a presença de material genético através da intensidade da fluorescência.

Quanto mais intensa a banda representada na imagem, maior a concentração de DNA na amostra. No presente estudo, o objetivo com a técnica era verificar se existia a presença de material genético, mesmo que não houvesse crescimento bacteriana através do plaqueamento das amostras.

Portanto, neste estudo, identificou-se a presença de material genético nos pinos de fibra de vidro pré fabricados, após a reação da PCR.

5.3 Limitações do estudo

As técnicas de Eletroforese em gel de agarose, principalmente as quantitativas, usam um marcador de peso molecular, com a concentração de DNA conhecida. No estudo não foi utilizado devido ao objetivo inicial, que é analisar se existe a presença ou não de microrganismos. Pensando nisso, foi utilizada uma amostra que, conhecidamente, há a presença de material genético - a saliva.

Sabe-se, que para um resultado satisfatório da PCR, é necessário trabalhar com amostras de DNA o mais puro possível (Oliveira et al., 2007). No presente estudo, há a presença de contaminantes nas amostras após a extração do DNA, que é indicada pela Densidade Óptica através da Espectrofotometria realizada.

Além disso, os níveis de microrganismos presentes nas amostras não foram cultiváveis frente aos testes de Plaqueamento em diferentes meios de Cultura. Isso nos faz questionar quanto à viabilidade dos microrganismos presentes e se eles são fatores provocadores da recolonização bacteriana, que geram comprometimento do prognóstico do tratamento endodôntico.

6. CONCLUSÕES

Conclui-se, portanto, que este estudo indica que os pinos de fibra de vidro pré-fabricados analisados não apresentaram contaminação bacteriana ou fúngica detectável mediante ao cultivo em placas de petry. E, após extração de DNA e análise qualitativa do resultado da PCR, através da Eletroforese em gel de agarose, das amostras pinos de fibras de vidro pré-fabricados, constatou-se que existe a presença de bactérias que contenham o Gene 16s, mediante as condições de realização da pesquisa. É importante considerar as limitações do estudo e a necessidade de mais pesquisas para entender melhor a viabilidade dos microrganismos presentes nos pinos de fibra de vidro e sua influência sobre o prognóstico do tratamento endodôntico.

Ainda assim, sugere-se mais estudos sobre protocolos de desinfecção e a esterilização dos pinos de fibra de vidro pré-fabricados, se há alteração das propriedades físicas e mecânicas dos pinos de fibra de vidro de diferentes marcas quando submetidos a esses processos, com o objetivo da incorporação da informação nas instruções de uso do fabricante.

Já é conhecido que esse material reforça a estrutura do dente, tem o módulo de elasticidade semelhante ao da dentina, é necessário menos desgaste do remanescente no momento do preparo quando comparado a outras formas de reabilitação, tem resultados estéticos favoráveis e é eficaz em promover a reabilitação funcional (Silva et al.,2020).

REFERÊNCIAS

1. Albuquerque RC. Pinos intrarradiculares pré-fabricados. In: Cardoso RJA, Gonçalves EAN. Oclusão/ATM: prótese sobre implantes e prótese bucomaxilofacial. São Paulo: Artes Médicas; 2002. p. 442-452.
2. Dibaji F, Mohammadi E, Farid F, Mohammadian F, Sarraf P, Kharrazifard MJ. The Effect of BC Sealer, AH-Plus and Dorifill on Push-out Bond Strength of Fiber Post. *Iran Endod J.* 2017;12(4):443-448.
3. Dikbas I, Tanalp J. An overview of clinical studies on fiber post systems. *Scientific World Journal.* 2013;2013:171380.
4. Finger NH, Paulus M, Gazzoni AF. Potencial antimicrobiano de diferentes retentores intrarradiculares frente a *Enterococcus faecalis*: uma avaliação in vitro. *Rev Odontol UNESP.* 2019;48:e20190051.
5. Poggio C, Trovati F, Ceci M, Chiesa M, Colombo M, Pietrocola G. Biological and antibacterial properties of a new silver fiber post: in vitro evaluation. *J Clin Exp Dent.* 2017;9(3):e387-93.
6. Silva AP, Anjos AL, Freitas MPM. Contaminação de cones de papel absorvente e cones de guta percha utilizados em endodontia: avaliação "in vitro". *Stomatos.* 2017;23(44):33-40.
7. Bouillaguet, S., Manoil, D., Girard, M., Louis, J., Gaïa, N., Leo, S., Schrenzel J, Lazarevic V. Root microbiota in primary and secondary apical periodontitis. *Front Microbiol.* 2018;9:2374.
8. Charles E Shelburne, Anila Prabhu, Raymond M Gleason, Brian H Mullally, Wilson A Coulter. Quantitation of *Bacteroides forsythus* in subgingival plaque: Comparison of immunoassay and quantitative polymerase chain reaction. *J Microbiol Meth.* 2000;39(2):97-107.
9. De-Jesus-Soares A, Prado MC, Nardello LCL, Pereira AC, Cerqueira-Neto ACCL, Nagata JY, Martinez EF, Frozoni M, Gomes BPF, Pinheiro ET. Clinical and molecular microbiological evaluation of regenerative endodontic procedures in immature permanent teeth. *J Endod.* 2020;46(10):1448-1454.
10. Lassila LV, Tanner J, Le Bell AM, Narva K, Vallittu PK. Flexural properties of fiber reinforced root canal posts. *Dent Mater.* 2004;20(1):29-36.

11. Prado M, Duque TM, Gomes BPFA, Borges DDO, Gusman HCDS. Avaliação de pontos de papel celulósico: um estudo microbiológico. *Dent Press Endod.* 2012;2(2):42-6.
12. Rôças IN, Siqueira Jr. JF, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod.* 2004;30(5):315–320.
13. Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001.
14. Siqueira Jr JF, Rôças IN, Lopes HP, Alvez FRF, Oliveira JCM, Armada L, Provenzano JC. Princípios biológicos do tratamento endodôntico de dentes com polpa necrosada e lesão perirradicular. *Rev Bras Odontol.* 2012;69(1):8-14.
15. Wong J, Manoil D, Näsman P, Belibasakis GN, Neelakantan P. Microbiological aspects of root canal infections and disinfection strategies: An update review on the current knowledge and challenges. *Front Oral Health,* 2021;25(2):672887.
16. Baltezan VM, Melo TAF. Análise topográfica de pinos de fibra de vidro após diferentes métodos de desinfecção de superfície. Trabalho de Conclusão de Curso: UFRGS; 2023.

ANEXO

Anexo 1 - Carta de aprovação da Comissão de Pesquisa de Odontologia da UFRGS.

Sistema Pesquisa - Pesquisador: Tiago André Fontoura De Melo

Dados Gerais:

Projeto Nº:	38800	Título:	AVALIACAO MICROBIOLOGICA DE DIFERENTES PINOS DE FIBRA DE VIDRO PRE-FABRICADOS		
Área de conhecimento:	Endodontia	Início:	01/07/2020	Previsão de conclusão:	01/07/2023
Situação:	Projeto em Andamento				
Origem:	Faculdade de Odontologia	Projeto Isolado com linha temática: Biomateriais e Técnicas Terapêuticas em Odontologia			
Local de Realização:	não informado				
Não apresenta relação com Patrimônio Genético ou Conhecimento Tradicional Associado.					
Objetivo:	<p>Justificativa: Durante a realização do tratamento endodôntico, buscamos, muitas vezes, manter e promover a desinfecção do sistema de canais radiculares. O processo de reabilitação com o uso de pinos intrarradiculares deve preservar essa condição microbiológica. Logo, os pinos devem ser livres de contaminação.</p> <p>Objetivo: Sendo assim, este estudo tem como objetivo avaliar a presença ou não de microrganismos sobre pinos de fibra de vidro pré-fabricados existentes no mercado odontológico.</p> <p>Materiais e Método: Para isso, serão avaliados 54 pinos cônicos lisos de fibra de vidro de seis marcas comerciais (n = 9, cada): Whitepost DC-E, Exctio, Fiber Post, Super-post, Power Point e Reblida Post. As análises microbiológicas serão realizadas submergindo os pinos em tubos contendo caldo Brain-Heart Infusion (BHI) e, posteriormente, semeando uma alíquota deste caldo em</p>				

Palavras Chave:

BIOSSEGURANÇA
CONTAMINAÇÃO
DENTÍSTICA RESTAURADORA
ENDODONTIA
PINO INTRARRADICULAR

Equipe UFRGS:

Nome: TIAGO ANDRÉ FONTOURA DE MELO
Coordenador - Início: 01/07/2020 Previsão de término: 01/07/2023
Nome: FRANCISCO MONTAGNER
Pesquisador - Início: 01/07/2020 Previsão de término: 01/07/2023
Nome: LUDMILA DUARTE DIAS
Técnico: Assistente de Pesquisa - Início: 01/07/2020 Previsão de término: 01/07/2023

Avaliações:

Comissão de Pesquisa de Odontologia - Aprovado em 06/04/2020 Clique aqui para visualizar o parecer
--

Anexos:

Projeto Completo	Data de Envio: 26/03/2020	
Outro	Data de Envio: 26/02/2020	
Outro	Data de Envio: 26/03/2020	
Relatório de Andamento	Período: 01/07/2020 a 01/06/2021	Data de Envio: 01/06/2021
Relatório de Andamento	Período: 02/06/2021 a 01/06/2022	Data de Envio: 01/06/2022

Bolsas:

Projeto associado à bolsa Iniciação Científica Voluntária No Período: 20/07/2020 a 21/06/2021
Bolsista: LUDMILA DUARTE DIAS no período de 20/07/2020 a 21/06/2021