



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Faculdade de Odontologia

FLÁVIA GOULART DA ROSA CARDOSO

**DETECÇÃO E AÇÃO ANTIMICROBIANA E
ANTIENDOTÓXICA DO EXTRATO GLICÓLICO DE
GENGIBRE UTILIZADO COMO SUBSTÂNCIA QUÍMICA
AUXILIAR DURANTE O RETRATAMENTO ENDODÔNTICO**



2011

FLÁVIA GOULART DA ROSA CARDOSO

**DETECÇÃO E AÇÃO ANTIMICROBIANA E ANTIENDOTÓXICA DO
EXTRATO GLICÓLICO DE GENGIBRE UTILIZADO COMO
SUBSTÂNCIA QUÍMICA AUXILIAR DURANTE O RETRATAMENTO
ENDODÔNTICO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Especialidade Endodontia.

Orientadora: Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera

São José dos Campos

2011

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos
Campos: FOSJC/UNESP; 2010.

C179d Cardoso, Flávia Goulart da Rosa.

Detecção e ação antimicrobiana e antiendotóxica do extrato glicólico de gengibre utilizado como substância química auxiliar durante o retratamento endodôntico /

Flávia Goulart da Rosa Cardoso. __ São José dos Campos : [s.n.], 2011
125f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2011.
Orientador: Profa. Titular Marcia Carneiro Valera

1. Retratamento endodôntico. 2. Microrganismos. 3. Lesões persistentes.
4. Extrato glicólico de gengibre. I. Valera, Marcia Carneiro. II. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. III. Título

tD24

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 20 de maio de 2011.

Assinatura:

E-mail: fgoulartcardoso@hotmail.com

BANCA EXAMINADORA

Marcia Carneiro Valera (Orientador)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP – Univ Estadual Paulista

Flaviana Bombarda de Andrade

Faculdade de Odontologia de Bauru
Universidade de São Paulo - USP

Carlos Henrique Ribeiro Camargo

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP – Univ Estadual Paulista

São José dos Campos, 17 de Junho de 2011

DEDICATÓRIA

À minha querida mãe, **Patrícia Goulart da Rosa Cardoso**, meu exemplo de mulher e pessoa, a quem devo minhas conquistas, meus diplomas, meus títulos e tudo o que irei ainda conquistar na minha carreira.

Ao meu pai **Herval Lourenço Cardoso**, minhas saudades são do tamanho de minha gratidão. Seu trabalho foi e esta sendo cumprido. Espero estar fazendo por merecer.

Aos meus irmãos, **Fernanda e Felipe Goulart da Rosa Cardoso**, pelo carinho e alegria mesmo nos momentos mais difíceis e fatigantes.

Aos meus avós paternos, **Dermeval de Oliveira Cardoso e Helena Lourenço Cardoso**, pelo carinho e dedicação. Sem o apoio e incentivo de vocês teria parado no primeiro obstáculo.

Aos meus avós maternos, **Irineu da Rosa Coelho e Anita Goulart da Rosa**, por estarem sempre dispostos a ajudar, com palavras de carinho e conforto.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, que me iluminou e inspirou a realizar este trabalho e me confortou nos momentos difíceis.

À minha orientadora Profa. Titular **Marcia Carneiro Valera** em aumentar e aperfeiçoar meus estudos com sua grande experiência e competência. Pela amizade que construiu com nosso grupo e sinceridade em nossas conversas. Espero poder agradecer um dia, tudo o que está me ensinando.

À **Faculdade de Odontologia de São José dos Campos** – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, através de seu Diretor, Prof. Adjunto José Roberto Rodrigues.

Ao **Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora**, na pessoa da coordenadora Profa. Titular Marcia Carneiro Valera.

Aos professores da disciplina de endodontia: **Ana Paula Martins Gomes, Cláudio Antônio Talge Carvalho e Renato Miotto Palo** pela contribuição na minha formação acadêmica, pelos ensinamentos transmitidos e atenção dispensada sempre que solicitada.

Ao **Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo**, pela oportunidade de compartilhar seus conhecimentos clínicos e científicos, pela atenção, estímulo, dedicação e exemplo.

À **Capex** pela concessão de bolsa de mestrado.

À secretária **Rosângela**, do Departamento de Odontologia Restauradora, pelas informações e atenção prestadas.

As técnicas de laboratório, **Josy e Fernanda**, pelo suporte nos trabalhos realizados.

À **Dona Marinete**, por estar sempre disposta a ajudar com seu sorriso de todos os dias.

À **Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP**, instituição onde realizei parte dos experimentos.

À **Profa. Titular Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes**, pelos ensinamentos transmitidos sendo possível a realização desta pesquisa.

Aos colegas, **Marcos Sérgio Endo e Frederico Canato Martinho**, pelos ensinamentos, atenção e paciência durante fase experimental deste trabalho.

Ao **Prof. Ivan Balducci**, pela paciência em ensinar a realizar a análise estatística dos dados deste trabalho.

Às secretárias da Pós-Graduação **Erena e Rosemary** pelas informações prestadas.

Aos meus amigos, **alunos e ex-alunos do curso de Mestrado e Doutorado** em Odontologia Restauradora, especialidade Endodontia, pela amizade e companheirismo.

À amiga **Adriana Chung**, pelo carinho e disposição em sempre ajudar. Tenho certeza que fizemos uma excelente parceria.

À amiga **Lilian Eiko Maekawa**, nossa amizade começou quando eu ainda era bolsista técnica. Saiba que sou muito grata pelos conhecimentos transmitidos. Agradeço por estar sempre ao meu lado.

Às amigas **Gleyce e Tatê**, pela amizade, conversas e apoio na minha vida pessoal e profissional.

Ao querido **Gabriel Portela Paulo**, por me apoiar em minhas decisões e por estar comigo mesmo nos momentos mais difíceis. Sem você tudo seria mais difícil.

À todos os **alunos e ex-alunos de iniciação científica**. Aprendo muito com vocês.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 Fatores associados ao insucesso do tratamento endodôntico	15
2.2 Microbiota das infecções endodônticas persistentes	18
2.3 Endotoxinas	24
2.4 Extratos naturais	31
3 PROPOSIÇÃO.....	35
4 MATERIAL E MÉTODO.....	36
4.1 Seleção de pacientes.....	36
4.2 Seleção dos casos.....	37
4.3 Intervenção Odontológica.....	38
4.4 Primeira Coleta.....	40
4.5 Preparo Biomecânico.....	41
4.6 Segunda Coleta.....	42
4.7 Medicação Intracanal por 14 dias.....	43
4.8 Terceira Coleta.....	44
4.9 Obturação dos Canais Radiculares.....	45
4.10 Análise Microbiológica.....	46
4.10.1 Semeadura dos microrganismos	46
4.10.2 Análise por PCR	49
4.10.2.1 Extração do DNA bacteriano	50
4.10.2.2 Reação de PCR	51
4.10.2.3 Eletroforese	53

4.11	Verificação da neutralização de endotoxinas no canal radicular	55
4.12	Correlação entre a quantidade de endotoxinas e o diâmetro das lesões periapicais	57
4.13	Análise Estatística	57
5	RESULTADOS	58
6	DISCUSSÃO	75
7	CONCLUSÃO	88
8	REFERÊNCIAS	89
	APÊNDICES	103
	ANEXO	124

Cardoso FGR. Detecção e ação antimicrobiana e antiendotóxica do extrato glicólico de gengibre utilizado como substância química auxiliar durante o retratamento endodôntico [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2011.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo detectar espécies bacterianas, quantificar microrganismos e endotoxinas em canais radiculares com insucesso endodôntico e presença de lesão periapical, correlacionando-os com os sinais e sintomas clínicos e, avaliar a ação do hipoclorito de sódio 1% e extrato glicólico de gengibre 20% sobre estes microrganismos e endotoxinas. Foram selecionados para o estudo dez dentes tratados endodonticamente com lesões periapicais persistentes que foram divididos em 2 grupos (n=5), de acordo com a substância química auxiliar utilizada durante o preparo biomecânico (PBM): hipoclorito de sódio 1% e extrato glicólico de gengibre 20% intercalado com solução salina fisiológica. Foram realizadas coletas do conteúdo do canal radicular imediatamente após a desobturação do dente, imediatamente após a instrumentação e, imediatamente após 14 dias da ação da medicação intracanal (MIC) de hidróxido de cálcio. Para todas as coletas foram realizados os seguintes testes: a) avaliação da atividade antimicrobiana por cultura microbiológica e através do método molecular - PCR; b) quantificação de endotoxinas verificada pelo lisado de amebócitos de *Limulus*. Os resultados foram submetidos a análise estatística de *Wilcoxon* e *Mann-Whitney* e mostraram que tanto o PBM quanto à MIC foram capazes de reduzir a quantidade de microrganismos e de endotoxinas, independente da solução utilizada. No entanto, endotoxinas não foram completamente neutralizadas. Espécies de *E. faecalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. nigrescens*, *P. intermedia*, *P. micra* foram detectadas nos canais radiculares. Observou-se correlação positiva entre a quantidade de endotoxinas e o diâmetro das lesões. Concluiu-se que as substâncias testadas foram eficazes na redução de microrganismos e de endotoxinas.

Palavras-chave: Retratamento endodôntico, microrganismos, lesões persistentes, extrato glicólico de gengibre.

Cardoso FGR. *Detection and antimicrobial action and antiendotoxic of glycolic ginger extract used as auxiliary chemical substance during endodontic retreatment [dissertation]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2011.*

ABSTRACT

*The aim of the present study was to detect bacterial species, quantify microorganisms and endotoxins within failed root canals presenting periapical lesion, to correlate them with clinical signs and symptoms, and to evaluate the effect of 1% sodium hypochlorite and 20% glycolic ginger extract on microorganisms and endotoxins. Ten endodontically treated teeth presenting persistent periapical lesion were selected for this study and divided into 2 groups (n=5), according to the auxiliary chemical substance employed during the biomechanical preparation (BMP): 1% sodium hypochlorite and 20% glycolic ginger extract interposed with saline solution. Root canal contents were collected right after root canal filling removal, right after instrumentation, and 14 days of calcium hydroxide intracanal medication (ICM) activity. The following tests were performed for every collection: a) antimicrobial activity evaluation by means of microbiologic culture and molecular biology – PCR; b) endotoxins quantification assessed by Limulus amoebocyte lysate. The results were submitted to statistical analysis by Wilcoxon and Mann-Whitney tests. Both BMP and ICM were able to reduce microorganisms and endotoxins quantity, regardless the employed solution. However, endotoxins were not completely neutralized. *E. faecalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. nigrescens*, *P. intermedia*, *P. micra* species were detected within root canals. A positive correlation was detected for the endotoxin quantity and the diameter of lesion. It can be concluded the tested substances were efficient for endotoxin and microorganisms reduction.*

Keywords: *Endodontic retreatment. Microorganisms. Persistent periapical lesions. Glycolic ginger extract.*

1 INTRODUÇÃO

O tratamento endodôntico apresenta taxa de sucesso que varia de 85% a 96% (Smith et al., 1993; Friedman et al., 1995) desde que seja realizado adequadamente. Entretanto, este sucesso é de aproximadamente 66% quando se avalia o retratamento endodôntico (Allen et al., 1989; Hepworth, Friedman, 1997). O menor índice de sucesso dos retratamentos pode ser devido a dificuldades técnicas, fatores iatrogênicos do tratamento anterior ou dificuldades na eliminação da microbiota mais resistente presente no sistema de canais radiculares (SCR) (Siqueira, 2001). Estes microrganismos persistentes podem ser devido a falhas nos procedimentos de desinfecção no tratamento prévio (Siqueira, 2002; Gomes et al., 2008) ou ainda devido a recontaminação do SCR por restaurações coronárias insatisfatórias ou ausentes após o término do tratamento (Peciulienė et al., 2006; Estrela et al., 2008).

Estudos utilizando métodos de cultura microbiológica mostram que a microbiota de canais com insucesso endodôntico difere daquela encontrada normalmente em dentes necrosados e não tratados, tanto quantitativamente quanto qualitativamente, com predominância de espécies anaeróbias facultativas Gram-positivas (Siqueira, 2001; Pinheiro et al., 2003; Adib et al., 2004; Gomes et al., 2004), como *Enterococcus faecalis*, podendo inclusive ocorrer casos de monoinfecção (Hancock et al., 2001; Rocas et al., 2004). Por outro lado, estudos moleculares têm revelado uma microbiota mais complexa (Subramanian, Mickel, 2009), não identificadas pela cultura de microrganismos, como *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas endodontalis*, ou de difícil crescimento em placas de ágar como *Treponema denticola*, *Filifactor alocis* e *Tannerella forsythia*, que

podem ser facilmente detectadas pelo método molecular (Gomes et al., 2008). Outros microrganismos como *Streptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Actinomyces* também têm sido encontrados em canais com insucesso do tratamento endodôntico e presença de lesão periapical (Sundqvist et al., 1998; Pinheiro et al., 2003).

A particularidade da microbiota encontrada nos canais com fracasso do tratamento endodôntico deve-se a um processo de seleção que depende da resistência específica de determinados microrganismos ao preparo biomecânico, da medicação intracanal utilizada durante a terapia endodôntica, e da capacidade de sobrevivência em um meio nutricional restrito, no qual as relações entre bactérias são mínimas (Sundqvist et al., 1998).

Como a maioria dos insucessos endodônticos resulta da proliferação bacteriana no SCR, o retratamento consiste na remoção do material obturador, reinstrumentação e desinfecção do SCR obedecendo aos mesmos princípios biológicos e técnicos que regem a terapia endodôntica (Hepworth, Friedman, 1997); seguido da reobturação, com o objetivo de superar as deficiências do tratamento anterior, permitindo assim a ocorrência da reparação tecidual (Lopes et al., 1999).

Para a desinfecção do SCR várias substâncias químicas auxiliares e medicações intracanaís têm sido utilizadas. O irrigante mais comumente utilizado em endodontia é o hipoclorito de sódio (Ercan et al., 2004; McGurkin-Smith et al., 2005; Tanomaru Filho et al., 2006), que possui capacidade de dissolver o tecido necrótico, bem como potente ação sobre microrganismos, baixa tensão superficial e ação detergente (Haapasalo et al., 2005). A atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio é de amplo espectro eliminando bactérias vegetativas, esporos bacterianos, fungos, protozoários e vírus (Siqueira et al., 1998; Gomes et al., 2005). No entanto, o hipoclorito de sódio não apresenta atividade antimicrobiana residual (Weber et al., 2003), além de poder causar irritação aos tecidos periapicais, quando utilizado em altas concentrações.

Por esta razão, soluções alternativas têm sido estudadas com o objetivo de apresentar efetividade antimicrobiana e biocompatibilidade.

A literatura mundial na área médica e ambiental mostra que existe um aumento crescente nas pesquisas utilizando produtos naturais, que possivelmente apresentam menores possibilidades de agressão ao organismo e ao meio ambiente. Sendo assim, nos últimos anos a descoberta de novas drogas isoladas de plantas, bem como o interesse crescente em terapias alternativas, proporcionou um novo impulso à utilização de extratos naturais.

Dentre as diversas plantas existentes e utilizadas como terapia destaca-se a espécie vegetal *Zingiber officinale*, pertencente a família Zingiberaceae, e popularmente conhecida como gengibre. Os rizomas do gengibre têm sido utilizados como especiaria e na medicina popular para o tratamento de diversas enfermidades, desde desconforto gastrointestinal, no tratamento de hemorragias, reumatismo, doenças respiratórias, processos infecciosos e inflamatórios. Devido a ação antiinflamatória, antimicrobiana e cicatrizante, o gengibre tem ganhado considerável reputação como suplemento fitoterápico no mundo inteiro (Park et al., 2008; Grégio et al., 2006; Cardoso et al., 2010; Chung et al., 2010; Maekawa et al., 2010). Porém, existem poucos relatos de sua aplicação na odontologia. Estudos recentes comprovam ação do extrato glicólico e alcoólico do gengibre sobre bactérias como *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Porphyromonas endodontalis* e *Prevotella intermedia* (Park et al., 2008). No estudo de Grégio et al. (2006) o gengibre foi efetivo inclusive sobre *Candida albicans*, indicando sua ação antibacteriana e antifúngica.

Na endodontia, Cardoso et al. (2010) avaliaram *in vitro* a efetividade do extrato glicólico de gengibre como solução irrigadora e medicação intracanal. Os resultados mostraram efetiva ação antimicrobiana sobre *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e *Escherichia coli*; além disso, ocorreu redução de endotoxinas. Resultados

semelhantes foram encontrados por Chung et al. (2010) e Maekawa et al. (2010).

Entretanto, mesmo que as substâncias químicas auxiliares tenham ação durante o preparo biomecânico, microrganismos e endotoxinas podem permanecer no SCR. Vários estudos demonstram a importância do uso de uma medicação intracanal com o objetivo de potencializar a sanificação do sistema de canais e túbulos dentinários e impedir que os microrganismos se multipliquem no intervalo entre sessões de tratamento (Bystrom, Sundqvist, 1981; Bystrom, Sundqvist, 1983; Bystrom et al., 1985). Tradicionalmente, o hidróxido de cálcio têm sido um dos medicamentos mais utilizados pela sua destacada ação antimicrobiana, solvente tecidual e indutor de mineralização, requerendo para isto um período mínimo de 7 dias. A atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio está associada a seu alto pH (Salgado et al., 2009). Além disso, possui efetiva ação sobre endotoxinas, pois promove hidrólise da porção lipídica da endotoxina, neutralizando seus efeitos biológicos (Oliveira et al., 2005; Leonardo, 2005).

Desta forma, é importante avaliar a microbiota e/ou endotoxinas encontradas no SCR de dentes com insucesso do tratamento endodôntico. Além disso, o estudo da susceptibilidade destes microrganismos ao preparo biomecânico (PBM) utilizando hipoclorito de sódio 1% e extrato glicólico de gengibre 20% como substância química auxiliar pode ser de grande importância na endodontia para futuramente adotar-se novos protocolos para a prática clínica.

Assim, espera-se que o extrato natural tenha ação sobre microrganismos e endotoxinas igual ou superior as substâncias químicas auxiliares comumente utilizadas na endodontia.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fatores associados ao insucesso do tratamento endodôntico

O fracasso do tratamento endodôntico é devido, principalmente, a persistência de infecção no SCR (Nair et al., 1999), e frequentemente está associado ao surgimento ou à persistência de uma inflamação periapical (Strindberg, 1956). Microrganismos presentes no interior do SCR constituem os principais agentes etiológicos desta inflamação periapical (Takehashi et al., 1965; Takahashi, 1998). Entretanto, essa infecção persistente pode ser devido a outros fatores como descontrole de assepsia durante o tratamento, acesso incorreto à cavidade pulpar, canais não detectados, falhas na instrumentação, obturações inadequadas e restaurações coronárias insatisfatórias ou ausentes após o tratamento endodôntico (Cheung, 1996).

Sjögren et al. (1990) relataram que o nível da instrumentação e obturação dos canais radiculares tem uma influência significativa no prognóstico do tratamento endodôntico de dentes com polpas necrosadas e lesões periapicais, que apresentaram taxa de sucesso inferior aos dentes com polpas vitais.

De acordo com Dahlén e Möller (1992), as falhas técnicas do tratamento endodôntico não podem, por si só, causar ou manter a inflamação periapical, uma vez que obturação incompleta do canal radicular deixa um espaço na região apical, favorecendo a persistência de microrganismos e seus produtos, que causam danos aos tecidos periapicais. Além disso, a obturação inadequada geralmente é resultado

de uma instrumentação inadequada, o que proporciona a manutenção de restos necróticos e bactérias no canal radicular.

Smith et al. (1993) ressaltaram que o sucesso do tratamento endodôntico sofre influência dos fatores técnicos, como o nível da obturação. Os autores encontraram que canais com sobre-obturações e obturações incompletas apresentavam maior índice de insucesso quando comparado com aqueles obturados a 2 mm do ápice radiográfico. Entretanto, esses fatores só foram determinantes de insucesso em canais com polpas necrosadas e lesões periapicais.

De acordo com Sundqvist et al. (1998), o número de espécies bacterianas isoladas nos casos de retratamento está provavelmente relacionado à qualidade do tratamento endodôntico inicial. Dentes com tratamentos endodônticos de má qualidade, isto é, dentes com obturações muito aquém do ápice ou com falhas, apresentam microbiota similar àquela encontrada nos dentes não-tratados, os quais contêm um maior número de espécies bacterianas.

Além da infecção persistente, o insucesso do tratamento endodôntico também tem sido relacionado à ausência de um selamento coronário adequado após o tratamento endodôntico. Trabalhos demonstram que bactérias e seus produtos podem penetrar nas falhas marginais de uma restauração defeituosa e na interface entre o material obturador e o canal radicular, e atingir a região periapical (Cheung, 1996).

Ray e Trope (1995) avaliaram a relação entre a qualidade da restauração coronária e da obturação do canal radicular de 1010 dentes com tratamento endodôntico prévio e restaurados, com o objetivo de avaliar o índice de sucesso do tratamento endodôntico. Os resultados mostraram que tratamentos endodônticos e restaurações coronárias de boa qualidade resultaram em um sucesso de 94%, tratamentos endodônticos adequados e restaurações defeituosas, o índice caía para 44,1%; tratamentos endodônticos com falhas e boas restaurações coronárias, o índice de sucesso era de 67,6%; e tratamento endodônticos

e restaurações inadequadas apresentavam um baixo índice de 18,1%. Os autores concluíram que a qualidade da restauração coronária definitiva é significativamente mais importante do que a qualidade técnica do tratamento endodôntico para manutenção da saúde periapical de dentes tratados endodonticamente.

Hommeiz e Moor (2005) encontraram uma maior incidência de lesões periapicais nos dentes tratados endodonticamente afirmando que fatores pré e pós operatórios podem ser os responsáveis por esta prevalência, como isolamento absoluto do elemento dental, seguido da limpeza e modelagem do canal radicular durante a terapia endodôntica. Todos estes procedimentos são importantes e promovem a desinfecção trazendo a cura e previne o aparecimento de lesões periapicais. Ressaltam ainda que uma boa obturação assim como uma boa restauração são importantes na prevenção da reinfecção dos canais radiculares.

Peciulienė et al. (2006) estudaram os fatores relacionados ao fracasso endodôntico e também observaram que obturações inadequadas estão associadas com o aumento da prevalência de lesões periapicais. Ao contrário, canais com bom tratamento endodôntico reduz significativamente a prevalência destas alterações.

Imura et al. (2007) avaliaram o resultado do tratamento e retratamento endodôntico realizado por especialista em endodontia. Um total de 2000 dentes foram examinados clínica e radiograficamente. A taxa de sucesso endodôntico foi de 91,45%, sendo maior nos tratamentos endodônticos (94%) do que nos retratamentos (85,9%); dentes sem lesão do que aqueles com lesões; dentes tratados, sem complicações do que aqueles com complicações e dentes com restauração coronária final do que para aqueles sem restauração.

Estrela et al. (2008) avaliaram, através de radiografias, que dentes com lesões periapicais que apresentam tratamento endodôntico adequado e que possuem restaurações inadequadas tiveram

uma prevalência de 28% de lesões periapicais. Entretanto, nos dentes que apresentavam restauração e tratamento endodôntico inadequados, a presença de lesões periapicais ocorreu em 71,7% dos casos.

2.2 Microbiota das infecções endodônticas persistentes

Além dos problemas anatômicos, que consistem em áreas inacessíveis à instrumentação, o fracasso endodôntico pode advir da resistência de determinadas bactérias aos métodos químicos e mecânicos utilizados na terapia endodôntica convencional. Casos de acidentes, como desvios, degraus, perfurações, instrumentos fraturados e sobre-obturações, usualmente resultam em fracasso quando associados a um processo infeccioso (Lopes et al., 1999).

Engström (1964) investigou a presença de *Enterococcus* ssp. nas infecções endodônticas e verificou que estas estavam presentes em 20,9% das amostras de dentes com tratamento endodôntico prévio, enquanto representavam 12,1% das amostras de polpas necrosadas. Foi relatada no trabalho as dificuldades em eliminar esses microrganismos dos canais radiculares, constituindo um problema na terapêutica endodôntica.

Möller (1966), realizando um estudo microbiológico de 654 canais radiculares de dentes com polpas vitais, polpas necróticas e com tratamento endodôntico prévio, relatou que a microbiota de dentes com fracasso na terapia endodôntica era composta por um número menor de microrganismos quando comparada aos dentes com polpas necróticas, apresentando uma média de 1,6 espécie bacteriana por canal. Os autores relataram que havia um equilíbrio entre as bactérias anaeróbias facultativas e estritas, e um predomínio de bactérias Gram-positivas, compreendendo 80% dos isolados. Espécies do gênero *Streptococcus*,

Enterococcus, *Peptostreptococcus*, *Lactobacillus* e *Eubacterium* foram isoladas frequentemente; enquanto *Prevotella* e *Fusobacterium* foram menos frequentes.

Lin et al. (1991), estudaram através de avaliação clínica, radiográfica e histobacteriológica 150 casos de insucesso do tratamento endodôntico, e detectaram bactérias em 69% dos dentes, presentes principalmente no interior dos canais radiculares, estando relacionadas com a severidade da infecção periapical.

No ano seguinte, Lin et al. (1992), utilizando os mesmos critérios de avaliação, estudaram 236 dentes associados ao fracasso do tratamento endodôntico. Detectaram a presença de bactérias nos canais radiculares em 67% dos casos. Os autores relataram que a persistência da infecção bacteriana no SCR e a presença pré-operatória de lesão periapical constituíam os principais fatores associados ao insucesso endodôntico.

Tani et al. (1992) isolaram bactérias dos canais radiculares de 40 dentes com tratamento endodôntico prévio e lesão periapical. Todos os pacientes apresentavam dor à percussão e à palpação, e radiograficamente todos os canais envolvidos revelaram obturações deficientes. As bactérias isoladas incluíam: *Bacteroides spp.*, *Veillonella parvula*, *Streptococcus constellatus*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium spp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Lactobacillus plantarum* e *Propionibacterium propionicum*.

Reader et al. (1994) isolaram *Staphylococcus aureus*, como microrganismo único, após incubação anaeróbia e aeróbia do exsudato de um dente com tratamento endodôntico prévio e lesão periapical persistente.

Gomes et al. (1996), com o objetivo de estudar a microbiota dos canais radiculares e sua associação com sinais e sintomas clínicos, realizaram coletas de 70 canais infectados, dos quais 21 apresentavam tratamento endodôntico prévio e, em sua maioria, a

presença e sintomatologia dolorosa. *Propionibacterium* foi o gênero mais frequentemente isolado nos canais com tratamento endodôntico prévio. Entretanto, espécies anaeróbias pertencentes ao gênero *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, e também facultativas como *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Actinomyces*, também foram isoladas. Os autores verificaram a associação de dor com espécies de *Prevotella ssp.* e *Peptostreptococcus ssp.*

Molander et al. (1998) analisaram a microbiota de 100 dentes tratados endodonticamente com presença de lesão periapical. A remoção do material obturador foi realizada utilizando brocas de Gates Glidden e limas endodônticas, e em 21 casos, foi utilizado clorofórmio como material solvente de guta-percha. Os resultados mostraram que bactérias estavam presentes em 68 dentes, porém o uso do clorofórmio foi considerado um fator influente, diminuindo o crescimento bacteriano. Dos 21 casos onde foi utilizado o clorofórmio, houve crescimento bacteriano em apenas 10 casos (47,3%), enquanto nos 79 dentes restantes o crescimento foi detectado em 58 canais (73,4%). Um total de 117 amostras microbianas foi isolado, com 114 bactérias e 3 fungos. A maioria dos canais continha uma ou duas espécies bacterianas (85% dos casos). As bactérias anaeróbias facultativas Gram-positivas predominaram, constituindo 69% das espécies isoladas. As espécies isoladas foram: *Enterococcus ssp.*, *Streptococcus ssp.*, *Lactobacillus ssp.*, *Staphylococcus ssp.*, *Peptostreptococcus ssp.*, *Actinomyces ssp.*, bacilos anaeróbios Gram-positivos, bacilos facultativos Gram-negativos, *Veillonella ssp.*, *Fusobacterium*, *Prevotella* e *Candida ssp.* *Enterococcus* foi o gênero bacteriano mais frequentemente isolado, presente em 47% dos casos com bactérias. Os autores concluíram que a microbiota dos dentes tratados endodonticamente diferenciava, tanto quantitativamente quanto qualitativamente, dos dentes com polpas necrosadas e enfatizaram a necessidade de novas estratégias de combate à infecção desses dentes durante o retratamento endodôntico.

Sundqvist et al. (1998) realizaram coletas microbiológicas de 54 dentes tratados endodonticamente, assintomáticos, e com lesões periapicais visíveis radiograficamente. A desobturação dos canais foi realizada sem o uso de solventes da guta-percha. Foi detectado crescimento bacteriano em 24 casos, sendo caracterizado por monoinfecções de microrganismos predominantemente Gram-positivos (87% das bactérias isoladas), com proporções aproximadamente iguais de bactérias anaeróbias facultativas (58%) e estritas (42%). Os gêneros isolados foram: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Actinomyces*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium* e *Bacteroides*. *Candida ssp.* foram detectadas em 2 casos. *Enterococcus faecalis* foi a espécie bacteriana mais frequentemente encontrada (38%).

Love (2001) demonstrou que *Enterococcus faecalis* têm a capacidade de invadir os túbulos dentinários, podendo facilitar sua fuga aos procedimentos de desinfecção e instrumentação. Estes microrganismos também têm demonstrado resistência ao hidróxido de cálcio que é a medicação intracanal comumente utilizada para a desinfecção dos canais radiculares (Hepworth e Friedman, 1997). Além desses fatores, *Enterococcus faecalis* têm a capacidade de sobreviver em canais radiculares sem a relação cooperativa de outras bactérias, como monoinfecção.

Cheung e Ho (2001) investigaram a microbiota de 18 dentes tratados endodonticamente associados a lesões periapicais crônicas. Os resultados mostraram crescimento bacteriano em 12 dentes (66,7%), sendo cocos Gram-positivos anaeróbios facultativos os microrganismos mais frequentemente isolados. Especialmente os gêneros *Staphylococcus ssp.*, *Streptococcus ssp.* e *Enterococcus ssp.* não foram isolados neste estudo.

Bactérias presentes nos canais de dentes que fracassaram após tratamento endodôntico podem ser originalmente derivadas da infecção primária (Fukushima et al., 1990; Sjogren et al.,

1997), introduzidas no canal por procedimentos inadequados durante o tratamento endodôntico prévio (Siren et al., 1997), ou ainda, penetrarem no canal através de um selamento coronário inadequado (Cheung, 1996).

Gomes et al. (2004) realizaram um estudo microbiológico de 60 canais radiculares de dentes com polpas necrosadas (n=41 – infecção primária) e também com tratamento endodôntico prévio (n=19 – infecção secundária) associadas a lesões periapicais. Os resultados mostram que a microbiota da infecção primária mostra um equilíbrio de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo a maioria anaeróbias estritas, contendo mais de 3 espécies por canal radicular. Por outro lado, a infecção secundária apresenta maior número bactérias Gram-positivas, anaeróbias facultativas, com cerca de 1 ou 2 espécies por canal. Além disso, encontraram uma associação entre os casos de insucesso endodôntico e espécies do gênero *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Fusobacterium*.

Ainda em 2004, Siqueira e Roças (2004) isolaram bactérias de 22 amostras de canais radiculares que apresentavam insucesso do tratamento endodôntico e presença de lesão periapical. O DNA foi extraído das amostras e analisados para a presença de 19 espécies microbianas usando o teste molecular de reação em cadeia de polimerase (PCR). Todas as amostras foram positivas a pelo menos uma das seguintes bactérias Gram-positivas: *Enterococcus faecalis*, *Pseudoramibacter alactolyticus* ou *Propionibacterium propionicum*. *Enterococcus faecalis* foi a espécie mais prevalente, detectada em 77% dos casos. As outras espécies mais isoladas foram: *Pseudoramibacter alactolyticus* (52%), *Propionibacterium propionicum* (52%), *Dialister pneumosintes* (48%) e *Filifactor alocis* (48%). *Candida albicans* foi isolada em 9% das amostras.

Gomes et al. (2005) avaliaram a presença de *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* em infecções endodônticas primárias

(n=50) e secundárias (n=50) pelos métodos de cultura microbiológica e análise de PCR. No método molecular PCR, houve maior detecção de microrganismos (50/100) quando comparado a cultura microbiológica (13/100). *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. intermedia* e *P. nigrescens* foram identificadas mais frequentemente em dentes com polpas necrosadas do que em dentes com falhas no tratamento endodôntico.

Gomes et al. (2006) investigaram a presença de 3 espécies de anaeróbios estritos em infecções primárias (n=50) e canais com necessidade de retratamento endodôntico (n=50) com presença de lesões periapicais por análise molecular e associação dessas espécies com sinais e sintomas endodônticos. Este estudo indica que *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* possuem forte correlação com sinais e sintomas clínicos. *F. alocis* (12/50) e *T. denticola* (12/50) foram os microrganismos mais detectados nos casos de infecções secundárias.

Schirrmeister et al. (2007) detectaram a presença de microrganismos por cultura e por PCR em dentes obturados assintomáticos com presença de lesão periapical. Foram feitas coletas do conteúdo radicular após desobturação de 20 casos. A prevalência de microrganismos foi de 60% por cultura e 65% por PCR. Em 4 de 20 amostras (31%) foi encontrado *Enterococcus faecalis*. Resultados semelhantes foram encontrados por Cheung e Ho (2001) e Hancock et al. (2001).

Gomes et al. (2008) estudaram a presença de nove espécies bacterianas em dentes tratados endodonticamente associados a lesões periapicais e relataram que *Enterococcus faecalis* é o microrganismo mais encontrado em casos de falha do tratamento endodôntico. Similarmente, bactérias anaeróbias Gram-negativas comumente encontradas em infecções endodônticas primárias, como *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia* e

Treponema denticola não são frequentemente detectadas em casos de falha no tratamento endodôntico, mas podem estar associados com as características clínicas e exercer uma relação de sinergismo influenciando a patogenicidade do insucesso do tratamento.

Isolar e detectar microrganismos de dentes tratados endodonticamente associados com lesões periapicais foi o objetivo da pesquisa de Schirrmeyer et al. (2009). Foram coletadas amostras de dentes de pacientes submetidos ao retratamento endodôntico. As bactérias foram caracterizadas por análise morfológica e bioquímica com identificação pela seqüência do gene 16S rRNA. Microrganismos foram detectados em 10 dos 18 dentes. A maioria das amostras positivas revelaram a presença de 2 a 8 espécies. Em dois dentes, *Enterococcus faecalis* foi encontrado como espécie única. Pela primeira vez, *Vagococcus fluvialis* foram detectados em canais radiculares. Entretanto, *Solobacterium moorei* e *Fusobacterium nucleatum* foram as espécies mais prevalentes.

2.3 Endotoxinas

O insucesso do tratamento endodôntico está principalmente relacionado à presença de microrganismos e produtos de seu metabolismo (Takehashi et al., 1965). Ao longo dos anos, a alta prevalência de microrganismos anaeróbios Gram-negativos tem sido relacionada com canais radiculares com lesões apicais visíveis radiograficamente (Sundqvist, 1992; Assed et al., 1996). Sabe-se que durante a morte ou multiplicação celular, as bactérias Gram-negativas liberam endotoxinas, compostas por lipopolissacarídeos (LPS), causando importantes efeitos biológicos (Barthel et al., 1997), os quais levam à

reação inflamatória (Rietschel, Brade, 1992) e reabsorção óssea periapical (Yamasaki et al., 1992).

A parede celular de bactérias Gram-negativas como *Prevotella*, *Porphyromonas* ou *Fusobacterium* contém endotoxinas, que são moléculas estáveis ao calor compostas de polissacarídeos (açúcares polimerizados), lipídios (complexos contendo ácidos graxos) e proteínas. Em termos moleculares, o LPS é composto por três segmentos covalentemente ligados: o Lipídio A, o Core e o Antígeno O. O Lipídio A é a região da molécula de endotoxina responsável por seus efeitos tóxicos (Rietschel, Brade, 1992). Além da estrutura química, muito se tem pesquisado sobre o mecanismo de ação de endotoxinas. Quando liberadas, endotoxinas não causam lesões nas células ou nos tecidos diretamente, mas estimulam as células competentes a liberar mediadores químicos. Lipopolissacarídeos agem sobre macrófagos (Rietschel, Brade, 1992), neutrófilos (Munford, Hall, 1986) e fibroblastos (Day et al., 1998) levando a liberação de mediadores químicos inflamatórios, como fator de necrose tumoral (TNF) (Blix, Helgeland, 1998), interleucina-1 (IL-1), IL-5, IL-8 (Matsushita et al., 1999), interferon alfa e prostaglandinas. Além disso, LPS é citotóxico (Horiba et al., 1989) e um potente estimulador de produção de óxido nítrico (Blix, Helgeland, 1998).

Durante morte ou multiplicação celular, a endotoxina liberada conduz fenômenos que iniciam a resposta inflamatória, tais como: quimiotaxia de polimorfonucleares (PMNs), liberação de enzimas lisossomais de PMNs, ativação do sistema complemento, aumento da temperatura corporal, atração de osteoclastos (Farber, Seltzer, 1988), alteração da estrutura e função de vários órgãos e células, assim como das funções metabólicas e hemodinâmicas (Martich et al., 1993). Além de causar reação inflamatória, o LPS adere irreversivelmente nos tecidos mineralizados atuando como potente estimulador de reabsorção óssea atuando na síntese e liberação de citocinas que ativam os osteoclastos (Ito et al., 1996; Jiang et al., 2003), desempenhando um papel de suma

importância na reabsorção óssea associada com lesões periapicais (Torabinejad et al., 1985). Em canais radiculares infectados, endotoxinas podem contribuir na liberação de substâncias vasoativas e neurotransmissores das terminações nervosas dos tecidos periapicais, conduzindo a ocorrência de dor (Seltzer, Farber, 1994).

Pitts et al. (1982) avaliaram o papel da endotoxina sobre os tecidos apicais e periapicais de 16 dentes de cães. Doze dentes foram instrumentados no nível do delta apical e 4 dentes foram submetidos ao arrombamento apical. Metade dos canais radiculares de cada grupo foram preenchidos com 0,1 mL da solução de endotoxina de *Salmonella minnesota*, os demais foram preenchidos com solução salina fisiológica. Semanalmente, as soluções (endotoxina e salina) foram renovadas no interior dos canais radiculares. Os resultados mostram que as alterações radiográficas e periapicais ocorridas foram mais severas nas raízes contendo endotoxinas do que nas raízes contendo solução salina. A avaliação histológica também demonstrou maior destruição óssea periapical e maior resposta inflamatória nos espécimes contendo endotoxinas. Os autores concluíram que as endotoxinas podem desempenhar um papel de fundamental importância na inflamação periapical e na destruição óssea.

Mattison et al. (1987) também analisaram os efeitos da endotoxina sobre os tecidos periapicais de dentes de cães. Após a realização do exame radiográfico periapical padronizado, 28 dentes (56 raízes) foram submetidos à abertura coronária, pulpectomia, odontometria e preparo biomecânico com arrombamento apical. Quarenta e duas raízes foram preenchidas com 0,1 mL de endotoxina de *Eikenella corrodens*, 8 raízes com endotoxina de *Escherichia coli* e 6 raízes com água destilada. Este procedimento foi repetido, semanalmente, durante 4 semanas. Os resultados mostram que 90,4% das raízes tratadas com endotoxina de *E. corrodens* e 75% das raízes tratadas com endotoxina de *E. coli* exibiram lesões periapicais. As 6 raízes preenchidas com água, apresentaram leve

espessamento do ligamento periodontal. A análise histopatológica evidenciou reação inflamatória, reabsorção óssea periapical e reabsorção radicular externa significantes, proliferação vascular, edema e infiltrado inflamatório intenso nos dentes preenchidos com endotoxina, sugerindo que a iniciação e perpetuação da inflamação e da reabsorção óssea periapical em dentes infectados pode ser mediada pela endotoxina de microrganismos Gram-negativos.

Altos níveis de endotoxinas têm sido associados com o desenvolvimento de dor espontânea (Horiba et al., 1991; Khabbaz et al., 2001; Jacinto et al., 2005) e sintomatologia clínica como dor à percussão (Martinho, Gomes, 2008) e dor à palpação (Jacinto et al., 2005).

Horiba et al. (1991) avaliaram a correlação entre o conteúdo de endotoxinas e sinais e sintomas clínicos como: dor espontânea, dor à percussão, exsudato ou áreas radiolúcidas. Pontas de papel absorvente estéreis foram introduzidas por um minuto na região apical de 30 dentes unirradiculares com periodontite apical, para absorver o exsudato e microrganismos, e armazenados em soro fisiológico apirogênico. Endotoxina foi detectada nos 16 dentes sintomáticos e em 4 dos 14 dentes assintomáticos, em 19 dos 22 dentes com área radiolúcida e em 19 dos 20 dentes com presença de exsudato. O estudo indicou uma correlação positiva entre a presença de endotoxinas e os sintomas clínicos ou áreas radiolúcidas. Tal correlação sugere que um aumento no nível de endotoxina em canais radiculares infectados pode estar associado com um aumento da inflamação periapical.

Khabbaz et al. (2001) investigaram a presença de endotoxinas no tecido pulpar de 28 dentes unirradiculares cariados, sendo 15 sintomáticos e 13 assintomáticos. Também foram coletadas amostras de 5 dentes unirradiculares hígidos (grupo controle). Endotoxinas foram detectadas em todos os tecidos pulpares dos dentes sintomáticos e em 2/13 dentes assintomáticos. Nenhuma endotoxina foi encontrada no grupo controle. O estudo sugere que a concentração de endotoxinas tem papel

importante na patogênese e sintomatologia pulpar, sendo que quanto maior a concentração de endotoxina, maior a severidade da dor.

Jacinto et al. (2005) quantificaram endotoxinas de 50 canais radiculares de dentes necrosados, e investigaram a relação entre a concentração de LPS com sinais e/ou sintomas de origem endodôntica. Além disso, através do método de cultura microbiana, foram registrados os números de unidades formadoras de colônias (UFCs) de cada amostra. Todas as amostras apresentaram crescimento de microrganismos e presença de endotoxinas. Nos casos associados à dor espontânea, a média de UFC foi de $1,43 \times 10^6$, enquanto nos assintomáticos foi de $9,1 \times 10^4$. A concentração média de endotoxina nos casos com dor espontânea foi de 18540 EU/mL, enquanto que nos casos assintomáticos a média foi de 12030 EU/mL. Os resultados mostram uma correlação positiva entre a concentração de endotoxina e os casos sintomáticos, concluindo que as endotoxinas estão presentes em altas concentrações nos canais radiculares de dentes sintomáticos.

Estudos *in vitro* e *in vivo* envolvendo a quantificação de endotoxinas em dentes com necrose pulpar e lesão periapical, assim como estudos após o preparo biomecânico, mostram a eficácia dos procedimentos endodônticos na redução e/ou eliminação do conteúdo endotóxico (Chung et al., 2010; Cardoso et al., 2010; Endo, 2011).

Oliveira et al. (2007) avaliaram o efeito de irrigantes endodônticos sobre endotoxinas em 98 dentes humanos extraídos. Endotoxina de *Escherichia coli* foi inoculada em 84 canais radiculares, e divididos em sete grupos (n=14) de acordo com a solução irrigante preconizada: hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5% (G1); NaOCl 5,25% (G2); Clorexidina (CLX) 2% (G3); solução de hidróxido de cálcio 0,14% (G4); polimixina B (G5); controle positivo (solução salina, G6) e controle negativo (G7). Foram coletadas amostras dos canais radiculares imediatamente após a instrumentação e após 7 dias da coleta inicial. A quantificação de endotoxinas foi mensurada pelo teste do Lisado de

Amebócito de *Limulus* e produção de anticorpos em cultura de linfócitos B. Em ambas as coletas, os grupos G4, G5 e G7 apresentaram resultados significativamente melhores que os grupos G1, G2, G3 e G6 ($p < 0,05$). Os autores concluíram que as substâncias do grupo G4 e G5 inativaram endotoxinas dos canais radiculares e alteraram as propriedades do LPS de estimular a produção de anticorpos pelos linfócitos B. O NaOCl e a CLX não inativaram as endotoxinas.

Vianna et al. (2007) investigaram em 24 dentes necrosados a concentração de endotoxinas e bactérias cultiváveis antes e após o preparo biomecânico (PBM) com clorexidina gel (CLX) 2% e após 7 dias de medicação intracanal, com o objetivo de verificar os efeitos antimicrobianos e anti-endotóxicos dos procedimentos endodônticos. As medicações utilizadas foram: pasta de hidróxido de cálcio [$\text{Ca}(\text{OH})_2$], CLX gel 2% e associação $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + CLX gel 2%. Endotoxinas e bactérias foram detectadas em todas as amostras na coleta inicial, sendo que a média de redução de endotoxina e de microrganismos após o PBM foi de 44,4% e 99,96%, respectivamente. Não foi constatada nenhuma melhora após utilização da medicação intracanal por uma semana.

Martinho e Gomes (2008) avaliaram *in vivo* a presença de microrganismos e quantificação de endotoxinas em 24 canais radiculares com necrose pulpar e presença de lesão periapical. Foram realizadas coletas antes e após o PBM, utilizando como solução irrigadora NaOCl 2,5%. Além disso, correlacionaram endotoxina e bactéria cultivável com a presença de sintomatologia clínica. Todas as amostras iniciais apresentaram bactérias cultiváveis e endotoxinas, com mediana de $2,64 \times 10^5$ UFC/mL e 139 EU/mL, respectivamente. Altos níveis de LPS foram encontrados em dentes com sintomatologia clínica ($p < 0,05$). A redução bacteriana e de endotoxina após o PBM obteve uma média de 99,78% e 59,99%, respectivamente. Os autores concluíram que a instrumentação utilizando NaOCl 2,5% foi mais efetiva contra bactérias que endotoxinas na infecção do canal radicular, e observaram uma associação significativa

entre altos níveis de endotoxinas e sintomatologia clínica.

Gomes et al. (2009) estudaram o efeito do PBM com NaOCl 2,5% e CLX gel 2% na redução e/ou eliminação de LPS. Foram analisados 54 canais radiculares de dentes com necrose pulpar, divididos em 2 grupos de acordo com a solução química auxiliar. Foi detectada endotoxina em todas as amostras. A porcentagem da redução de endotoxina após o PBM foi de 57,98% (NaOCl 2,5%) e 47,13% (CLX gel 2%). Os autores concluíram que ambos os grupos não apresentaram efetividade na eliminação de endotoxina em infecções endodônticas primárias.

Valera et al. (2010) avaliaram o efeito do extrato glicólico de própolis e de medicações intracanaís sobre endotoxinas de *Escherichia coli* em 48 dentes humanos extraídos. Após instrumentação inicial, os dentes foram esterilizados por radiação gama cobalto para neutralização de endotoxinas pré-existentes. Em seguida, os dentes foram contaminados com *E. coli* durante 14 dias. Após verificação de contaminação (1ª coleta), todos os espécimes foram instrumentados utilizando extrato glicólico de própolis como substância química auxiliar, seguida de 2ª coleta. Os espécimes foram divididos em 3 grupos de acordo com a medicação intracanal: pasta de Ca(OH)₂, polimixina B e associação de Ca(OH)₂ + CLX gel 2% (3ª coleta). Os resultados mostram que o extrato glicólico de própolis foi efetivo como solução irrigadora sobre *E. coli* eliminando esses microrganismos e reduziu os níveis de endotoxinas. Todas as medicações contribuíram para redução significativa de endotoxinas, sendo que os melhores resultados foram encontrados nas medicações de Ca(OH)₂.

Apesar de encontrarmos na literatura muitos estudos avaliando endotoxinas em dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical, poucos trabalhos avaliam os níveis de LPS em dentes com falha no tratamento endodôntico.

Endo (2011) quantificou *in vivo* endotoxinas presentes em

15 dentes unirradiculares com insucesso endodôntico e presença de lesão periapical, correlacionando esses valores com aspectos clínicos. As coletas foram realizadas imediatamente após a desobturação do canal radicular e após PBM utilizando CLX gel 2% como substância química auxiliar. Em todas as amostras foram detectadas concentrações de endotoxinas, sendo que após PBM, observou-se redução significativa dos níveis de endotoxinas (60%). Correlacionando com os sinais e sintomas clínicos, não foi verificada correlação entre esses valores e os aspectos clínicos de dor à palpação e à percussão. No entanto, foi observada correlação positiva entre altos níveis de endotoxinas e lesão periapical maior que 5 mm. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa em relação às UFCs e o tamanho da lesão periapical.

2.4 Extratos Naturais

Nos últimos anos, estudos têm sido realizados a fim de utilizar produtos de origem vegetal que não agredem o meio ambiente e que possam ser utilizados na odontologia com a vantagem de ser biocompatíveis e apresentarem menos efeitos colaterais (Drumond et al., 2004).

Extratos e chás de diversas plantas são utilizados na medicina popular desde a antiguidade, entretanto, suas reais propriedades e aplicações estão sendo cientificamente avaliadas. Na odontologia, muitos estudos têm sido realizados para avaliar o uso de diversos produtos naturais como a copaíba, mamona, sálvia, própolis, gengibre entre outros (Maekawa et al., 2008; Cardoso et al., 2010, Chung et al., 2010; Maekawa et al., 2010). Isto se deve principalmente devido a atividade antiinflamatória, cicatrizante, antifúngica, bactericida e bacteriostática (Lotufo et al., 2005; Paulino et al., 2006). Além destas

propriedades, o gengibre tem mostrado também atividade antimicrobiana e cicatrizante (Grégio et al., 2006).

O *Zingiber officinale*, conhecido como gengibre, pertence à família Zingiberaceae, gênero Zingiber, tem sido alvo de estudos científicos na sua forma de extrato bruto, extrato etanólico e cetônico. O gengibre é rico em óleos voláteis, gingerol e shogaol. O componente da raiz gengibre possui atividade antibacteriana sobre as bactérias *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Burkholderia pseudomallei* e *Staphylococcus aureus* (Pereira, 2002; Ruff et al., 2006).

Analisando os componentes ativos do gengibre, Lantz et al. (2007), verificaram que o gingerol e o shogaol foram capazes de inibir significativamente a produção de prostaglandinas E₂ induzidas pelo LPS de *Escherichia coli*. Os extratos contendo principalmente gingerol tiveram a capacidade de inibir a produção de COX-2, enquanto que os extratos contendo shogaol não tiveram efeito sobre a COX-2.

Pereira et al. (2003) avaliaram o efeito do gengibre no processo de cicatrização de úlceras na mucosa bucal de ratos e verificaram que o gengibre, na sua forma de extrato aquoso, não possui efeitos farmacológicos significativos, porém o seu extrato óleo resinoso é farmacologicamente ativo, promovendo a cicatrização das áreas ulceradas.

Pessa et al. (2008) verificaram, em mucosa de ratos, que o gel de gengibre 0,5% apresentou reepitelização mais rápida quando comparada à solução salina e ao peróxido de carbamida 16% no período de 7 a 14 dias. Aos 7 dias, o grupo do gengibre apresentou deposição de colágeno enquanto que os grupos da solução salina e do peróxido de carbamida apresentaram infiltrado inflamatório intenso com presença de macrófagos e neutrófilos. Ainda aos 21 dias, foi observada a presença de vasos, sugerindo uma rica vascularização promovida pelo gengibre, concluindo que preparações farmacêuticas contendo este fitoterápico

possuem ação cicatrizante e protetora da mucosa oral.

Grégio et al. (2006) avaliaram o extrato glicólico e alcoólico do gengibre sobre *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* e verificaram que tanto o extrato glicólico quanto o alcoólico apresentaram atividade antimicrobiana e antifúngica relevante para odontologia, podendo contribuir para o tratamento de doenças causadas por esses microrganismos presentes na cavidade oral.

Park et al. (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana do gengibre sobre três bactérias anaeróbias Gram-negativas: *P. gingivalis*, *P. endodontalis* e *P. intermédia*, causadoras de periodontites. Concluíram que apenas dois componentes do gengibre ([10]-gingerol e [12]-gingerol) são capazes de eliminar e inibir efetivamente o crescimento dos microrganismos testados. O gengibre também apresentou atividade antimicrobiana contra *E. coli* em um estudo realizado por Indu et al. (2006).

O óleo de gengibre possui atividade fungistática e fungicida sobre o biofilme de *C. albicans* e outras espécies de fungos, podendo ser usado futuramente em estratégias terapêuticas (Ficker et al., 2003; Agarwal et al., 2008).

Aguiar et al. (2009) avaliaram *in vitro* a atividade do extrato glicólico de gengibre e do hipoclorito de sódio 2,5% sobre *C. albicans* verificando sua atividade antifúngica em diferentes concentrações. Os resultados mostram que o extrato glicólico de gengibre apresentou ação fungicida a partir da concentração 12,5% (DFM – diluição fungicida mínima) enquanto o hipoclorito de sódio 2,5% apresentou atividade fungicida desde a diluição 6%.

Cardoso et al. (2010) avaliaram *in vitro* a ação do extrato glicólico de gengibre como solução irrigadora e medicação intracanal sobre *E. faecalis*, *C. albicans*, *E. coli* e endotoxinas concluindo que o gengibre apresentou atividade antimicrobiana, foi capaz de diminuir

significativamente endotoxinas, mas não foi capaz de neutralizá-las completamente. Resultados semelhantes foram observados por Maekawa et al. (2010).

Chung et al. (2010) também avaliaram o extrato glicólico de gengibre como medicação intracanal, porém utilizando o hipoclorito de sódio como solução irrigadora. Concluíram que as medicações tiveram ação antimicrobiana. Além disso, redução de endotoxinas também puderam ser observadas (Cardoso et al., 2010; Chung et al., 2010; Maekawa et al., 2010).

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste estudo são:

- 1) Detectar espécies bacterianas por reação em cadeia de polimerase (PCR) e quantificar microrganismos e endotoxinas presentes nos canais radiculares de dentes com insucesso no tratamento endodôntico e com lesão periapical visível radiograficamente. Estas análises serão realizadas nos seguintes períodos:
 - a. Após a desobturação dos canais radiculares;
 - b. Após o preparo biomecânico utilizando hipoclorito de sódio 1% e extrato glicólico de gengibre 20%;
 - c. Após 14 dias da ação da medicação intracanal com hidróxido de cálcio;
- 2) Avaliar a atividade antimicrobiana e ação sobre endotoxinas das soluções de hipoclorito de sódio 1% e extrato glicólico de gengibre 20%, e do hidróxido de cálcio como medicação intracanal;
- 3) Verificar a correlação entre os microrganismos presentes, bem como a quantidade de endotoxinas com os sinais e sintomas clínicos apresentados pelos pacientes.

4 MATERIAL E MÉTODO

O projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP protocolo nº 010/2011 – PH/CEP **(ANEXO A)**.

4.1 Seleção de pacientes

Para a realização da presente pesquisa foram selecionados pacientes encaminhados para a Clínica de Endodontia do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP com necessidade de retratamento endodôntico. Todos os dentes incluídos no estudo apresentavam canais radiculares com obturação prévia e imagens radiográficas sugestivas de lesões periapicais. O insucesso do tratamento endodôntico foi determinado baseado em exame clínico e radiográfico. Os dentes estudados apresentavam um tempo de tratamento endodôntico igual ou superior a 3 anos, ou a presença de sinais e/ou sintomas clínicos. Para isso, foi realizada anamnese, selecionando pacientes com condições favoráveis de saúde, local e sistêmica. Todos os pacientes foram submetidos a exame clínico e radiográfico para complementação de diagnóstico. Foram excluídos da pesquisa casos em que os pacientes haviam utilizado antibiótico nos últimos três meses. Os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, aceitando fazer parte do estudo e também em cumprir as condições estabelecidas para a pesquisa **(APÊNDICE A)**.

4.2 Seleção dos casos

Foram selecionados para o estudo 10 dentes anteriores ou premolares tratados endodonticamente (n=10) com lesões periapicais persistentes que apresentavam selados com algum material restaurador (Figura 1).

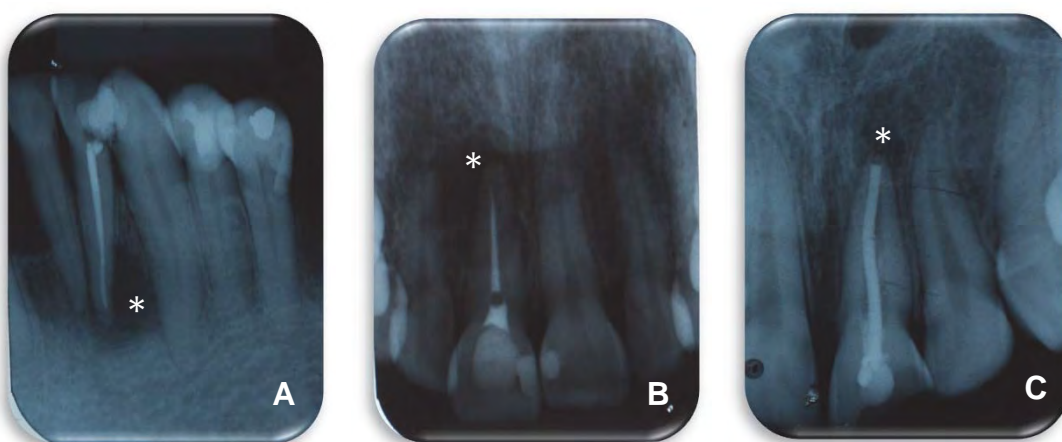


Figura 1 – a) Radiografia periapical de incisivo lateral inferior com presença de lesão periapical persistente; b) Radiografia periapical de incisivo central superior com presença de lesão periapical persistente; c) Radiografia periapical de incisivo central superior com presença de lesão periapical persistente.

Para cada paciente foram anotados dados pessoais, história médica e história dentária (**APÊNDICE B**). No exame subjetivo foram obtidas informações sobre a condição atual do dente a ser retratado e quanto à presença ou ausência de dor. No exame objetivo foram anotados dados tais como a presença de edema, de fístulas, presença ou não de restaurações do dente tratado endodonticamente, cáries e fraturas. Foram realizados testes para verificar dor à percussão, à palpação e mobilidade, além da realização de sondagem periodontal. Os dentes apresentaram ausência de bolsas periodontais com profundidade maior que 4 mm eliminando a possibilidade da lesão ser endo-periodontal e permitindo a realização de um adequado isolamento absoluto.

4.3 Intervenção Odontológica

Inicialmente os pacientes foram submetidos à anestesia na região do elemento dentário e o mesmo foi individualmente isolado da cavidade oral com auxílio de grampos (S.S.White Duflex, Artigos Dentários Ltda, Rio de Janeiro, Brasil) e lençol de borracha (Madeitex, São José dos Campos, SP, Brasil). O dente isolado recebeu profilaxia com pasta profilática (Vigodent S/A Indústria e Comércio, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e escova de Robinson (Microdont – Micro Usinagem de Precisão Ltda, São Paulo, SP, Brasil) acionada em baixa rotação sem refrigeração. Após, os dentes foram lavados com solução salina fisiológica aprotinogênica (Laboratório Sanobiol, Pouso Alegre, MG, Brasil). A seguir, um vedamento da interface coroa/lençol foi feito utilizando cimento de fosfato de zinco (S.S.White Artigos Dentários Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Prosseguiu-se, então, com a primeira desinfecção do campo operatório usando *swabs* (Jiangsu Medical Materials Co. Ltd., Jiangsu, China) estéreis umedecidos, primeiramente, em água oxigenada 30 volumes (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil) seguido de hipoclorito de sódio 5,25% (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil). Para evitar a contaminação química do canal radicular com essa solução e a interferência com a cultura microbiológica, realizou-se a neutralização do hipoclorito com o tiosulfato de sódio a 5% (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil). Após, realizou-se a abertura coronária com auxílio de brocas acionadas em alta rotação, sob refrigeração com solução salina fisiológica aprotinogênica, removendo-se restaurações existentes e/ou cáries. Antes de expor a câmara pulpar, a cavidade foi novamente desinfetada com as mesmas substâncias anteriormente citadas. Terminada a abertura coronária, o canal foi desobturado com auxílio de brocas Gates-Glidden (Dentsply/Maillefer Instruments SA, Ballaigues, Switzerland) acionadas em baixa rotação e limas

endodônticas (Dentsply/Maillefer Instruments SA, Ballaigues, Switzerland), sem o uso de solventes de guta-percha, até o comprimento pré-odontométrico (CPO - comprimento aparente radiográfico subtraído em 3 mm) (Figura 2). Em seguida, foi realizada uma tomada radiográfica para obtenção do comprimento de trabalho (1 mm do ápice radiográfico) e para verificar a remoção do material obturador. Uma vez comprovada adequada desobturação do canal radicular, o mesmo foi inundado com solução salina fisiológica apirogênica e realizada a 1ª coleta.

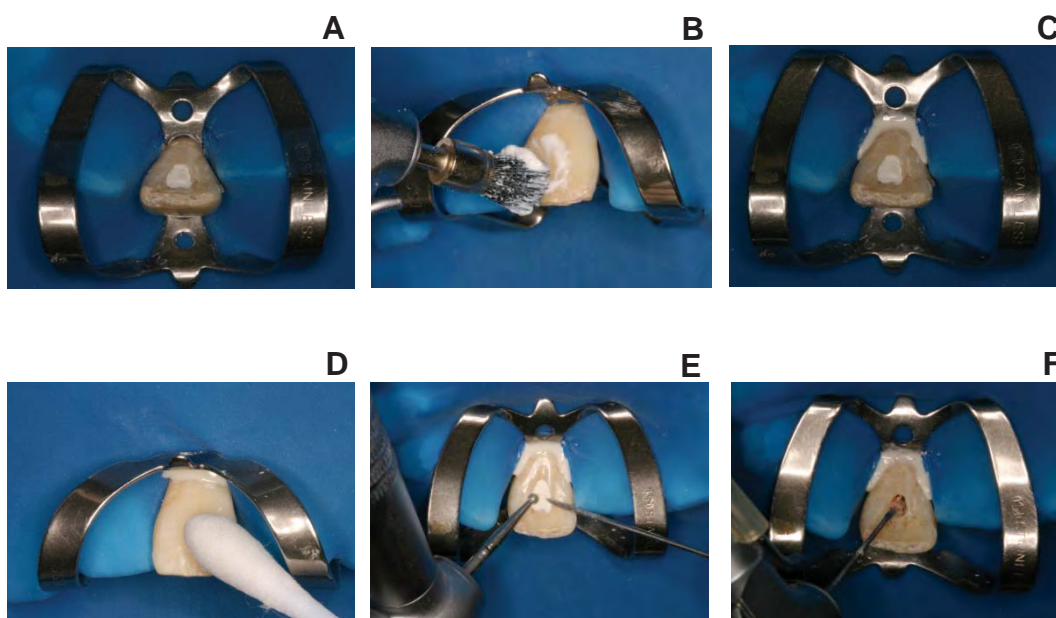


Figura 2 – Sequência da intervenção odontológica: a) isolamento absoluto; b) profilaxia; c) vedamento interface dente/lençol com cimento de fosfato de zinco; d) desinfecção do campo operatório; e) abertura coronária com irrigação com solução salina fisiológica estéril e apirogênica; f) desobturação do canal com broca Gates-Glidden.

4.4 Primeira coleta

Para a coleta de amostras, os canais radiculares foram inundados com solução salina fisiológica e, em seguida, 4 cones de papel absorventes (Dentsply Maillefer Ind. E Com. Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil) apirogênicos foram introduzidos um de cada vez no interior do canal radicular respeitando-se o comprimento de trabalho pré-estabelecido permanecendo nesta posição por 60 segundos. O primeiro cone de papel introduzido no canal radicular foi armazenado em tubo tipo eppendorf (1,5 mL) (Axygen INC, Union City, CA, USA) estéril e apirogênico contendo 1 mL de água apirogênica (EquiPLEX Indústria Farmacêutica, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil) para posterior análise de endotoxinas. Os próximos 3 cones de papel foram armazenados em tubo tipo eppendorf (1,5 mL) esterilizado contendo 1 mL de meio de transporte pré-reduzido VMGA III - Viability Medium Goteberg Agar (Möller et al., 1981; Dahlén et al., 1993) para posterior análise microbiológica (Figura 3).

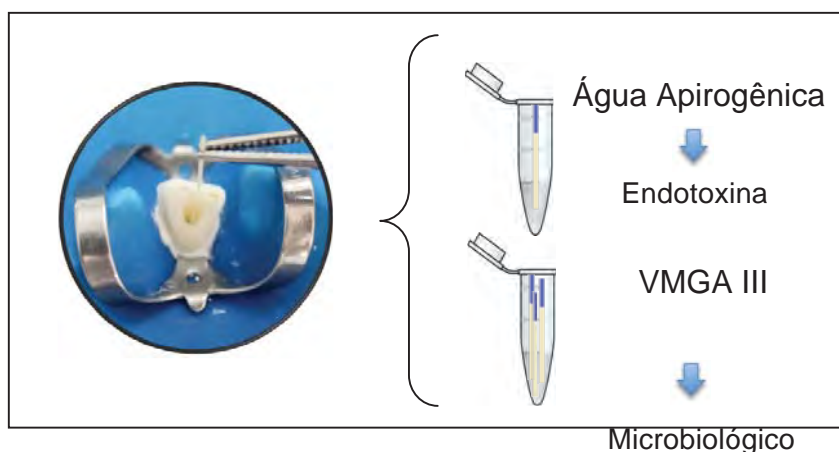


Figura 3 – Coleta do conteúdo do canal radicular: 1º cone de papel armazenado em 1 mL de água apirogênica e os 3 últimos cones de papel armazenados em 1 mL de VMGA III.

4.5 Preparo biomecânico

4.5.1 Divisão dos grupos experimentais

Os dentes foram divididos em 2 grupos experimentais (n=5) de acordo com a substância química auxiliar ao preparo biomecânico a ser utilizada:

- NaOCl - Irrigação com solução de hipoclorito de sódio 1% (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil);
- GENG - Extrato glicólico de gengibre 20% (Apis Flora®, Ribeirão Preto, SP, Brasil), intercalado com solução salina fisiológica.

Uma vez realizada a primeira coleta, foi feita nova tomada radiográfica do elemento para obtenção do comprimento real de trabalho (CRT= 0,5 a 1 mm aquém do ápice radiográfico). Após a obtenção do CRT, foi complementada a neutralização do conteúdo séptico do canal radicular e posterior preparo biomecânico com as soluções irrigadoras:

- NaOCl: Irrigação com 5 mL de solução de hipoclorito de sódio 1% a cada troca de lima;
- GENG: Preenchimento do canal com extrato glicólico de gengibre 20% durante a instrumentação e irrigação com 5 mL de solução salina fisiológica a cada troca de lima.

O preparo do terço cervical foi realizado com brocas Gates-Glidden #4, #3 e #2 em direção coroa-ápice. O preparo apical foi realizado com instrumentação de 4 limas manuais tipo Kerr (Dentsply/Maillefer Instruments SA, Ballaigues, Switzerland) de diâmetros crescentes do instrumento apical inicial, 1 mm aquém do forame apical. Em seguida, o recuo em escalonamento progressivo anatômico foi realizado. A cada troca de instrumento, uma lima Kerr #15 (Dentsply/Maillefer Instruments SA, Ballaigues, Switzerland) foi utilizada como instrumento apical foraminal (Figura 4). As limas e todos os demais instrumentais e materiais utilizados na pesquisa foram submetidos à radiação gama Cobalto (20 Kgy por 6 horas) para esterilização e eliminação de endotoxinas pré-existentes (EMBRARAD - Empresa Brasileira de Radiação, Cotia, SP, Brasil).

Durante todo o preparo, o canal foi irrigado com as soluções irrigadoras descritas e terminado o preparo biomecânico, os canais foram irrigados com 10 mL de solução salina fisiológica aprotogênica para remoção da solução irrigadora e, em seguida, a 2ª coleta foi realizada.

4.6 Segunda coleta

Imediatamente após o preparo biomecânico, nova amostra do canal radicular foi coletada (2ª Coleta) de forma semelhante à coleta anteriormente descrita, tanto para análise em PCR quanto para cultura de microrganismos e quantificação de endotoxinas.

4.7 Medicação intracanal por 14 dias

Após a segunda coleta, os canais foram preenchidos com solução de EDTA 17% (Inodon, Porto Alegre, RS, Brasil) durante 3 minutos e lavados com 10 mL de solução salina fisiológica apirogênica para posterior colocação da medicação intracanal utilizando hidróxido de cálcio P.A (Asfer Indústria Química Ltda, São Caetano do Sul, SP, Brasil) associado ao propilenoglicol (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil) como veículo. A medicação foi introduzida nos canais radiculares com auxílio de limas e lentulo (Dentsply/Maillefer Instruments SA, Ballaigues, Switzerland) até completo preenchimento do canal. Os dentes foram selados com cimento de ionômero de vidro (CIV) restaurador (S.S.White Artigos Dentários Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) por 14 dias (Figura 4).

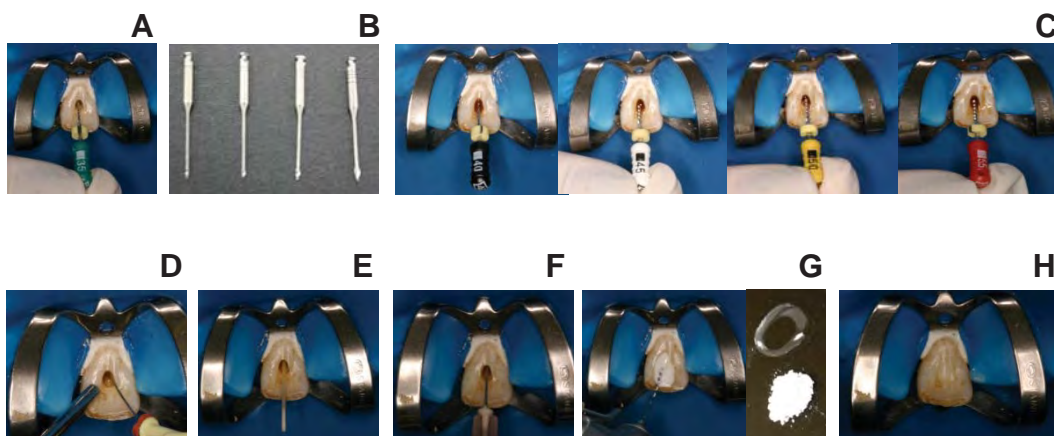


Figura 4 - Preparo biomecânico e colocação da medicação intracanal: a) odontometria (neste caso com lima Kerr #35); b) brocas de Gates-Glidden usadas no preparo cervical; c) confecção do batente apical; d) irrigação com solução salina fisiológica estéril e apirogênica para remoção da substância química auxiliar; e) 2ª coleta; f) preenchimento do canal com EDTA 17%; g) medicação intracanal; h) selamento coronário com CIV.

A Figura 5 ilustra esquema da 1ª sessão do tratamento endodôntico o qual o paciente foi submetido.

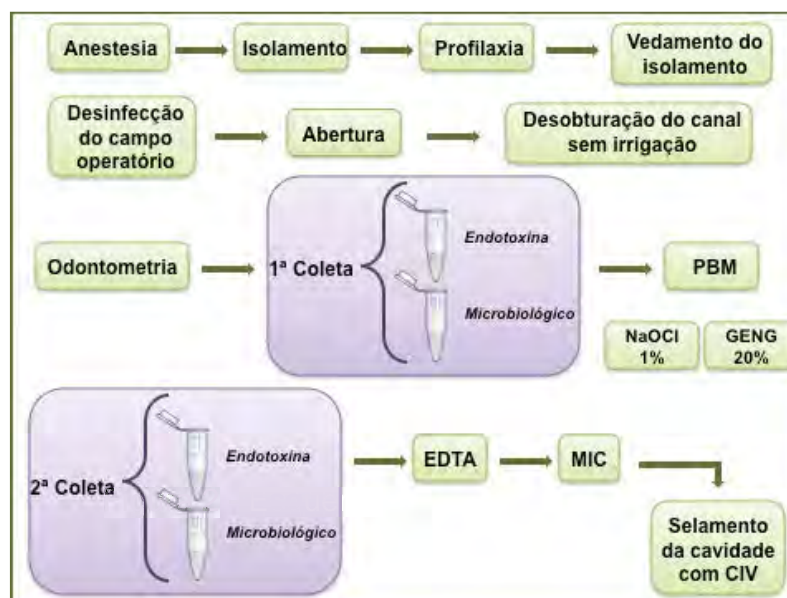


Figura 5 – Esquema da 1ª sessão de atendimento clínico.

4.8 Terceira coleta

Transcorrido o período de 14 dias, os pacientes foram novamente atendidos. As características clínicas foram avaliadas e anotadas na ficha clínica. O paciente foi novamente submetido à anestesia, isolamento e antiseptia do campo operatório (tomando todos os cuidados de forma semelhante a primeira sessão de atendimento), remoção de restauração provisória, remoção da medicação intracanal com lima kerr #30 (Dentsply/Maillefer Instruments SA, Ballaigues, Switzerland) e irrigação com 20 mL de solução salina fisiológica apirogênica. Em seguida, foi realizada a 3ª coleta de forma semelhante às coletas anteriormente descritas, tanto para análise em PCR quanto cultura de microrganismos e quantificação de endotoxinas.

4.9 Obturação dos canais radiculares

Terminada a 3ª coleta, foi verificado se os canais preenchiam os requisitos para serem obturados. Os casos que estavam sem dor, sem odor e secos, foram obturados com cones de gutas-percha (Dentsply Maillefer Ind. Com. Ltda. Petrópolis, RJ, Brasil) e cimento obturador AH Plus (Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz). Os dentes foram radiografados para comprovação de adequado preenchimento em lateralidade da obturação do canal radicular (Figura 6).

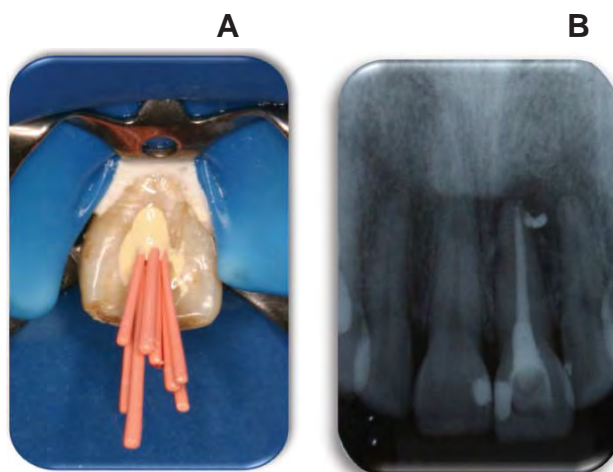


Figura 6 – Obturação do canal radicular: a) obturação com cone de guta percha e cimento AH Plus; b) Radiografia comprovando adequado preenchimento do canal radicular e canal secundário.

A Figura 7 ilustra esquema da 2ª sessão do tratamento endodôntico.

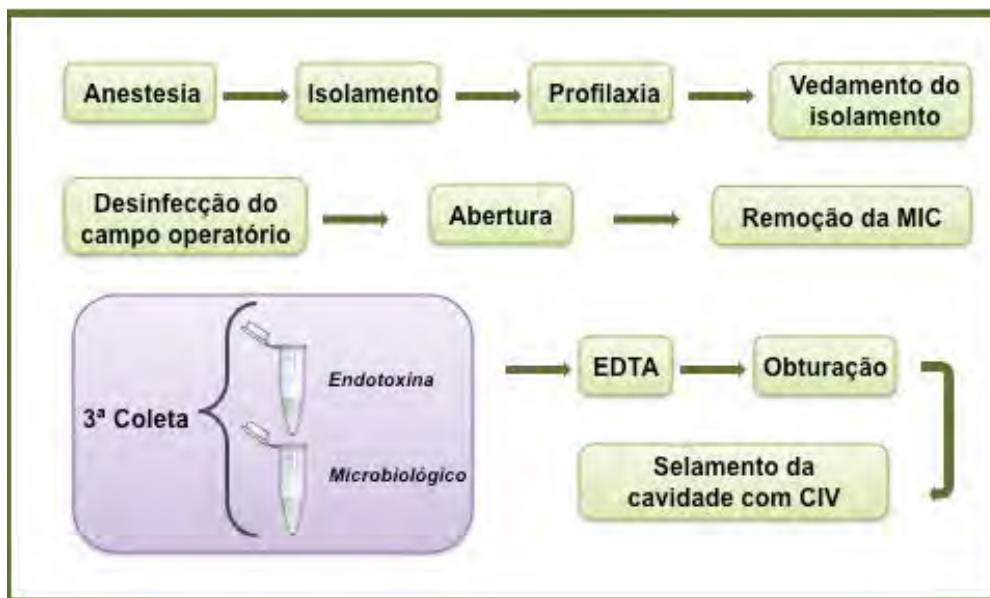


Figura 7– Esquema da 2ª sessão do atendimento clínico.

4.10 Análise microbiológica

4.10.1 Semeadura dos microrganismos

Para todas as coletas, a atividade antimicrobiana foi avaliada pela contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) de microrganismos remanescentes no canal radicular.

O eppendorf contendo os 3 cones de papel (amostra matriz) armazenados em 1 mL de meio de transporte pré-reduzido VMGA III foi agitado até a dessorção do conteúdo para facilitar a dispersão dos microrganismos. Em seguida, foi realizada diluições seriadas até 10000 vezes (Figura 8).

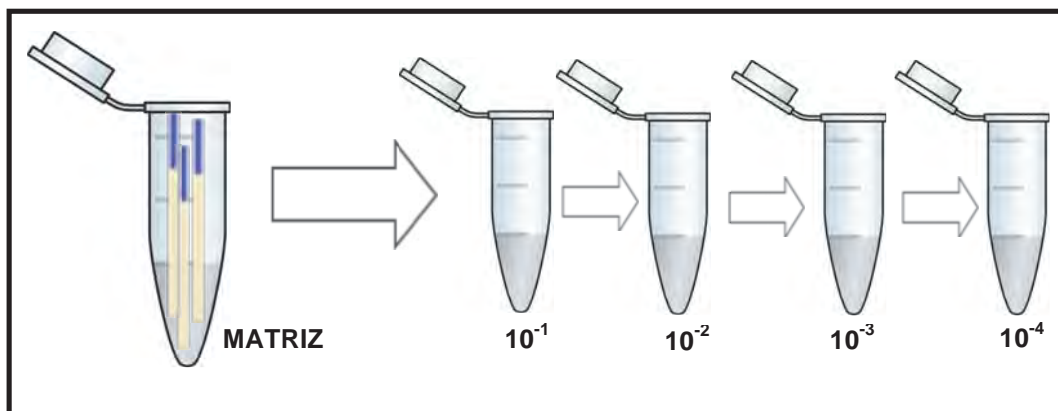


Figura 8 – Diluições seriadas a partir da amostra matriz.

Foram semeados 50 μ L da amostra matriz (sem diluição) e 50 μ L de cada diluição (1/100, 1/10000) em placas de petri contendo:

- *Fastidious Anaerobe Agar* (FAA – Neogen Corporation, Michigan, USA), acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado suplementados por hemina (5 mg/L) e vitamina K1 (1 mg/L). Essas placas foram inoculadas a 37°C em jarras de anaerobiose por 14 dias, para permitir a detecção de microrganismos anaeróbios estritos (Figura 9).
- *Brain Heart Infusion* (BHI – Agar Infuso Cérebro Coração) (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mubai, Índia) acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado incubados a 37°C por 48 horas para permitir o crescimento de microrganismos facultativos (Figura 9).

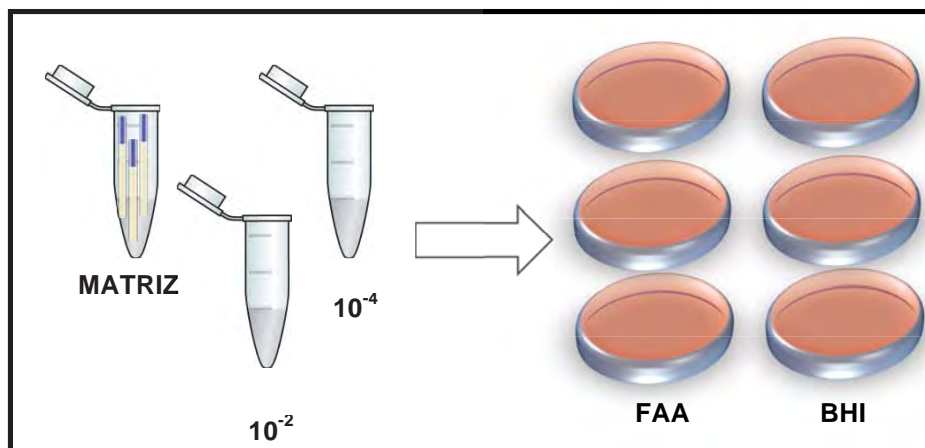


Figura 9 – Semeadura da amostra matriz e diluições no FAA.

Também foram inoculados 50 μ L da amostra matriz (sem diluição) em duplicata em outras placas de petri contendo meios seletivos:

- *Ágar Dextrose Sabouraud* (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mubai, Índia) acrescido de 0,1% de cloranfenicol - para permitir o crescimento de fungos e leveduras;
- *Ágar Enterococcosel* (Becton Dickinson and Company, Sparks, USA) - seletivo para detecção de espécies de *Enterococcus ssp.*;
- *Ágar Mitis Salivarius* (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mubai, Índia) - como meio seletivo de *Streptococcus*;
- *Ágar Mac Conkey* (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mubai, Índia) - seletivo para detecção de espécies de Enterobactérias (Figura 10).

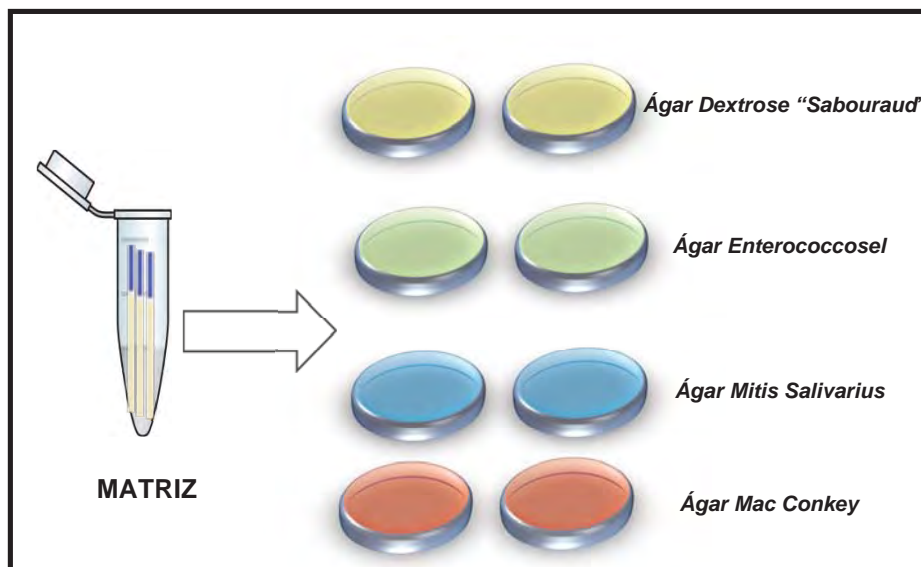


Figura 10 – Inoculação da amostra matriz nos meios seletivos.

As placas foram mantidas em estufa a 37°C por 48 horas, para determinação de UFC/mL.

4.10.2 Análise por PCR

Após a semeadura dos microrganismos, os tubos tipo eppendorfs contendo os 3 cones de papel (amostras matrizes) armazenados em 1 mL de meio de transporte pré-reduzido VMGA III - Viability Medium Goteberg Agar (Dahlen et al., 1993) foram congelados a -70°C, mantidos e transportados em gelo seco até sua utilização.

A técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi utilizada para detecção de *Enterococcus faecalis*, *Filifactor alocis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* nas amostras

previamente coletadas. Foram empregados *primers* espécie-específicos, direcionados à região do gene 16S rRNA no DNA bacteriano. As seqüências dos oligonucleotídeos foram obtidas a partir de referências na literatura.

4.10.2.1 Extração do DNA bacteriano

Para detecção das espécies alvos pelo método PCR, DNA foi primeiramente extraído e amplificado com *primers* de ribossomo procarionte 16S (785). Foi realizada a amplificação do 16S rDNA e da seqüência entre eles.

A extração de DNA foi realizada com o QIamp DNA Kit (Qiagen, Chatsworth, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante (**APÊNDICE C**) (Figura 20).



Figura 20 – Kit de extração de DNA “QIamp DNA Kit” (Qiagen, Chatsworth, CA, USA).

4.10.2.2 Reação de PCR

A reação de PCR foi processada na quantidade de 25 μ L de uma mistura de reagentes (Master mix) contendo as quantidades especificadas para 1,5 μ L do DNA da amostra (**APÊNDICE D**) (Figura 23).

A Taq DNA Polimerase utilizada foi a Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) que não se degrada com o aumento gradativo da temperatura, podendo ser acrescentada diretamente na mistura (Mix) da reação evitando a necessidade de pré-aquecimento.

A determinação da temperatura de anelamento ideal foi feita através de reações de PCR contendo *primers* espécie específicos (Quadro 2) realizadas em um aparelho termociclador convencional e submetidas a vários gradientes de temperatura (Gene Pro - Thermal Cycler, BIOER Technology Hangzhou, China) utilizando amostras ATCCs correspondentes e baseadas na literatura de suporte (Figura 23).

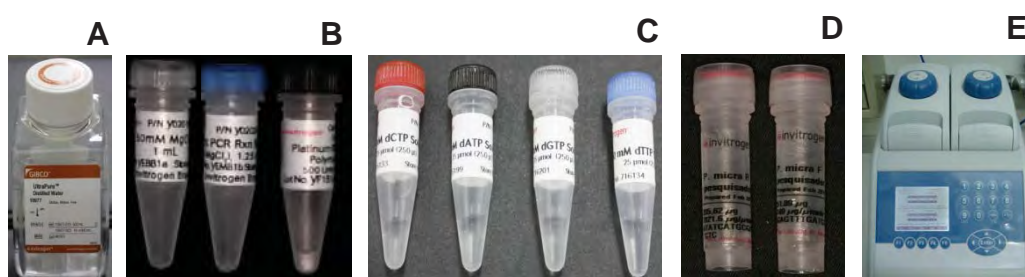


Figura 23 – Reagentes e equipamento necessários para reação de PCR: a) água destilada extra pura; b) conjunto *Taq Platinum* formado por solução tampão (*Buffer*), cloreto de magnésio ($MgCl_2$) e *Taq DNA Polimerase*; c) dNTPs; d) *primers*; e) termocicladora.

Quadro 2 - Espécies microbianas, *primers* com suas sequências, ciclos de temperatura e comprimento do fragmento amplificado para os nucleotídeos utilizados nas reações de PCR.

ESPÉCIE/REFERÊNCIA	SEQUÊNCIA	CICLOS	FRAGMENTO
<i>Universal</i> Vianna et al., 2006	F: TCC TAC GGG AGG CAG CAG T R: GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	Desnaturação inicial: 95°C por 10 min, 40 ciclos de: 95°C por 10s, 60°C por 10s, 72°C por 25s	466 bp
<i>P. endodontalis</i> Siqueira et al., 2001	F: GCT GCA GCT CAA CTG TAG TC R: CCG CTT CAT GTC ACC ATG TC	Desnaturação inicial: 95°C por 2 min, 36 ciclos de: 94°C por 30s, 58°C por 1min, 72°C por 2min, 72°C por 10min	672 bp
<i>P. gingivalis</i> Siqueira et al., 2001	F: AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG R: ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT	Desnaturação inicial: 95°C por 2 min, 36 ciclos de: 94°C por 30s, 60°C por 1min, 72°C por 2min, 72°C por 2min	404 bp
<i>P. intermedia</i> Siqueira et al., 2001	F: TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG R: TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T	Desnaturação inicial: 95°C por 2 min, 36 ciclos de: 94°C por 30s, 58°C por 1min, 72°C por 2min, 72°C por 10min	575 bp
<i>P. nigrescens</i> Siqueira et al., 2001	F: ATG AAA CAA AGG TTT TCC GGT AAG R: CCC ACG TCT CTG TGG GCT GCG A	Desnaturação inicial: 95°C por 2 min, 36 ciclos de: 94°C por 30s, 58°C por 1min, 72°C por 2min, 72°C por 10min	804 bp
<i>T. forsythia</i> Slots et al., 1995	F: GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA R: TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T	Desnaturação inicial: 95°C por 1min, 36 ciclos de: 95°C por 30s, 60°C por 1min, 72°C por 2min	641 bp
<i>T. denticola</i> Sofis et al., 1995	F: TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T R: TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTA	Desnaturação inicial: 95°C por 2 min, 36 ciclos de: 94°C por 30s, 60°C por 1min, 72°C por 2min, 72°C por 10min	316 bp
<i>E. faecalis</i> Sedgley et al., 2005	F: CCG AGT GCT TGC ACT CAA TTG G R: CTC TTA TGC CAT GCG GCA TAA AC	Desnaturação inicial: 95°C por 2 min, 36 ciclos de: 95°C por 1min, 57°C por 1min, 72°C por 1min, 72°C por 7min	138 bp
<i>F. alocis</i> Siqueira e Roças, 2004	F: CAG GTG GTT TAA CAA GTT AGT GG R: CTA AGT TGT CCT TAG CTG TCT CG	Desnaturação inicial: 95°C por 2 min, 26 ciclos de: 95°C por 30s, 58°C por 1min, 72°C por 1min, 72°C por 2min	594 bp
<i>F. nucleatum</i> Avilla-Campos et al., 1999	F: AGT AGC ACA AGG GAG ATG TAT G R: CAA GAA CTA CAA TAG AAC CTG A	Desnaturação inicial: 95°C por 5 min, 30 ciclos de: 94°C por 30s, 40°C por 1min, 72°C por 2min, 72°C por 10min	1000 bp
<i>P. micra</i> Conrads et al., 1997	F: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG R: ATA TCA TGC GAT TCT GTG GTC TC	Desnaturação inicial: 95°C por 2 min, 36 ciclos de: 94°C por 30s, 60°C por 1min, 72°C por 2min, 72°C por 10min	207 bp

Além das amostras, foram utilizados como controles positivos o DNA genômico purificado dos microrganismos investigados (ATCC) e como controle negativo água Milli-Q esterilizada.

4.10.2.3 Eletroforese

As amostras após a reação de PCR (produtos da amplificação) foram conservadas a 4°C ou analisadas imediatamente por eletroforese. Utilizou-se gel de agarose a 1% (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) em tampão de Tris-borato EDTA (pH 8,0) e corado com Brometo de etídio (5 ug/mL – Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil).

Foi incluído em cada gel um padrão de peso molecular de 100bp (DNA ladder, Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) e antes da corrida foi adicionado o tampão de carregamento de *blue juice*. Após o término de cada corrida (60 volts por 40 minutos), as bandas foram observadas com o auxílio de um transiluminador de luz ultravioleta. A documentação fotográfica dos géis foi obtida com o sistema Image Master – VDS (Pharmacia Biotech, Cambriega, England) e a captura das imagens foram realizadas pelo programa LISCAP Image Capture Software (Figura 24) **(APÊNDICE E)**.

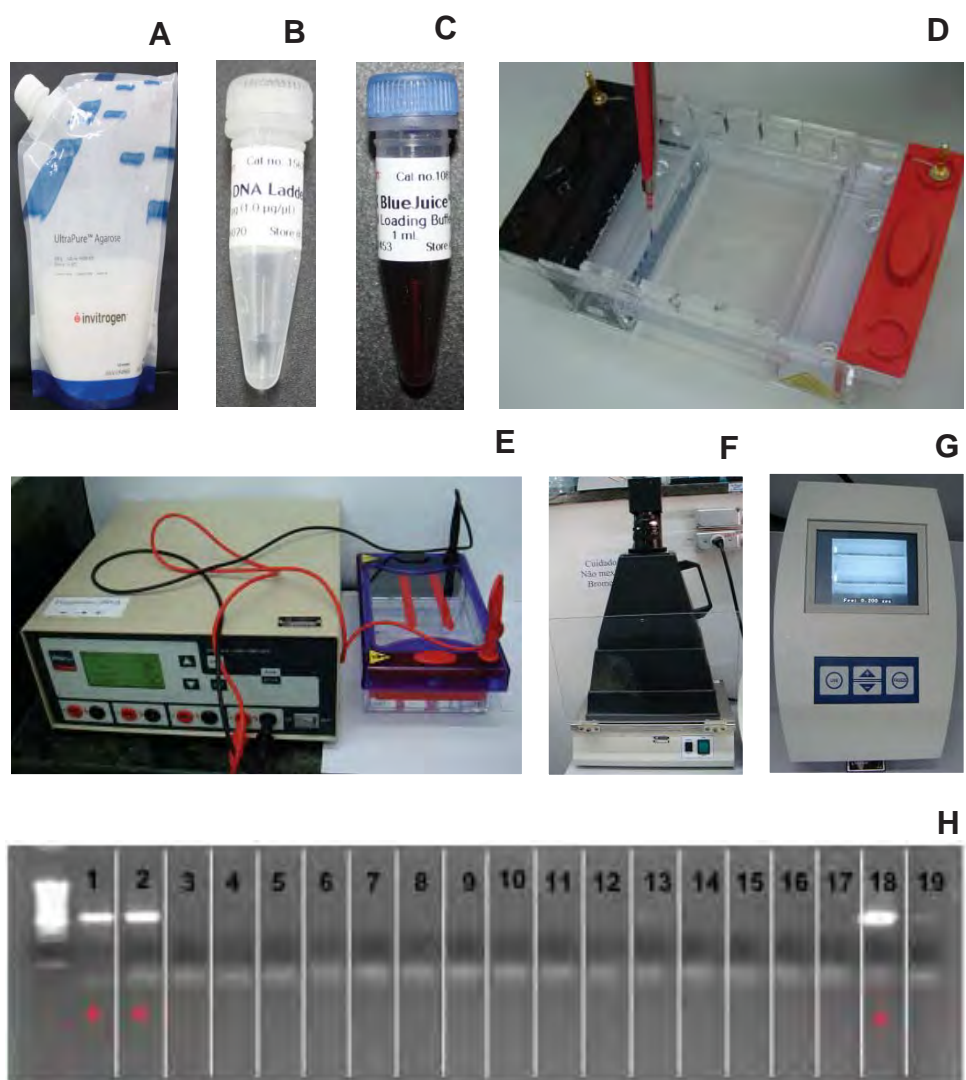


Figura 24 – Materiais e equipamentos necessários para eletroforese em gel de agarose: a) pó do gel de agarose; b) ladder; c) blue juice; d) inoculação das amostras no gel de agarose; e) fonte acoplada a cuba de eletroforese; f) fotodocumentador sobre transiluminador; g) imagem obtida pelo fotodocumentador; h) visualização das bandas em gel de agarose através da eletroforese utilizando *primer* universal.

4.11 Verificação da neutralização de endotoxinas no canal radicular pelo teste cinético cromogênico (QCL) do lisado de amebócitos de *Limulus* (LAL)

Para verificar a neutralização da endotoxina foi utilizado o teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (análise quantitativa) (Lonza, Walkersville, MD, EUA). Este teste foi realizado em quadruplicata para todas as coletas do conteúdo do canal radicular.

Nos dias do teste (imediatamente após desobturação do elemento dentário, imediatamente após instrumentação e imediatamente após a remoção da medicação intracanal), as amostras coletadas do canal radicular foram submetidas à análise quantitativa de LPS pelo método cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (cinético QCL - LAL).

Sempre que um kit do teste cromogênico QCL do LAL é iniciado, é realizada uma curva-padrão. O controle padrão de endotoxina (CPE) de *E. coli* foi reconstituído com um volume especificado, no Certificado de Qualidade, de água apirogênica. Esta suspensão contém 50 EU/mL. Foram realizadas diluições a partir deste padrão de endotoxina em diferentes concentrações (50; 5; 0,5; 0,05; 0,005 EU/ml) **(APÊNDICE F)**. Para cada amostra, foi realizado um controle positivo (amostra do conteúdo do canal radicular adicionada de uma quantidade conhecida de endotoxina).

Em uma placa apirogênica de 96 poços, foram adicionados 100 µl de água apirogênica (branco da reação), os padrões de endotoxina, as amostras coletadas do canal radicular e os controles positivos. A placa foi incubada no leitor cinético QCL a 37±1°C por 10 minutos, o qual estava acoplado a um microcomputador com *software Wink QCL* específico para gerenciamento, execução e emissão de relatórios. Após, foram adicionados em cada poço da placa 100 µl do

reagente cinético cromogênico do LAL, com uma micropipeta multicanal e ponteiros apirogênicos (Figura 36). Após o início do ensaio cinético, o *software* da leitora de microplacas monitorava, de forma contínua durante todo o ensaio, a absorvância a 405 nm em cada poço da microplaca. O leitor determinou o tempo necessário para aumentar a absorvância de cada poço a 0.200 unidades de absorvância, que foi o denominado tempo de reação. O *software WinkQCL* automaticamente calculou uma correlação linear log/log do tempo de reação de cada padrão com a concentração de endotoxina correspondente. Os parâmetros da curva-padrão foram impressos no relatório de impressão (**APÊNDICE G**).

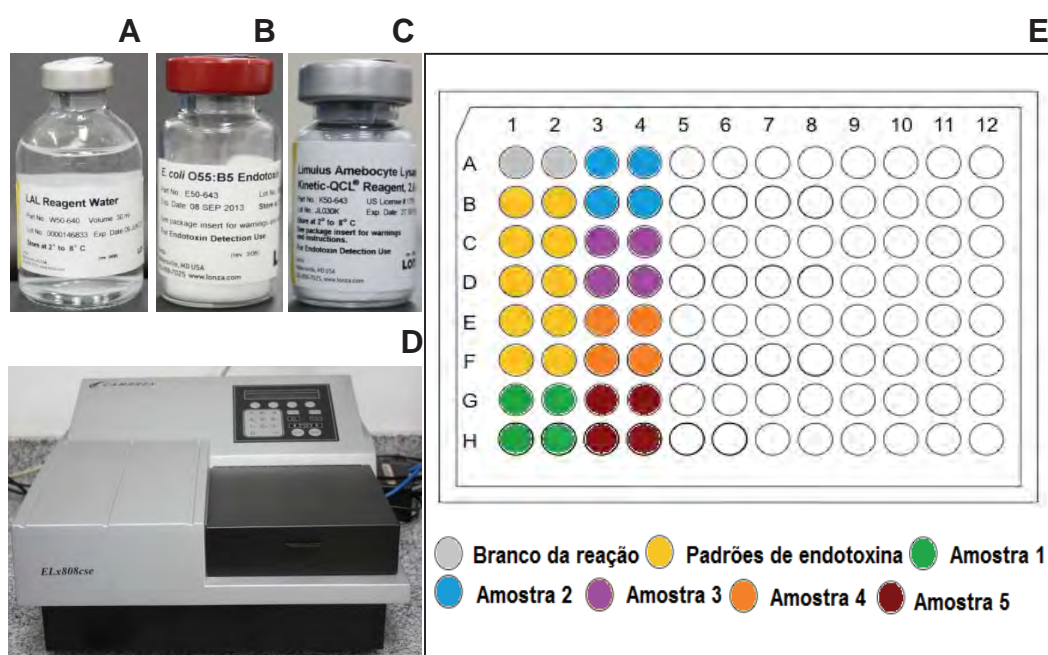


Figura 36 – Quantificação de endotoxinas: a) água apirogênica; b) endotoxina padrão de *E. coli*; c) reagente cinético cromogênico do LAL; d) leitor cinético QCL; e) esquema de montagem da placa de 96 poços.

4.12 Correlação entre a quantidade de endotoxinas e o diâmetro das lesões periapicais

Para correlacionar o tamanho das lesões com a quantidade de endotoxinas, foram realizadas medidas dos diâmetros das lesões das radiografias, estabelecendo padrões de 1-4 mm e de 5-8 mm.

4.13 Análise estatística

Os dados obtidos para as variáveis em estudo foram submetidos à análise estatística descritiva e inferencial ao nível de significância de 5%, com auxílio do programa computacional MINITAB for Windows (2007, version 15.1, State college, Pensilvânia, USA, Minitab Inc) e analisados estatisticamente pelo teste Mann - Whitney.

Os resultados do teste cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (análise quantitativa) foram submetidos à análise estatística do teste de sinais de postos de *Wilcoxon*, com nível de significância de 5%.

Os dois grupos de lesões (1-4 mm e 5-8 mm) foram submetidos ao teste estatístico de correlação de *Pearson* para comparar estes diâmetros com a quantidade de endotoxinas observadas na 1ª coleta para cada canal.

5 RESULTADOS

5.1 Aspectos clínicos e radiográficos

Foram atendidos 10 indivíduos com necessidade de retratamento endodôntico, sendo o mesmo número de pacientes do gênero feminino (5/10) e masculino (5/10). A idade média dos pacientes foi de 38,9 variando entre 16-64 anos. O tempo decorrido do primeiro tratamento endodôntico realizado foi de menos de 10 anos em 8/10 pacientes. As coletas foram realizadas em dentes unirradiculares (80%) e birradiculares (20%), sendo: quatro incisivos centrais superiores (4/10), dois incisivos laterais superiores (2/10), dois primeiros pré-molares superiores (2/10), um incisivo lateral inferior (1/10) e um primeiro pré-molar inferior (1/10).

Durante a anamnese, 1/10 relataram dor em algum momento previamente ao início do retratamento endodôntico. Clinicamente, foi observado que 6/10 pacientes apresentavam dor à percussão vertical, 2/10 pacientes possuíam dor à palpação na região periapical, 2/10 pacientes com presença de fístula na região do elemento dentário e nenhum canal apresentou exsudação. Foi verificada restauração definitiva em 6/10 dentes, sendo que 4/10 apresentavam restauração provisória. Foi observada uma obturação classificada radiograficamente como satisfatória, ou seja, compactada, sem espaços vazios na obturação e adequado limite apical em 5/10 dentes. Em relação ao tamanho da lesão periapical foi observado em 5/10 dentes valores ≤ 4 mm e 5/10 dentes valores ≥ 5 mm. As características clínicas e radiográficas podem ser observadas na tabela 1.

Tabela 1 – Características Clínicas e radiográficas dos 10 dentes submetidos ao retratamento endodôntico.

P	I D A D E	G Ê N E R O	C D E N T E S	Percussão	Dor		Prévia*	Fístula	Exsudato	Qualidade da restauração	Qualidade da Obturação do canal	Tempo tratamento anterior (anos)	Lesão	
					Palpação								≤4	≥5
H1	22	M	21	P	-	-	-	P	-	Ruim	Boa	6	≤4	X
H2	22	M	22	-	-	-	-	-	-	Ruim	Ruim	6	≤4	X
H3	16	M	21	P	P	-	-	-	-	Ruim	Ruim	4	≤4	X
H4	39	M	21	P	-	-	-	-	-	Ruim	Boa	3	≥5	X
H5	49	F	14	-	-	-	-	-	-	Ruim	Boa	10	≤4	X
G1	35	F	21	P	P	P	P	P	-	Boa	Ruim	3	≤4	X
G2	55	F	32	P	-	-	-	-	-	Ruim	Ruim	5	≤4	X
G3	64	F	24	P	-	-	-	-	-	Ruim	Ruim	15	≤4	X
G4	39	M	22	-	-	-	-	-	-	Ruim	Boa	3	≤4	X
G5	48	F	44	-	-	-	-	-	-	Ruim	Boa	5	≤4	X

* dor relatada previamente (3 meses antes) ao início do retratamento endodôntico.

P – Paciente;

H – pacientes do grupo hipoclorito de sódio 1%

G – pacientes do grupo extrato glicólico de gengibre 20%

5.2 Análise microbiológica

5.2.1 Método de cultura microbiológica

O crescimento de microrganismos em meios seletivos foi verificado em 100% das amostras iniciais coletadas (Figura 44); Na tabela 2 pode-se verificar a prevalência destes microrganismos na coleta inicial, mostrando redução nas etapas subsequentes. Microrganismos anaeróbios e anaeróbios facultativos foram os mais encontrados nesta primeira etapa. No entanto, também pôde-se observar leveduras, microrganismos sugestivos de *Streptococos*, *Enterococos* e *Enterobactérias*.

Após o preparo biomecânico (2ª coleta), observou-se ausência de crescimento microbiano em cinco casos (50%), sendo encontrado 4 casos de anaeróbios e 1 de aeróbios e/ou anaeróbios facultativos.

Na segunda sessão, 14 dias após a colocação da medicação intracanal de hidróxido de cálcio, houve um crescimento microbiano em 4/10 dentes (40%). A quantidade de microrganismos em UFC/mL obtidos nas 1ª, 2ª e 3ª coletas estão expressos na tabela 2.

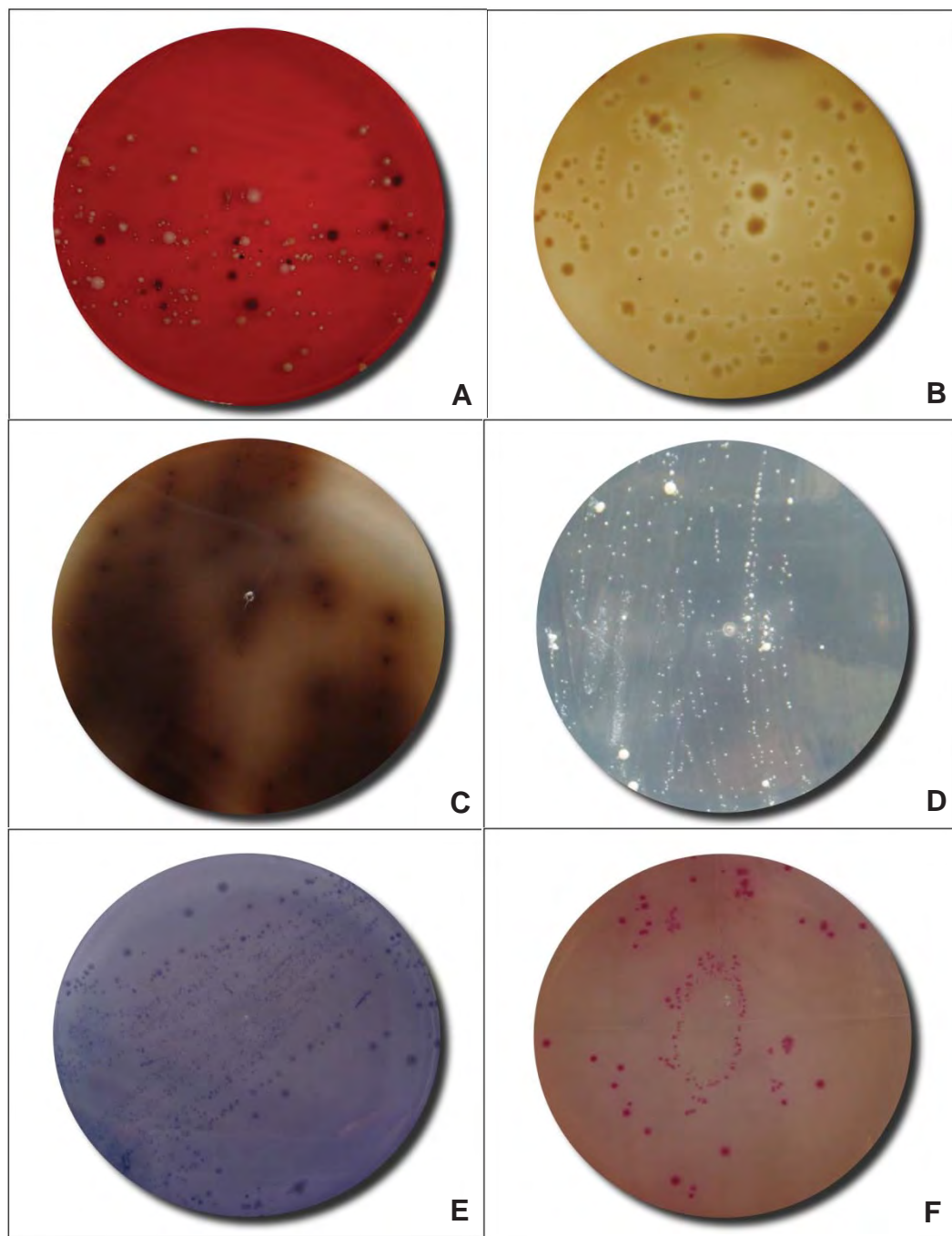


Figura 44 - Crescimento bacteriano pelo método de Cultura Microbiológica: a) FAA enriquecido de sangue de carneiro sugestivo de anaeróbios estritos; b) BHI enriquecido com sangue de carneiro sugestivo de anaeróbios facultativos; c) Ágar *Enterococcosel* sugestivo de Enterococos; d) Ágar *dextrose Sabouraud* sugestivo de leveduras; e) Ágar Mitis Salivarius sugestivo de Estreptococos; f) Ágar Mac Conkey sugestivo de Enterobactérias.

Tabela 2 – Resultados obtidos: quantidade de microrganismos em UFC/mL obtidos nas 1ª, 2ª e 3ª coletas nos diferentes grupos experimentais.

Grupos Pacientes	Microrganismos																	
	Anaeróbios			Aeróbios e/ou facultativos			Streptococos*			Leveduras			Enterococos**			Enterobactérias***		
	1ªC	2ªC	3ªC	1ªC	2ªC	3ªC	1ªC	2ªC	3ªC	1ªC	2ªC	3ªC	1ªC	2ªC	3ªC	1ªC	2ªC	3ªC
H1	1700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H2	780	560	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H3	7840	0	100	6500	0	0	1700	0	0	1000	0	0	4200	0	0	1960	0	0
H4	0	0	0	240	0	60	0	0	120	0	0	40	200	0	400	0	0	0
H5	100	20	60	100	0	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G1	40	0	0	40	0	0	60	0	0	40	0	0	0	0	0	0	0	0
G2	180	0	0	3000	140	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G3	80	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G4	0	60	20	2140	40	160	320	0	40	420	0	0	160	0	0	180	0	40
G5	0	0	0	2600	0	0	100	0	0	120	0	40	40	0	0	20	0	0

* Sugestivo de Streptococos ** Sugestivo de Enterococos; *** Sugestivo de Enterobactérias

Analisando a tabela 3 percebe-se a redução de microrganismos após o uso das soluções irrigadoras quando comparado com o número inicial obtido a partir da 1ª coleta. A medicação intracanal no período de 14 dias não foi capaz de eliminar os microrganismos.

Tabela 3 – Redução em porcentagem (média, desvio-padrão e mediana) de microrganismos da 2ª e 3ª coletas em relação à coleta inicial.

Coletas	Hipoclorito de Sódio 1%				Extrato Glicólico de Gengibre 20%			
	N	Média	DP*	Mediana	N	Média	DP*	Mediana
1ª x 2ª	12	92,35	21,00	100,00	17	98,14	6,08	100,00
1ª x 3ª	12	71,1	58,6	100,00	17	95,56	9,62	100,00

* Desvio-padrão

Baseado na tabela 4 verifica-se que após o PBM com hipoclorito de sódio 1% houve completa eliminação de microrganismos sugestivos de anaeróbios facultativos, estreptococos, leveduras, enterococos e enterobactérias, havendo redução de anaeróbios. Após o uso da MIC, os canais foram recolonizados por anaeróbios facultativos.

Tabela 4 – Redução em porcentagem (média, desvio-padrão e mediana) de microrganismos da 2ª e 3ª coletas em relação à coleta inicial no grupo hipoclorito de sódio 1%.

Microrganismos	1ª x 2ª				1ª x 3ª			
	N	Média	DP*	Mediana	N	Média	DP*	Mediana
Anaeróbios	4	77,1	33,9	90,0	4	84,7	29,8	99,4
Aeróbios e/ou facultativos	3	100,00	0,00	100,00	3	71,7	30,1	75,0
Estreptococos***	1	100,00	NC**	100,00	1	100,00	NC**	100,00
Leveduras	1	100,00	NC**	100,00	1	100,00	NC**	100,00
Enterococos****	2	100,00	0,00	100,00	2	0	141	0
Enterobactérias*****	1	100,00	NC**	100,00	1	100,00	NC**	100,00

* Desvio-padrão; ** Não calculável; *** Sugestivo de Estreptococos; **** Sugestivo de Enterococos; ***** Sugestivo de Enterobactérias.

Conferindo a tabela 5, observou-se que após o PBM com extrato glicólico de gengibre 20% houve eliminação de microrganismos sugestivos de estreptococos, leveduras, enterococos e enterobactérias, apresentando significativa redução de anaeróbios e anaeróbios facultativos. Após 14 dias de MIC (3ª coleta), comparando com a coleta inicial (1ª coleta) pode-se observar eliminação de anaeróbios.

Tabela 5 – Redução em porcentagem (média, desvio-padrão e mediana) de microrganismos da 2ª e 3ª coletas em relação à coleta inicial no grupo extrato glicólico de gengibre 20%.

Microrganismos	1ª x 2ª				1ª x 3ª			
	N	Média	DP*	Mediana	N	Média	DP*	Mediana
Anaeróbios	3	91,67	14,43	100	3	100,00	0,00	100,00
Aeróbios e/ou facultativos	4	98,37	2,21	99,07	4	98,13	3,74	100,00
Estreptococos**	3	100,00	0,00	100,00	3	95,83	7,22	100,00
Leveduras	3	100,00	0,00	100,00	3	88,9	19,2	100,00
Enterococos***	2	100,00	0,00	100,00	2	100,00	0,00	100,00
Enterobactérias****	2	100,00	0,00	100,00	2	88,9	15,7	88,9

* Desvio-padrão; ** Sugestivo de Estreptococos; *** Sugestivo de Enterococos; **** Sugestivo de Enterobactérias.

Pode-se observar por meio das figuras 45 e 46 a porcentagem de redução média após o preparo biomecânico (2ª coleta) e após o uso da medicação intracanal (3ª coleta) comparando-as à coleta inicial (1ª coleta) nos diferentes grupos experimentais.

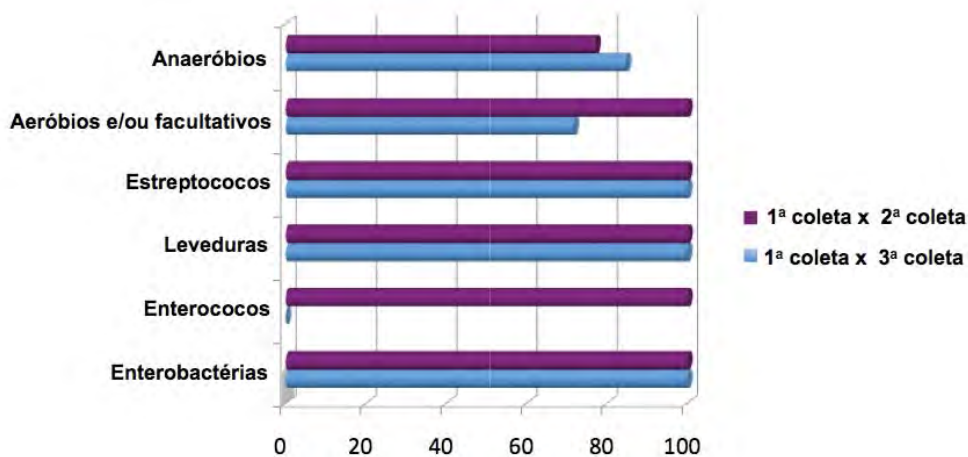


Figura 45 – Porcentagem de redução média da 2ª e 3ª Coletas em relação a coleta inicial (1ª Coleta) no grupo hipoclorito de sódio 1%.

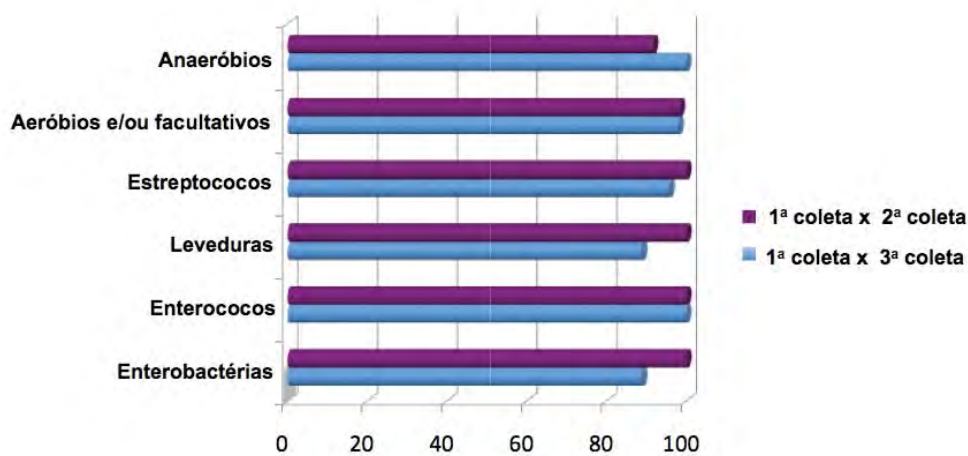


Figura 46 – Porcentagem de redução média da 2ª e 3ª Coletas em relação a coleta inicial (1ª Coleta) no grupo extrato glicólico de gengibre 20%.

As figuras 47 e 48 mostram em porcentagem a redução mediana após o preparo biomecânico (2ª coleta) e após o uso da medicação intracanal (3ª coleta) comparando-as à coleta inicial (1ª coleta) nos diferentes grupos experimentais.

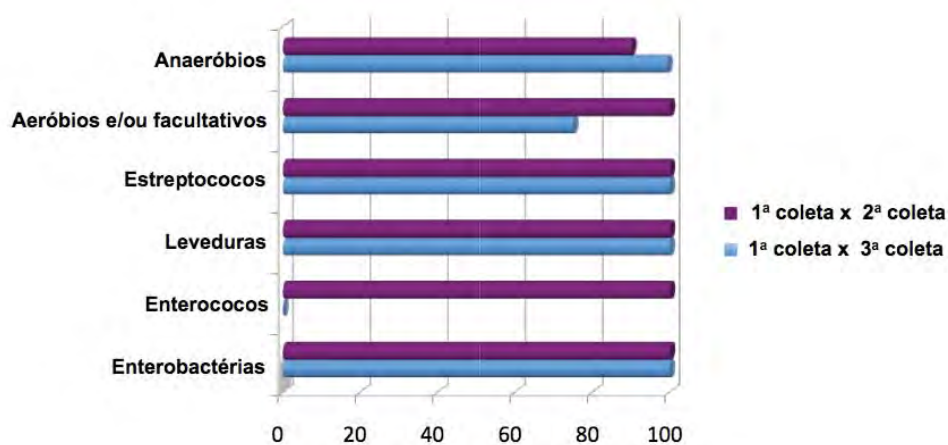


Figura 47 – Porcentagem de redução mediana da 2ª e 3ª Coletas em relação a coleta inicial (1ª Coleta) no grupo hipoclorito de sódio 1%.

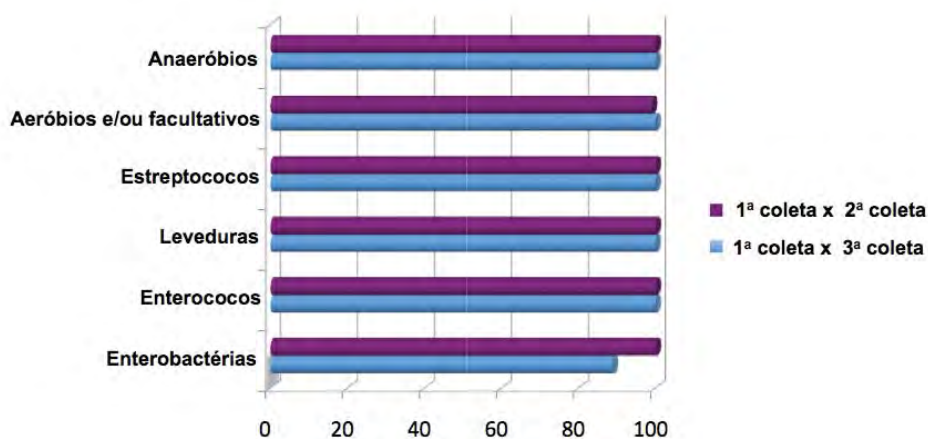


Figura 48 – Porcentagem de redução mediana da 1ª Coleta x 2ª Coleta e 1ª Coleta x 3ª Coleta no grupo extrato glicólico de gengibre 20%.

Pode-se observar por meio da tabela 6 os resultados obtidos após o uso da medicação intracanal de hidróxido de cálcio comparado com a 2ª coleta (logo após o PBM). Verifica-se um aumento de microrganismos após a remoção da MIC.

Tabela 6 - Média, desvio-padrão e mediana comparando a presença de microrganismos da 2ª e 3ª coletas.

Coletas	Hipoclorito de Sódio 1%				Extrato Glicólico de Gengibre 20%			
	N	Média	DP*	Mediana	N	Média	DP*	Mediana
C2-C3	30	-8,7	132,1	0,00	30	-1,33	37,48	0,00

5.2.2 Método molecular PCR

Todas as amostras (n=30), dos dez canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical apresentaram DNA bacteriano quando foi empregado o *primer universal* direcionado ao gene 16S rRNA. *Fusobacterium nucleatum* e *Filifactor alocis* não foram detectados em nenhum momento das coletas (1^a, 2^a e 3^a coletas). Todos os outros microrganismos investigados pelo método de PCR foram detectados em pelo menos em um momento da coleta do tratamento (Figura 49).

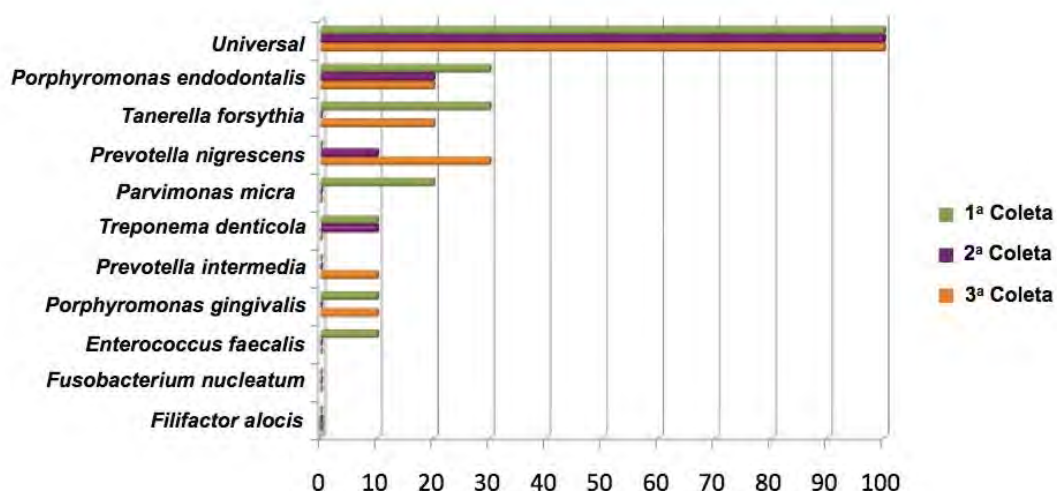


Figura 49 – Porcentagem de microrganismos detectados relacionando cada espécie com o número de canais analisados (n=10) distribuídos na 1^a coleta (realizada após a remoção do material obturador), 2^a coleta (após o PBM) e 3^a coleta (após 14 dias da ação da MIC).

Foram encontrados um total de 24 microrganismos através do método de PCR, nos 10 canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical investigados. Os números de microrganismos encontrados nas coletas foram 11 (1^a coleta), 4 (2^a coleta) e 9 (3^a coleta).

Na coleta inicial foram detectados pelo método molecular de PCR 5 espécies bacterianas, sendo *Porphyromonas endodontalis* (3/10), *Tannerella forsythia* (3/10) e *Parvimonas micra* (2/10) as espécies mais frequentemente encontradas. *Enterococcus faecalis* foi detectado em 1/10 casos.

Independentemente do tipo de solução irrigadora utilizada, após o PBM foram encontradas 3 espécies: *Porphyromonas endodontalis* (2/10), *Prevotella nigrescens* (1/10) e *Treponema denticola* (1/10).

Após a remoção da medicação intracanal de hidróxido de cálcio (3ª coleta), foram detectadas 9 espécies bacterianas, predominando *Prevotella nigrescens* (3/10), *Porphyromonas endodontalis* (2/10) e *Tannerella forsythia* (2/10). Os microrganismos detectados pelo PCR estão expressos na tabela 7.

Tabela 7 – Microrganismos detectados através do método molecular de PCR nas diferentes coletas realizadas de 10 canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e presença de lesão periapical.

Microrganismos	1ª Coleta	2ª Coleta	3ª Coleta	Total
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	3	2	2	7
<i>Tannerella forsythia</i>	3	0	2	5
<i>Prevotella nigrescens</i>	0	1	3	4
<i>Parvimonas micra</i>	2	0	0	2
<i>Treponema denticola</i>	1	1	0	2
<i>Prevotella intermedia</i>	0	0	1	1
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	1	0	1	2
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	0	0	1
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	0	0	0	0
<i>Filifactor alocis</i>	0	0	0	0
TOTAL	11	4	9	24

A tabela 8 apresenta a distribuição das espécies bacterianas investigadas e detectadas pelo método de PCR, nos dez canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical.

Prevotella intermedia e *Prevotella nigrescens* não foram encontrados na coleta inicial (1ª coleta), mas foram detectados em coletas posteriores. *Fusobacterium nucleatum* e *Filifactor alocis* não foram detectados em nenhum momento nas três coletas.

Porphyromonas endodontalis foi a espécie bacteriana mais detectada, sendo encontrada nas três coletas.

Após o PBM (2ª coleta) com as soluções irrigadoras, foram observadas três espécies bacterianas em amostras do grupo hipoclorito de sódio 1% e somente *P. endodontalis* foi detectado nas amostras do grupo extrato glicólico de gengibre 20%.

Na segunda sessão (3ª coleta), após 14 dias da ação da medicação intracanal de hidróxido de cálcio, foram detectadas quatro espécies bacterianas: *P. endodontalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *T. forsythia*.

Tabela 8 – Distribuição dos microrganismos isolados pelo método de PCR na 1ª coleta (logo após a desobturação do canal radicular), 2ª coleta (após PBM com diferentes soluções irrigadoras) e 3ª coleta (7 dias após o uso da MIC) de 10 canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e presença de lesão periapical.

PACIENTES	COLETAS		
	1ª Coleta	2ª Coleta	3ª Coleta
H1	<i>P. gingivalis</i> <i>T. forsythia</i> <i>T. denticola</i>	<i>T. denticola</i>	Não detectado
H2	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i> <i>T. forsythia</i>	Não detectado	<i>P. endodontalis</i>
H3	<i>E. faecalis</i> <i>P. endodontalis</i> <i>T. forsythia</i>	<i>P. nigrescens</i>	Não detectado
H4	Não detectado	<i>P. endodontalis</i>	<i>P. intermedia</i>
H5	Não detectado	Não detectado	Não detectado
G1	<i>P. endodontalis</i>	Não detectado	<i>P. nigrescens</i>
G2	Não detectado	Não detectado	<i>P. endodontalis</i>
G3	<i>P. micra</i>	<i>P. endodontalis</i>	Não detectado
G4	Não detectado	Não detectado	<i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i>
G5	Não detectado	Não detectado	<i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i> <i>P. gingivalis</i>

5.3 Quantificação de endotoxinas

Os valores médios de endotoxinas (EU/mL) obtidos em cada amostra dos grupos experimentais estão evidenciados na tabela 9.

Analisando os resultados, pode-se observar que em ambos os grupos houve diminuição da endotoxina na 2ª coleta quando comparado a coleta inicial (1ª coleta). Seguidamente à remoção da MIC, pode-se verificar aumento de endotoxinas quando comparado a 2ª coleta no grupo hipoclorito de sódio 1%, e redução no grupo extrato glicólico de gengibre 20%.

Tabela 9 – Médias de EU/mL nos diferentes grupos experimentais.

GRUPOS	N	PACIENTE	COLETAS		
			1ª coleta	2ª coleta	3ª Coleta
Hipoclorito de sódio 1%	5	H1	9,49	10,3	4,31
		H2	31,3	1,2	15,5
		H3	37,4	7,48	1,38
		H4	3,91	6,23	19,7
		H5	2,61	2,15	6,7
		MÉDIA	16,94	5,47	9,5
Extrato glicólico de gengibre 20%	5	G1	9,76	10,1	2,16
		G2	10,3	1,81	1,4
		G3	2,26	3,47	6,78
		G4	6,93	5,47	2,47
		G5	11,1	4,02	1,41
		MÉDIA	8,07	4,97	2,84

A tabela 10 mostra os percentuais de redução de endotoxinas da 2ª e 3ª coletas comparando-as à coleta inicial (1ª coleta) e comparando-as entre si (2ª coleta x 3ª coleta) de 10 canais radiculares com insucesso do tratamento endodôntico.

Tabela 10 – Percentuais de redução (média, desvio-padrão e mediana) referente à diminuição da quantidade de endotoxina (EU/mL) de 10 canais radiculares com insucesso do tratamento endodôntico (n=10).

COLETAS	Média	Desvio-padrão	Mediana
1ª coleta x 2ª coleta	23,6	55,9	19,3
1ª coleta x 3ª coleta	-24,3	170,6	59,5
2ª coleta x 3ª coleta	-135	389	39

A tabela 11 mostra os percentuais de redução de endotoxinas da 2ª e 3ª coletas comparando-as à coleta inicial (1ª coleta) e comparando-as entre si (2ª coleta x 3ª coleta) nos diferentes grupos experimentais.

Tabela 11 - Percentuais de redução (média, desvio-padrão e mediana) referente à diminuição da quantidade de endotoxina (EU/mL) nos diferentes grupos experimentais (n=5).

COLETAS	Hipoclorito de Sódio 1%			Extrato Glicólico de Gengibre 20%		
	Média	DP	Mediana	Média	DP	Mediana
1ª x 2ª	25,2	64,0	17,6	22,1	54,2	21,1
1ª x 3ª	-71,8	210,1	50,5	23,2	125,1	77,9
2ª x 3ª	-296	520	-212	25,1	70,5	54,8

O teste sinais de postos de Wilcoxon mostrou um valor de p igual a 1 indicando que não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

Ainda foi avaliado neste estudo a correlação entre a quantidade de endotoxinas com o diâmetro das lesões periapicais associadas a dentes com necessidade de retratamento endodôntico. Verificou-se que os diâmetros das lesões variavam entre 1 e 8 mm e a quantidade de endotoxinas entre 2,26 e 37,4 EU/mL. Ao dividir as medidas das lesões em 2 classes pode-se observar, com a realização do teste de correlação linear de *Pearson*, estatisticamente significativa entre as classes e presença de uma correlação positiva porém moderada entre o tamanho da lesão e a quantidade de endotoxinas presentes. (Tabela 12).

Tabela 12 – Média, desvio-padrão e mediana referente a correlação entre a quantidade de endotoxinas com o diâmetro das lesões periapicais de 10 canais radiculares com insucesso do tratamento endodôntico (n=10).

Diâmetro das lesões (mm)	Média	Desvio-padrão	Mediana
1-4 mm	5,20	3,39	3,91
5-8 mm	19,81	13,46	11,10

A figura 50 ilustra a média e desvio-padrão entre a quantidade de endotoxinas (EU/mL) e o tamanho da lesão periapical.

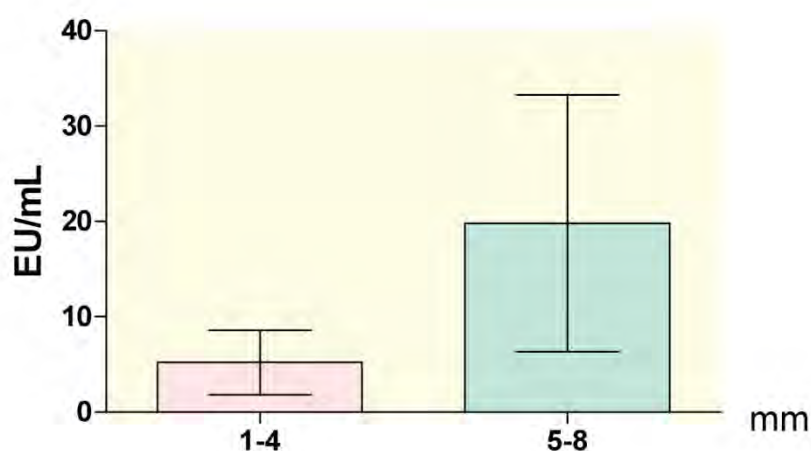


Figura 50 – Relação entre níveis de endotoxinas e tamanho da lesão periapical em 10 dentes com insucesso endodôntico e presença de lesão periapical.

A figura 51 ilustra casos de dentes com lesões periapicais, antes e após o retratamento endodôntico.

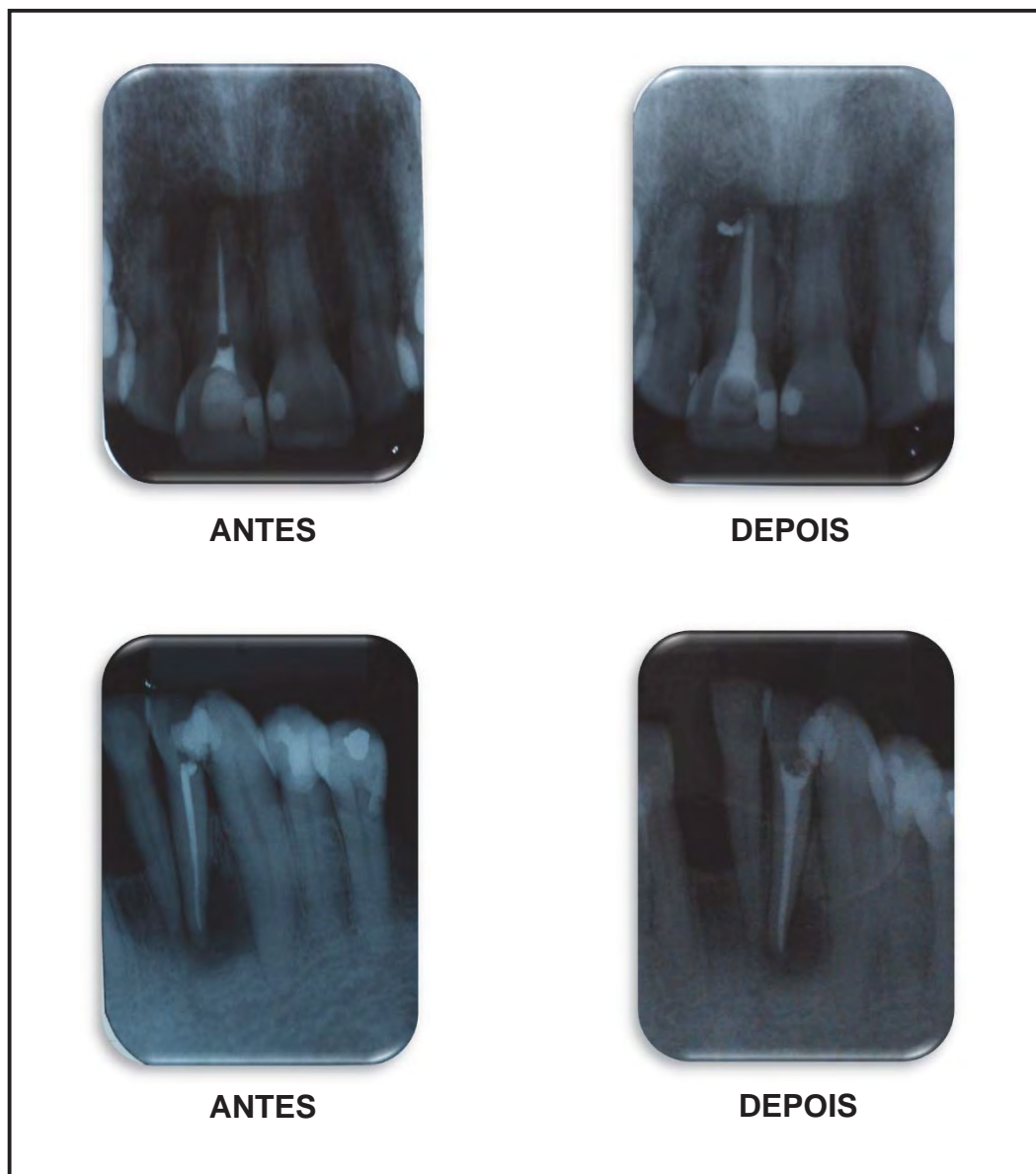


Figura 51 – Dentes com lesões periapicais, antes e após o retratamento endodôntico.

6 DISCUSSÃO

6.1 Dos métodos utilizados

A maior parte dos insucessos endodônticos deve-se ao envolvimento e continuidade da infecção no sistema de canais radiculares (SCR), resultando no aparecimento ou persistência de lesão periapical pós-tratamento (Sundqvist et al., 1998). Este estudo utilizou avançadas técnicas microbiológicas e moleculares para determinar quais os microrganismos associados a falhas da terapia endodôntica.

O método de cultura microbiológica foi utilizado no presente estudo por permitir o crescimento de várias espécies de forma não seletiva (Siqueira, Roças, 2005), e por identificar microrganismos viáveis no interior do canal radicular após preparo biomecânico (PBM), tanto nas infecções endodônticas primárias (Vianna et al., 2006; Siqueira et al., 2007) e secundárias (Sundqvist et al., 1998; Peciulienė et al., 2001).

No entanto, a cultura microbiológica detecta apenas microrganismos viáveis, assim, o método molecular de reação em cadeia de polimerase (PCR) também foi utilizado, permitindo a detecção de microrganismos. Neste método, ocorre detecção de presença de DNA bacteriano direcionado ao gene 16S rRNA, podendo encontrar um número baixo de células de uma dada espécie microbiana (10^1 - 10^2 células), enquanto que o método de cultura microbiológica necessita de aproximadamente 10^4 a 10^5 células em meios não seletivos e de 10^3 células em meios seletivos (Siqueira, Roças, 2005). Além disto, no transporte dos microrganismos, pode ocorrer morte destes seres, não

sendo possível sua detecção no método de cultura microbiológica; mas sendo identificados no método PCR.

Utilizando método de cultura, estudos mostram que existe predomínio de bactérias Gram-positivas anaeróbias facultativas em canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico (Sundqvist et al., 1998; Pinheiro et al., 2003). Entretanto, trabalhos utilizando método de PCR detectaram uma microbiota mais complexa, encontrando bactérias anaeróbias estritas Gram-negativas (Siqueira, 2001; Foschi et al., 2005; Gomes et al., 2006; Gomes et al., 2007). Assim, optou-se pela investigação de espécies microbianas utilizando *primers* de microrganismos encontrados com frequência nos retratamentos endodônticos, sendo um anaeróbio facultativo Gram-positivo (*E. faecalis*), dois anaeróbios estritos Gram-positivos (*F. alocis* e *P. micra*) e os demais Gram-negativos anaeróbios estritos, pois estes apresentam em sua parede celular endotoxina, que também foi quantificado neste estudo.

Também foram detectados os níveis de endotoxinas, importante marcador para mostrar o envolvimento de bactérias Gram-negativas em infecções endodônticas secundárias de dentes com insucesso endodôntico e presença de lesão periapical. O teste utilizado para esta avaliação foi o teste cromogênico do lisado do amebócito de *Limulus*, que é um método sensível para a detecção de LPS, permitindo quantificar a endotoxina com maior precisão. Neste estudo, o leitor cinético acoplado a um microcomputador com *software* Wink QCL específico (Cambrex Bio Ciência Brasil, Ltda., São Paulo, SP, Brasil) realiza o gerenciamento, execução e emissão de relatórios. Este *software* calcula automaticamente os parâmetros da curva-padrão e os valores da quantidade de endotoxinas das amostras dos canais radiculares. Este teste também foi utilizado por outros autores (Jacinto et al., 2005; Valera et al., 2010).

Durante o PBM dos canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e presença de lesão periapical foi utilizado como

solução irrigadora o hipoclorito de sódio 1% (NaOCl) e o extrato glicólico de gengibre 20% (GENG). O uso do NaOCl foi devido ser o irrigante mais difundido e estudado na Endodontia, tendo excelente atividade antimicrobiana e sendo utilizado na prática clínica diária na Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP. Em contrapartida, o extrato glicólico de gengibre foi escolhido, pois estudos prévios *in vitro* mostraram resultados satisfatórios utilizando este extrato sobre microrganismos em canais radiculares, sendo necessária a continuidade desta linha de pesquisa *in vivo* (Cardoso et al., 2010). Além disso, apresenta comprovada atividade antimicrobiana, antiinflamatória e analgésica (Zhou et al., 2006; Ali et al., 2008).

Em relação a medicação intracanal (MIC), optou-se pela utilização do hidróxido de cálcio [Ca(OH)₂], uma vez que este medicamento é o mais utilizado por diferentes autores (Souza-Filho et al., 2008; Valera et al., 2010; Roças, Siqueira, 2011) e necessita de um período mínimo de 14 dias para difundir-se nos túbulos dentinários e ter ação satisfatória sobre alguns microrganismos. Além disso, esta MIC foi escolhida devida a capacidade de neutralizar endotoxinas presentes em canais radiculares (Oliveira et al., 2005).

6.2 Dos resultados

6.2.1 Cultura Microbiológica e endotoxinas

Segundo Sundqvist et al. (1998), dois fatores são importantes no prognóstico dos tratamentos endodônticos: presença de infecção no momento da obturação e tamanho da lesão periapical. Neste estudo, a análise microbiológica referente a todas as amostras da coleta

inicial (1ª coleta) mostrou crescimento de microrganismos viáveis em 100% dos casos confirmando que nos dentes que necessitavam retratamento havia presença de infecção no SCR. Além de ter sido utilizado BHI (*Brain Heart Infusion*) e FAA (*Fastidious Anaerobe Agar*), as amostras também foram inoculados em meios seletivos de *Ágar Enterococcosel*, *Ágar Mitis Salivarius*, *Ágar Mac Conkey* e *Ágar Dextrose Sabouraud*, favorecendo a detecção de microrganismos em todos os casos investigados.

A ocorrência de 100% de microrganismos encontrados por cultura microbiológica em dentes que apresentam falhas no tratamento endodôntico é similar aos resultados de Gomes et al. (2004) e Schirmeister et al. (2007). Entretanto, Peciulienė et al. (2001) verificaram pelo método de cultura microbiana, que microrganismos estavam presentes em 83% dos dentes que necessitavam de retratamento. A ausência de espécies microbianas em 100% dos casos pode ser devido a exploração inicial realizada que pode arrastar consigo microrganismos da luz do canal antes de realizar a coleta inicial ou ainda por ter sido utilizado apenas o método de cultura microbiológica, sem complementação da análise com métodos moleculares.

Verificou-se na tabela 1 que três casos (H5, G4 e G5) apresentaram obturações radiograficamente aceitáveis e não apresentavam sintomatologia dolorosa, fístula ou exsudato; dois destes dentes apresentavam lesão periapical com menos de 5 mm de diâmetro (H5 e G4) e um, com mais de 5 mm (G5). No entanto, as características radiográficas das lesões não eram compatíveis com processo em reparação e os dentes necessitavam de tratamento protético restaurador. Além da persistência de infecção após tratamento prévio, a microinfiltração coronária pode ter sido uma das principais causas do insucesso destes tratamentos, já que os dentes apresentavam um selamento coronário inadequado, fazendo com que nutrientes originados da cavidade bucal pudessem servir de substratos para manutenção de

microrganismos. Ao observarmos a tabela 2, verifica-se que nestes três dentes os canais apresentavam na coleta inicial, cultura positiva para anaeróbios (H5); aeróbios e/ou anaeróbios facultativos (H5, G4 e G5); estreptococos (G4 e G5); leveduras (G4 e G5), enterococos (G4 e G5) e enterobactérias (G4 e G5). Estes dados confirmam que o retratamento foi bem indicado, devido a presença de infecção persistente no interior do SCR.

Em todos os canais, no início do tratamento (1ª Coleta), observou-se maior número de unidades formadoras de colônias (UFCs) independentemente do meio de cultivo em todos os dentes. Mesmo assim, é provável que muitos microrganismos tenham sido removidos junto com o material obturador (Sundqvist et al., 1998). Para minimizar a perda de microrganismos pela ação dos instrumentos durante a desobturação, todo material coletado do canal, como restos de cone, foi colocado no meio de transporte. Mesmo assim, além dos microrganismos presentes na luz do canal, outros poderiam estar presentes em áreas inacessíveis como em ramificações anatômicas do canal, túbulos dentinários e regiões apicais obliteradas pelo tratamento anterior (Pinheiro et al., 2003), podendo abrigar microrganismos que não foram detectados na coleta inicial.

Verificou-se ainda na tabela 1 que cinco dentes (H1, H2, H3, G1 e G5) apresentavam lesão periapical maior do que 5 mm de diâmetro e que estes dentes também apresentaram grandes quantidades de endotoxinas na coleta inicial (tabela 9). Dwyer e Torabinejad (1981) já relacionavam as endotoxinas com a iniciação e perpetuação de lesões periapicais uma vez que elas induzem uma reação inflamatória aguda e reabsorção óssea pela estimulação de atividade osteoclástica (Pitts et al., 1982).

A análise microbiológica referente a 2ª coleta, realizada imediatamente após o PBM com as soluções irrigadoras testadas, mostrou que ocorreu diminuição dos microrganismos. Esta redução

refere-se a ação mecânica dos instrumentos e as ações física e química das substâncias auxiliares utilizadas. Observa-se na tabela 2 que os microrganismos mais resistentes ao PBM foram os anaeróbios e os aeróbios e/ou anaeróbios facultativos, uma vez que na 2ª coleta a cultura microbiológica mostrou ausência de crescimento dos microrganismos nos meios seletivos para estreptococos, leveduras, enterococos e enterobactérias (tabelas 2, 4 e 5), mostrando que o hipoclorito de sódio 1% (NaOCl) e o extrato glicólico de gengibre 20% (GENG) são efetivos.

No grupo onde foi utilizado NaOCl 1% como solução irrigadora foi observado redução microbiana imediata de 92,35%, verificando somente o crescimento de anaeróbios com redução de 77,1%. Bystrom e Sundqvist (1981) demonstraram que a instrumentação mecânica por si só reduz o número de bactérias presentes em canais radiculares em 50% necessitando estar associada com o uso de soluções irrigadoras. Kuruvilla e Kamath (1998) obtiveram valores de redução de 59,4% utilizando hipoclorito de sódio 2,5% em infecções primárias e presença de lesão periapical. Schirrmeister et al. (2007) não detectaram microrganismos e nem DNA bacteriano após preparo do canal com hipoclorito de sódio 2,5% em 20 casos clínicos de retratamento endodôntico. De acordo com Estrela et al. (2002), o hipoclorito de sódio promove alterações celulares biossintéticas, destruindo fosfolipídios pela formação de cloraminas que interfere no metabolismo celular pela ação oxidante, com inibições enzimáticas irreversíveis das sulfidrilas de enzimas essenciais das bactérias. Assim, sua atividade antimicrobiana promove inativação irreversível de sítios enzimáticos essenciais, devido a presença dos íons hidroxila e ação de cloraminação. Ainda, deve-se considerar que no presente estudo utilizou-se o NaOCl 1%, que possui ação mais lenta e conseqüentemente menor devido ao curto período de sua utilização no canal radicular. A escolha por esta concentração foi devido a utilização química desta solução. Enquanto muitas pesquisas utilizam NaOCl em altas concentrações (acima de 2,5%), na clínica esta

não é a realidade. O NaOCl é utilizado na concentração de 1% devido a segurança e facilidade de aquisição do mesmo.

Quando utilizamos o GENG como substância química auxiliar observou-se uma redução de 98,14% dos microrganismos, superior ao observado nos dentes irrigados com NaOCl. Cardoso et al. (2010) utilizaram *in vitro* o extrato glicólico de gengibre 20% e verificaram sua efetividade sobre *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e *Escherichia coli*. Maekawa (2010) e Chung et al. (2010) verificaram que este extrato foi eficaz como medicação intracanal. Park et al. (2008) verificaram que os rizomas extraídos do gengibre, principalmente [10]-gingerol e [12]-gingerol, apresentam atividade antimicrobiana sobre *P. endodontalis*, *P. gingivalis* e *P. intermedia*. Constituintes do óleo essencial de rizomas de *Zingiber officinale* diminuem a taxa de crescimento de uma grande variedade de bactérias e fungos, incluindo *Staphylococcus* e *Candida* (Martins et al., 2001). Foi demonstrado que extratos etanólicos de *Z. Officinale* foram capazes de inibir o crescimento de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Mascolo et al., 1989), embora tenha efeito mais pronunciado sobre bactérias Gram-positivas (Alzorekya, Nakahara, 2003). Além disso, Habsah et al. (2000) observaram alta atividade deste rizoma sobre *Pseudomonas aeruginosas*, bactéria Gram-negativa altamente resistente. Quanto a ação antifúngica, parece estar relacionada ao constituinte de hidrogengirone (Agarwal et al., 2001). Estes trabalhos associados aos resultados do presente estudo mostram ser este rizoma uma alternativa clínica bastante satisfatória.

No entanto, a 2ª coleta indica redução de microrganismos da luz do canal, podendo ocorrer persistência no interior dos túbulos dentinários e nas ramificações do SCR após o PBM. Isto fica comprovado com os resultados da 3ª coleta, onde, mesmo após ação da MIC houve crescimento de microrganismos. Estes resultados mostram que ainda não existe um medicamento considerado ideal no combate da infecção do interior do SCR.

Após o uso da MIC de hidróxido de cálcio [Ca(OH)₂], observou-se uma redução de 71,1% dos microrganismos no grupo hipoclorito de sódio 1% quando comparado a coleta inicial, e de 95,56% no grupo extrato glicólico de gengibre 20%. Ao observarmos as figuras 45 e 46 verifica-se que após o uso da MIC, o grupo preparado com GENG apresentou maior redução de anaeróbios e aeróbios e/ou anaeróbios facultativos do que o grupo NaOCl. Entretanto, estes microrganismos foram mais detectados nos espécimes do grupo NaOCl desde a 1ª coleta (tabela 2). O presente estudo está em concordância com Siqueira et al. (2007) que mostraram que embora o número de culturas negativas tenham aumentado após a utilização do Ca(OH)₂, alguns canais ainda apresentavam bactérias cultiváveis. Apesar desta MIC poder eliminar a maioria dos microrganismos de origem endodôntica, não é igualmente eficaz contra todas as espécies bacterianas. Além disso, o Ca(OH)₂ possui atividade antimicrobiana somente pelo contato direto (Gomes et al., 2002). Dada a baixa solubilidade deste medicamento, a concentração dos íons hidroxila pode não atingir níveis suficientemente altos para eliminar bactérias do biofilme que ficam intocadas nas paredes do canal, túbulos dentinários, irregularidades e outras variações anatômicas (Gomes et al., 2003; Siqueira et al., 2007).

Além disto, o crescimento de microrganismos após a MIC pode ser explicado pela limitada ação do hidróxido de cálcio sobre algumas espécies microbianas, o que justifica sua associação com outras substâncias. Alguns microrganismos, observados após a MIC, não foram encontrados na 1ª coleta, pois provavelmente se localizavam no interior dos túbulos dentinários e ramificações do canal radicular onde, provavelmente, as condições locais são mais favoráveis ao seu desenvolvimento. Espécies como *E. faecalis* resistiram a ação do Ca(OH)₂ devido a uma bomba de prótons em sua parede celular. Esta bomba acidifica o citoplasma fazendo com que o microrganismo sobreviva mesmo em pH alcalino (Evans et al., 2002). No entanto, se o pH alcançar

valores acima de 11,5 esta bomba não é ativada, ocorrendo a morte dos microrganismos (McHugh et al., 2004). Estudos mostram que a baixa solubilidade e difusibilidade do Ca(OH)_2 , bem como sua capacidade tampão na dentina, pode torná-lo difícil de atingir um pH capaz de eliminar bactérias localizadas no interior dos túbulos dentinários ou em variações anatômicas (Gomes et al., 2002; Gomes et al., 2003) e sua associação com outros medicamentos parece ser mais adequada (Souza-Filho et al., 2008; Roças, Siqueira, 2011).

Pode-se pensar que a MIC teria pouco efeito na microbiota do SCR e assim ter limitada interferência no sucesso do tratamento endodôntico. Estudos clínicos mostram sucesso deste tratamento em casos onde não foram utilizadas MIC (Peters, Wesselink, 2002; Xiao, Zhang, 2010). Entretanto, estudos microbiológicos (Sakamoto et al., 2007; Schirmeister et al., 2007; Blome et al., 2008) mostram microrganismos presentes e persistentes nos canais radiculares, e estudos histológicos também apontam para persistência de processos inflamatórios a longo prazo associado a presença de microrganismos, mantendo o insucesso endodôntico (Leonardo et al., 2006). Sendo assim, a utilização da MIC ainda deve ser a opção mais segura para o sucesso do tratamento endodôntico. Resta saber qual é a melhor MIC.

6.2.2 Método molecular PCR

A microbiota de canais radiculares com insucesso do tratamento endodôntico é polimicrobiana, entretanto, tem sido relatado um número limitado de microrganismos em cada canal, havendo predomínio de espécies Gram-positivas anaeróbias facultativas e anaeróbios obrigatórios (Molander et al., 1998; Sundqvist et al., 1998; Pinheiro et al., 2003). Trabalhos utilizando para análise da microbiota o método de PCR

detectam com maior frequência bactérias anaeróbias estritas, especialmente Gram-negativas (Siqueira et al., 2001; Foschi et al., 2005; Gomes et al., 2007). Assim, utilizamos *primers* de espécies Gram-negativas anaeróbias estritas comumente detectadas em infecções endodônticas primárias, pois estes microrganismos apresentam em sua parede celular endotoxina, um importante fator de virulência (Farber, Seltzer, 1988); utilizamos ainda dois anaeróbios Gram-positivos e *E. faecalis* que é um microrganismo Gram-positivo facultativo que é citado como resistente ao tratamento endodôntico (Pinheiro et al., 2003).

Com a introdução dos métodos moleculares, espécies de treponemas como *Treponema denticola* (Siqueira et al., 2001; Gomes et al., 2006), *Tannerella forsythia* (Gomes et al., 2006) espécies de bacilos anaeróbios produtores de pigmento negro como *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas endodontalis*, e *Filifactor alocis* (Siqueira et al., 2001; Gomes et al., 2006; Gomes et al., 2007) passaram a surgir como possíveis patógenos endodônticos.

Em algumas amostras de coletas realizadas após o PBM (2ª coleta) e após uso da MIC (3ª coleta) verificou-se ausência de microrganismos através da cultura microbiana, entretanto no método de PCR foi detectado presença de DNA bacteriano direcionado ao gene 16S rRNA em todas as amostras. Isso se deve a quantidade de células ou a sua viabilidade, mostrando que a PCR apresenta maior sensibilidade. Os métodos moleculares podem detectar células microbianas mortas, uma vez que se baseiam na presença ou ausência do gene 16S rRNA (Siqueira, Roças, 2005).

Das espécies investigadas neste estudo pelo método PCR foram detectadas *Porphyromonas endodontalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella intermedia*, *Parvimonas micra*, *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* e *Enterococcus faecalis*.

Na coleta inicial (1ª coleta), *Porphyromonas endodontalis*

e *Tannerella forsythia* foram as espécies mais prevalentes (30%). Siqueira e Roças (2004) detectaram 23% de *T. forsythia* e somente 5% de *P. endodontalis*. Zhang et al. (2010) detectaram *P. endodontalis* em 45% das amostras. *P. endodontalis* é uma bactéria anaeróbia Gram-negativa produtora de pigmento negro. Sabe-se que este tipo de bactérias é comumente encontrada em infecções endodônticas primárias e sua presença esta geralmente acompanhada de edema e sensibilidade à percussão e palpação (Dougherty et al., 1998; Jacinto et al., 2003). Em dentes que apresentam falha no tratamento endodôntico, bactérias produtoras de pigmento negro são identificadas em dentes sintomáticos e assintomáticos (Gomes et al., 2005). No presente estudo em 5 dos 6 dentes sintomáticos foi detectado *P. endodontalis*; somente um era assintomático e apresentava lesão com mais de 5 mm, 3 eram sensíveis a percussão e/ou palpação e 1 apresentava-se sensível a palpação, percussão, fístula e história de dor.

No entanto, a espécie mais prevalente encontrada por diferentes autores, em canais que apresentam falha no tratamento endodôntico e presença de lesão periapical têm sido *E. faecalis* (Sundqvist et al., 1998; Pinheiro et al., 2003; Siqueira, Roças, 2004). Neste estudo, *E. faecalis* foi detectado por PCR em 10% das amostras (1/10). Entretanto, este microrganismo foi eliminado pelo PBM e uso de MIC, embora nos métodos de cultura microbiológica, espécies sugestivas de Enterococos estavam presentes em dentes após todos os procedimentos. Rolph et al. (2001) detectando espécies bacterianas por cultura e PCR não encontrou *E. faecalis* em nenhum dos 26 casos estudados de infecções secundárias; explicando que se mais amostras fossem analisadas, a frequência de detecção deste microrganismos poderia aumentar. Estas diferenças confirmam a existência de diferenças na composição da microbiota nos casos de infecções persistentes (Rolph et al., 2001).

O número de espécies isoladas no retratamento

endodôntico está provavelmente relacionada a qualidade do tratamento anterior. Dentes que aparentemente estão mal obturados são mais propensos a possuir uma microbiota similar aos dentes não tratados, apresentando uma infecção polimicrobiana. Da mesma forma, dentes aparentemente bem tratados, mas com presença de lesão periapical, geralmente apresenta uma menor quantidade de bactérias, sendo comum monoinfecções (Sundqvist et al., 1998; Rolph et al., 2001; Pinheiro et al., 2003).

Alguns microrganismos que não estavam presentes na coleta inicial foram detectados após PBM. Peters et al. (1995) afirmaram que no interior dos túbulos dentinários, os microrganismos estão protegidos da solução irrigadora, medicação intracanal e dos instrumentos endodônticos, sendo responsáveis pelas infecções persistentes. Mesmo em casos de canais radiculares bem tratados, algumas bactérias podem permanecer vivas, devido às complexidades anatômicas do SCR (Ida, Gutmann, 1995). Bactérias presentes em regiões de istmos, ramificações, reentrâncias, túbulos dentinários, reabsorções radiculares externas, podem não ser afetadas pelas medidas usadas no controle da infecção endodôntica (Nair et al., 1999).

Após o uso da medicação intracanal houve detecção de algumas espécies investigadas (5/10) distribuídos em seis casos. Mesmo utilizando Ca(OH)_2 , uma substância altamente alcalina, não houve eliminação do DNA bacteriano das espécies estudadas. A alcalinização do meio proporcionada pelo Ca(OH)_2 induz a quebra de ligações iônicas que mantêm a estrutura das proteínas. Como consequência as enzimas perdem sua atividade biológica e ocorre a disfunção do metabolismo celular. O efeito letal do Ca(OH)_2 nos microrganismos ocorre quando há contato direto com a substância. Em tal condição, a concentração de íons hidroxila é extremamente alta, incompatível com a sobrevivência bacteriana. Clinicamente, nem sempre isso é possível como também afirmado por Siqueira e Lopes (1999). Se o hidróxido de cálcio precisa

difundir-se pelos tecidos e a concentração de hidroxilas decresce como resultado da ação de sistemas tampões, uma vez que a dentina hidratada libera prótons como bicarbonato e fosfato, ácidos, proteínas e dióxido de carbono, mantendo o pH da dentina inalterado. Assim, sua efetividade antibacteriana pode ser reduzida ou mesmo impedida (Siqueira et al., 1998).

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que:

- Ambas substâncias químicas auxiliares testadas foram capazes de reduzir o número de microrganismos;
- Das espécies investigadas pelo método PCR foram detectadas *Porphyromonas endodontalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella intermedia*, *Parvimonas micra*, *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* e *Enterococcus faecalis* em pelo menos uma das coletas.
- O uso da medicação intracanal de hidróxido de cálcio foi capaz de reduzir os microrganismos, mas não de eliminá-los totalmente;
- Tanto o preparo biomecânico quanto a medicação intracanal foram capazes de reduzir os níveis de endotoxinas, mas não de neutralizá-las completamente;
- Houve correlação positiva entre a quantidade de endotoxinas e o diâmetro das lesões;
- Os dentes sintomáticos apresentaram maior quantidade de endotoxinas.

8 REFERÊNCIAS¹

Adib V, Spratt D, Ng YL, Gulabivala K. Cultivable microbial flora associated with persistent periapical disease and coronal leakage after root canal treatment: a preliminary study. *Int Endod J*. 2004 Aug;37(8):542-51.

Agarwal M, Walia S, Dhingra S, Khambay BP. Insect growth inhibition, antifeedant and antifungal activity of compounds isolated/derived from *Zingiber officinale* Roscoe (ginger) rhizomes. *Pest Manag Sci*. 2001 Mar;57(3):289-300.

Agarwal V, Lal P, Pruthi V. Prevention of *Candida albicans* biofilm by plant oils. *Mycopathologia*. 2008 Jan;165(1):13-9.

Aguiar APS, Maekawa LE, Valera MC, Koga-Ito CY. Avaliação in vitro da ação do extrato glicólico de gengibre sobre *Candida albicans*. *Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo*. 2009;21(2):144-9.

Ali BH, Blunden G, Tanira MO, Nemmar A. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): a review of recent research. *Food Chem Toxicol*. 2008 Feb;46(2):409-20.

Allen RK, Newton CW, Brown CE, Jr. A statistical analysis of surgical and nonsurgical endodontic retreatment cases. *J Endod*. 1989 Jun;15(6):261-6.

Alzorekya N, Nakahara K. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *Int J Food Microbiol*. 2003;80:7.

Assed S, Ito IY, Leonardo MR, Silva LA, Lopatin DE. Anaerobic microorganisms in root canals of human teeth with chronic apical

¹ Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2010 set; citado em 14 set.] Disponível em: http://nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

periodontitis detected by indirect immunofluorescence. *Endod Dent Traumatol.* 1996 Apr;12(2):66-9.

Barthel CR, Levin LG, Reisner HM, Trope M. TNF-alpha release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. *Int Endod J.* 1997 May;30(3):155-9.

Blix IJ, Helgeland K. LPS from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and production of nitric oxide in murine macrophages J774. *Eur J Oral Sci.* 1998 Feb;106(1):576-81.

Blome B, Braun A, Sobarzo V, Jepsen S. Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real-time polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol.* 2008 Oct;23(5):384-90.

Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol.* 1985 Oct;1(5):170-5.

Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1983 Mar;55(3):307-12.

Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res.* 1981 Aug;89(4):321-8.

Cardoso FGR, Maekawa LE, Valera MC, Oliveira LD, Carvalho CAT, Camargo CHR, et al., editors. Avaliação do extrato glicólico de gengibre como solução irrigadora e medicação intracanal sobre microrganismos e endotoxinas [resumo PNC 057]. 27 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica; 2010; Águas de Lindóia - SP - Brasil. *Braz Oral Res;* 2010.

Cheung GS. Endodontic failures--changing the approach. *Int Dent J.* 1996 Jun;46(3):131-8.

Cheung GS, Ho MW. Microbial flora of root canal-treated teeth associated with asymptomatic periapical radiolucent lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 2001 Dec;16(6):332-7.

Chung A, Maekawa LE, Valera MC, Jorge AO, Oliveira LD, Carvalho CAT, editors. Avaliação do hipoclorito de sódio e medicação intracanal do extrato glicólico de gengibre sobre microrganismos e sua endotoxina

[resumo PNB 059). 27 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica 2010; Águas de Lindóia - SP - Brasil. Braz Oral Res; 2010.

Dahlén G, Möler AJR. Microbiology of endodontic infections. In: Slots J, Taubman MA, editors. Contemporary Oral Microbiology and Immunology. Saint Luis, Mo, USA: Mosby Year Book; 1992. p. 444-75.

Dahlen G, Pipattanagovit P, Rosling B, Moller AJ. A comparison of two transport media for saliva and subgingival samples. Oral Microbiol Immunol. 1993 Dec;8(6):375-82.

Day A, HH L, LL B, F A, S A, NP P. Signal transduction during LPS-mediated activation of pulp fibroblasts. J Dent Res. 1998;77:673.
de Oliveira LD, Carvalho CA, Valera MC, Koga-Ito CY, Jorge AO. Diffusion ability of endotoxin through dentinal tubules. Braz Oral Res. 2005 Jan-Mar;19(1):5-10.

de Oliveira LD, Jorge AO, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Valera MC. In vitro effects of endodontic irrigants on endotoxins in root canals. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007 Jul;104(1):135-42.

de Souza-Filho FJ, Soares Ade J, Vianna ME, Zaia AA, Ferraz CC, Gomes BP. Antimicrobial effect and pH of chlorhexidine gel and calcium hydroxide alone and associated with other materials. Braz Dent J. 2008;19(1):28-33.

Dougherty WJ, Bae KS, Watkins BJ, Baumgartner JC. Black-pigmented bacteria in coronal and apical segments of infected root canals. J Endod. 1998 May;24(5):356-8.

Drumond M, Castro R, Almeida R, Pereira M, Padilha W. Comparative study in vitro of the antibacterial activity from phytotherapeutic products against cariogenic bacterias. Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr. 2004;4(1):33-8.

Dwyer TG, Torabinejad M. Radiographic and histologic evaluation of the effect of endotoxin on the periapical tissues of the cat. J Endod. 1981 Jan;7(1):31-5.

Endo M. Identificação de microrganismos e quantificação de endotoxinas em canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical. Piracicaba: Unicamp; 2011.

Engström B. The significance of *enterococci* in root canal treatment. Odontol Revy. 1964;15:87-106.

Ercan E, Ozekinci T, Atakul F, Gul K. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: in vivo study. *J Endod.* 2004 Feb;30(2):84-7.

Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spano JC, Marchesan MA, Pecora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J.* 2002;13(2):113-7.

Estrela C, Silva JA, de Alencar AH, Leles CR, Decurcio DA. Efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis*--a systematic review. *J Appl Oral Sci.* 2008 Nov-Dec;16(6):364-8.

Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J.* 2002 Mar;35(3):221-8.

Farber PA, Seltzer S. Endodontic microbiology. I. Etiology. *J Endod.* 1988 Jul;14(7):363-71.

Ficker C, Smith ML, Akpagana K, Gbeassor M, Zhang J, Durst T, et al. Bioassay-guided isolation and identification of antifungal compounds from ginger. *Phytother Res.* 2003 Sep;17(8):897-902.

Foschi F, Cavrini F, Montebugnoli L, Stashenko P, Sambri V, Prati C. Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. *Oral Microbiol Immunol.* 2005 Oct;20(5):289-95.

Friedman S, Lost C, Zarrabian M, Trope M. Evaluation of success and failure after endodontic therapy using a glass ionomer cement sealer. *J Endod.* 1995 Jul;21(7):384-90.

Fukushima H, Yamamoto K, Hirohata K, Sagawa H, Leung KP, Walker CB. Localization and identification of root canal bacteria in clinically asymptomatic periapical pathosis. *J Endod.* 1990 Nov;16(11):534-8.

Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Rosalen PL, Zaia AA, Teixeira FB, et al. In vitro antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes and their vehicles against selected microorganisms. *Braz Dent J.* 2002;13(3):155-61.

Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, et al. Molecular analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia*, and *treponema denticola* associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. *J Endod.* 2006 Oct;32(10):937-40.

Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, et al. Porphyromonas gingivalis, Porphyromonas endodontalis, Prevotella intermedia and Prevotella nigrescens in endodontic lesions detected by culture and by PCR. Oral Microbiol Immunol. 2005 Aug;20(4):211-5.

Gomes BP, Lilley JD, Drucker DB. Clinical significance of dental root canal microflora. J Dent. 1996 Jan-Mar;24(1-2):47-55.

Gomes BP, Martinho FC, Vianna ME. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. J Endod. 2009 Oct;35(10):1350-3.

Gomes BP, Montagner F, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Polymerase chain reaction of Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia in primary endodontic infections. J Endod. 2007 Sep;33(9):1049-52.

Gomes BP, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. Oral Microbiol Immunol. 2004 Apr;19(2):71-6.

Gomes BP, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. J Endod. 2008 May;34(5):537-40.

Gomes BP, Souza SF, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against Enterococcus faecalis in bovine root dentine in vitro. Int Endod J. 2003 Apr;36(4):267-75.

Grégio AMT, Fortes ESM, Rosa EAR, Simeoni RB, Rosa RT. Ação antimicrobiana do *Zingiber officinale* frente à microbiota bucal. Estud Biol. 2006;28(62):61-6.

Haapasalo M, Endal U, Zandi H, Coil J. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. Endod Top. 2005;10:71-102.

Habsah M, Amran M, Mackeen MM, Lajis NH, Kikuzaki H, Nakatani N, et al. Screening of Zingiberaceae extracts for antimicrobial and antioxidant activities. J Ethnopharmacol. 2000 Oct;72(3):403-10.

Hancock HH, 3rd, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001 May;91(5):579-86.

Hepworth MJ, Friedman S. Treatment outcome of surgical and non-surgical management of endodontic failures. *J Can Dent Assoc.* 1997 May;63(5):364-71.

Hommez G, De Moor R. [Endodontics and apical periodontitis]. *Rev Belge Med Dent.* 2005;60(1):9-30.

Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991 Apr;71(4):492-5.

Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H, et al. Cytotoxicity against various cell lines of lipopolysaccharides purified from *Bacteroides*, *Fusobacterium*, and *Veillonella* isolated from infected root canals. *J Endod.* 1989 Nov;15(11):530-4.

Ida RD, Gutmann JL. Importance of anatomic variables in endodontic treatment outcomes: case report. *Endod Dent Traumatol.* 1995 Aug;11(4):199-203.

Imura N, Pinheiro ET, Gomes BP, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. The outcome of endodontic treatment: a retrospective study of 2000 cases performed by a specialist. *J Endod.* 2007 Nov;33(11):1278-82.

Indu M, Hatha A, Abirosh C, Harsha U, Vivekanandan G. Antimicrobial activity of some of the south-indian spices against serotypes of *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and *Aeromonas hydrophila*. *Braz J Microbiol.* 2006;37(2):153-8.

Ito HO, Shuto T, Takada H, Koga T, Aida Y, Hirata M. Lipopolysaccharides from *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* promote osteoclastic differentiation in vitro. *Arch Oral Biol.* 1996 May;41(5):439-44.

Jacinto RC, Gomes BP, Ferraz CC, Zaia AA, Filho FJ. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. *Oral Microbiol Immunol.* 2003 Oct;18(5):285-92.

Jacinto RC, Gomes BP, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *J Med Microbiol.* 2005 Aug;54(Pt 8):777-83.

Jiang J, Zuo J, Chen SH, Holliday LS. Calcium hydroxide reduces lipopolysaccharide-stimulated osteoclast formation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003 Mar;95(3):348-54.

Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulp in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965 Sep;20:340-9.

Khabbaz MG, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in the vital pulp of human carious teeth: association with pulpal pain. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001 May;91(5):587-93.

Kuruvilla JR, Kamath MP. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. *J Endod.* 1998 Jul;24(7):472-6.

Lantz RC, Chen GJ, Sarihan M, Solyom AM, Jolad SD, Timmermann BN. The effect of extracts from ginger rhizome on inflammatory mediator production. *Phytomedicine.* 2007 Feb;14(2-3):123-8.

Leonardo MR. *Endodontia: Tratamento de canais radiculares: Princípios técnicos e biológicos.* São Paulo: Artes Médicas; 2005.

Leonardo MR, Hernandez ME, Silva LA, Tanomaru-Filho M. Effect of a calcium hydroxide-based root canal dressing on periapical repair in dogs: a histological study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 Nov;102(5):680-5.

Lin LM, Pascon EA, Skribner J, Gangler P, Langeland K. Clinical, radiographic, and histologic study of endodontic treatment failures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991 May;71(5):603-11.

Lin LM, Skribner JE, Gaengler P. Factors associated with endodontic treatment failures. *J Endod.* 1992 Dec;18(12):625-7.

Lopes HP, Siqueira Jr JF, Elias CN. Retratamento Endodôntico. In: Siqueira Jr JF, Lopes HP, editors. *Endodontia Biologia e Técnica.* Rio de Janeiro: Medsi; 1999. p. 497-538.

Lotufo M, Lemos Jr C, Shimizu M, Cabral R, Birman G. Clinical evaluation of the topical use of propolis in recurrent minor aphtous ulceration. *Cienc Odontol Bras.* 2005;8(3):6-9.

Love RM. *Enterococcus faecalis--a mechanism for its role in endodontic failure.* *Int Endod J.* 2001 Jul;34(5):399-405.

Maekawa LE. Avaliação dos Extratos de Própolis e de Gengibre como medicação intracanal sobre microrganismos e endotoxinas em canais radiculares. São José dos Campos: Unesp - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos; 2010.

Maekawa LE, Valera MC, Oliveira LD, Carvalho CAT, Camargo CHR, Koga-Ito CY, et al., editors. Avaliação dos extratos de própolis e de gengibre como medicação intracanal sobre endotoxinas em canais radiculares [resumo PNa 048]. 27 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica 2010; Água de Lindóia - SP - Brasil. Braz Oral Res; 2010.

Martich GD, Boujoukos AJ, Suffredini AF. Response of man to endotoxin. Immunobiology. 1993 Apr;187(3-5):403-16.

Martinho FC, Gomes BP. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. J Endod. 2008 Mar;34(3):268-72.

Martins AP, Salgueiro L, Goncalves MJ, da Cunha AP, Vila R, Caniguel S, et al. Essential oil composition and antimicrobial activity of three Zingiberaceae from S.Tome e Principe. Planta Med. 2001 Aug;67(6):580-4.

Mascolo N, Jain R, Jain SC, Capasso F. Ethnopharmacologic investigation of ginger (*Zingiber officinale*). J Ethnopharmacol. 1989 Nov;27(1-2):129-40.

Matsushita K, Tajima T, Tomita K, Takada H, Nagaoka S, Torii M. Inflammatory cytokine production and specific antibody responses to lipopolysaccharide from endodontopathic black-pigmented bacteria in patients with multilesional periapical periodontitis. J Endod. 1999 Dec;25(12):795-9.

Mattison GD, Haddix JE, Kehoe JC, Progulske-Fox A. The effect of *Eikenella corrodens* endotoxin on periapical bone. J Endod. 1987 Dec;13(12):559-65.

McGurkin-Smith R, Trope M, Caplan D, Sigurdsson A. Reduction of intracanal bacteria using GT rotary instrumentation, 5.25% NaOCl, EDTA, and Ca(OH)₂. J Endod. 2005 May;31(5):359-63.

McHugh CP, Zhang P, Michalek S, Eleazer PD. pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. J Endod. 2004 Apr;30(4):218-9.

Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 1998 Jan;31(1):1-7.

Moller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. *Odontol Tidskr*. 1966 Dec 20;74(5):Suppl:1-380.

Moller AJ, Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res*. 1981 Dec;89(6):475-84.

Munford RS, Hall CL. Detoxification of bacterial lipopolysaccharides (endotoxins) by a human neutrophil enzyme. *Science*. 1986 Oct 10;234(4773):203-5.

Nair PN, Sjogren U, Figdor D, Sundqvist G. Persistent periapical radiolucencies of root-filled human teeth, failed endodontic treatments, and periapical scars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999 May;87(5):617-27.

Park M, Bae J, Lee DS. Antibacterial activity of [10]-gingerol and [12]-gingerol isolated from ginger rhizome against periodontal bacteria. *Phytother Res*. 2008 Nov;22(11):1446-9.

Paulino N, Teixeira C, Martins R, Scremin A, Dirsch VM, Vollmar AM, et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of a Brazilian green propolis. *Planta Med*. 2006 Aug;72(10):899-906.

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 Sep;34(6):429-34.

Peciuliene V, Rimkuvienė J, Maneliene R, Ivanauskaite D. Apical periodontitis in root filled teeth associated with the quality of root fillings. *Stomatologija*. 2006;8(4):122-6.

Pereira A. Efeito do *Zingiber officinale* sobre o processo de reparo de lesões ulceradas na mucosa bucal de ratos - análise clínica e morfológica - Relatório apresentado ao PIBIC. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. 2002.

Pereira A, Grégio A, Barbosa A, Marques F, Lima A, Ribas M, editors. Estudo do efeito do gengibre no processo de cicatrização de úlceras na mucosa bucal de ratos [resumo Ib166]; 2003. *Pesqui Odontol Bras*; 2003.

Pessa M, Bardeli LS, Pinto CP, Brum R, Caldas DBM, Grégio AMT, et al., editors. Efeito do gel de gengibre e do peróxido de carbamida no processo de reparo de lesões ulceradas de mucosa oral de ratos - Análise histopatológica [resumo Ple 192]. *Braz Oral Res*; 2008.

Peters LB, Wesselink PR. Periapical healing of endodontically treated teeth in one and two visits obturated in the presence or absence of detectable microorganisms. *Int Endod J*. 2002 Aug;35(8):660-7.

Peters LB, Wesselink PR, Moorer WR. The fate and the role of bacteria left in root dentinal tubules. *Int Endod J*. 1995 Mar;28(2):95-9.

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 Jan;36(1):1-11.

Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol*. 2003 Apr;18(2):100-3.

Pitts DL, Williams BL, Morton TH, Jr. Investigation of the role of endotoxin in periapical inflammation. *J Endod*. 1982 Jan;8(1):10-8.

Ray HA, Trope M. Periapical status of endodontically treated teeth in relation to the technical quality of the root filling and the coronal restoration. *Int Endod J*. 1995 Jan;28(1):12-8.

Reader CM, Boniface M, Bujanda-Wagner S. Refractory endodontic lesion associated with *Staphylococci aureus*. *J Endod*. 1994 Dec;20(12):607-9.

Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Sci Am*. 1992 Aug;267(2):54-61.

Rocas IN, Jung IY, Lee CY, Siqueira JF, Jr. Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a South Korean population. *J Endod*. 2004 Jul;30(7):504-8.

Rocas IN, Siqueira JF, Jr. In vivo antimicrobial effects of endodontic treatment procedures as assessed by molecular microbiologic techniques. *J Endod*. 2011 Mar;37(3):304-10.

Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, Saunders WP, MacKenzie D, Coldero L, et al. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. *J Clin Microbiol*. 2001 Sep;39(9):3282-9.

Ruff ML, McClanahan SB, Babel BS. In vitro antifungal efficacy of four irrigants as a final rinse. *J Endod.* 2006 Apr;32(4):331-3.

Sakamoto M, Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Benno Y. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral Microbiol Immunol.* 2007 Feb;22(1):19-23.

Salgado RJ, Moura-Netto C, Yamazaki AK, Cardoso LN, de Moura AA, Prokopowitsch I. Comparison of different irrigants on calcium hydroxide medication removal: microscopic cleanliness evaluation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009 Apr;107(4):580-4.

Schirrmeister JF, Liebenow AL, Braun G, Wittmer A, Hellwig E, Al-Ahmad A. Detection and eradication of microorganisms in root-filled teeth associated with periradicular lesions: an in vivo study. *J Endod.* 2007 May;33(5):536-40.

Schirrmeister JF, Liebenow AL, Pelz K, Wittmer A, Serr A, Hellwig E, et al. New bacterial compositions in root-filled teeth with periradicular lesions. *J Endod.* 2009 Feb;35(2):169-74.

Seltzer S, Farber PA. Microbiologic factors in endodontology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994 Nov;78(5):634-45.

Shygei E, Liem E, Maekawa LE, Oliveira LD, Carvalho CAT, Valera MC. Análise da atividade antimicrobiana de substâncias químicas auxiliares e extratos naturais sobre *C. albicans* e *E. faecalis*. *Braz Oral Res.*; 2008 sept; 22 (suppl 1): 62.

Siqueira JF, Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J.* 2001 Jan;34(1):1-10.

Siqueira JF, Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002 Sep;94(3):281-93.

Siqueira JF, Jr., Batista MM, Fraga RC, de Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod.* 1998 Jun;24(6):414-6.

Siqueira JF, Jr., Guimaraes-Pinto T, Rocas IN. Effects of chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite and intracanal medication with calcium hydroxide on cultivable bacteria in infected root canals. *J Endod.* 2007 Jul;33(7):800-5.

Siqueira JF, Jr., Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J.* 1999 Sep;32(5):361-9.

Siqueira JF, Jr., Paiva SS, Rocas IN. Reduction in the cultivable bacterial populations in infected root canals by a chlorhexidine-based antimicrobial protocol. *J Endod.* 2007 May;33(5):541-7.

Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2--Redefining the endodontic microbiota. *J Endod.* 2005 Jul;31(7):488-98.

Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004 Jan;97(1):85-94.

Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Favieri A, Oliveira JC, Santos KR. Polymerase chain reaction detection of *Treponema denticola* in endodontic infections within root canals. *Int Endod J.* 2001 Jun;34(4):280-4.

Siren EK, Haapasalo MP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo EN. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J.* 1997 Mar;30(2):91-5.

Sjogren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1997 Sep;30(5):297-306.

Sjogren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod.* 1990 Oct;16(10):498-504.

Smith CS, Setchell DJ, Harty FJ. Factors influencing the success of conventional root canal therapy--a five-year retrospective study. *Int Endod J.* 1993 Nov;26(6):321-33.

Strindberg LZ. The dependence of the results of pulp therapy on certain factors: an analytical study based on radiographic and clinical follow-up examinations. *Acta Odontol Scand.* 1956;14(21):1-175.

Subramanian K, Mickel AK. Molecular analysis of persistent periradicular lesions and root ends reveals a diverse microbial profile. *J Endod.* 2009 Jul;35(7):950-7.

Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol.* 1992 Oct;7(5):257-62.

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 Jan;85(1):86-93.

Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J.* 1998 Sep;31(5):311-25.

Tani N, Tominaga N, Osada T, Watanabe K, Umemoto T. Immunobiological activities of bacteria isolated from the root canals of postendodontic teeth with persistent periapical lesions. *J Endod.* 1992 Feb;18(2):58-62.

Tanomaru Filho M, Yamashita JC, Leonardo MR, da Silva LA, Tanomaru JM, Ito IY. In vivo microbiological evaluation of the effect of biomechanical preparation of root canals using different irrigating solutions. *J Appl Oral Sci.* 2006 Apr;14(2):105-10.

Torabinejad M, Eby WC, Naidorf IJ. Inflammatory and immunological aspects of the pathogenesis of human periapical lesions. *J Endod.* 1985 Nov;11(11):479-88.

Valera MC, da Rosa JA, Maekawa LE, de Oliveira LD, Carvalho CA, Koga-Ito CY, et al. Action of propolis and medications against *Escherichia coli* and endotoxin in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010 Oct;110(4):e70-4.

Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BP. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbiol Immunol.* 2007 Dec;22(6):411-8.

Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G. In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. *Int Endod J.* 2006 Jun;39(6):484-92.

Weber CD, McClanahan SB, Miller GA, Diener-West M, Johnson JD. The effect of passive ultrasonic activation of 2% chlorhexidine or 5.25% sodium hypochlorite irrigant on residual antimicrobial activity in root canals. *J Endod.* 2003 Sep;29(9):562-4.

Xiao D, Zhang DH. [A clinical study of one-visit endodontic treatment for infected root canals]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2010 Feb;28(1):57-60.

Yamasaki M, Nakane A, Kumazawa M, Hashioka K, Horiba N, Nakamura H. Endotoxin and gram-negative bacteria in the rat periapical lesions. *J Endod.* 1992 Oct;18(10):501-4.

Zhou HL, Deng YM, Xie QM. The modulatory effects of the volatile oil of ginger on the cellular immune response in vitro and in vivo in mice. *J Ethnopharmacol.* 2006 Apr 21;105(1-2):301-5.

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido

Caro(a) Senhor(a)

Eu, Flávia Goulart da Rosa Cardoso, aluna de Mestrado da Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, portadora do CPF 213.054.408-89, estabelecido à Avenida Eng. Francisco José Longo, 777, na cidade de São José dos Campos-SP, telefone para contato (12) 3947 9048, sob a orientação da Professora Adjunto Marcia Carneiro Valera da Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, portadora do CPF 039.137.548-22, estabelecido à Avenida Eng. Francisco José Longo, 777, na cidade de São José dos Campos-SP, telefone para contato (12) 3947 9048, sou responsável pela pesquisa cujo título é **“Identificação *in vivo* de microrganismos e quantificação de endotoxinas em retratamentos endodônticos utilizando extrato glicólico de gengibre como substância química auxiliar”**.

O objetivo deste estudo é avaliar a eficácia de soluções (Hipoclorito de sódio 1% e extrato glicólico de gengibre 20%) e medicamentos (hidróxido de cálcio), que serão utilizados durante o tratamento endodôntico (tratamento de canal) com a finalidade de eliminar microrganismos e produtos destes microrganismos (neutralização de endotoxinas), responsáveis pelas falhas no tratamento endodôntico. Para esta avaliação, será coletado material do interior do canal dos dentes a serem tratados e, em seguida, em laboratório, o material coletado será submetido a análise, avaliando os microrganismos e seus produtos presentes nos canais radiculares; estes serão identificados e quantificados antes do tratamento endodôntico e após o uso dos medicamentos anteriormente citados.

O projeto não acarretará risco algum para o paciente uma vez que será realizado dentro das normas de biossegurança. Além disso, o protocolo de conduta adotado é o mesmo já utilizado na prática clínica odontológica desta faculdade. Serão necessários de 2 a 4 atendimentos (3 horas cada atendimento) até a conclusão do tratamento de canal. O paciente receberá número de telefone para entrar em contato em caso de dor e será atendido imediatamente. Os pacientes serão chamados para acompanhamento radiográfico após 1 ano do tratamento finalizado.

Se houver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética (CEP) da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, situada na Av. Engº Francisco José Longo, 777 – CEP 12245000, em São José dos Campos-SP, fone 012-3947-9076, e-mail janete@fosjc.unesp.br e

comunique-se com a Coordenadora Profa.Dra. JANETE DIAS ALMEIDA. Informo que será garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e assim deixar de participar do estudo. Também não haverá custo nem pagamento pela colaboração.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Acredito ter sido esclarecido(a) a respeito das informações que leram para mim, descrevendo o estudo a ser realizado e concordo em receber atendimento em consultório odontológico. Declaro conhecer os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes, e que minha participação não implicará em nenhuma despesa.

NOME/RESPONSÁVEL _____

RG _____ CPF _____

ENDEREÇO COMPLETO _____

Assinatura Responsável

Assinatura Pesquisador

APÊNDICE B – Ficha Clínica

Nome: _____

Data: ____/____/____ DENTE _____

HISTÓRIA MÉDICA

Estado de saúde geral:				
Medicamento em uso:				
<input type="checkbox"/> Diabete	<input type="checkbox"/> Hepatite	<input type="checkbox"/> Coração	Pressão:	<input type="checkbox"/> Sinusite
<input type="checkbox"/> Rim	<input type="checkbox"/> Alergia	<input type="checkbox"/> Úlceras	<input type="checkbox"/> Alcoolismo	<input type="checkbox"/> Fígado
<input type="checkbox"/> Doença mental	<input type="checkbox"/> Doenças sangue	<input type="checkbox"/> Outras		
Problemas com anestesia:				
Outros:				

HISTÓRIA CLÍNICA

Queixa principal:				
TIPO DE	<input type="checkbox"/> Provocada	<input type="checkbox"/> Espontânea	<input type="checkbox"/> Intermitente	<input type="checkbox"/> Contínua
DOR:	<input type="checkbox"/> Localizada	<input type="checkbox"/> Difusa		
Tomou analgésico ou outro medicamento?				
A dor cessa com analgésico?				
Dói a quanto tempo?				

EXAME CLÍNICO LOCAL

<input type="checkbox"/> Dente cariado	<input type="checkbox"/> Dente restaurado	<input type="checkbox"/> Edema	<input type="checkbox"/> Alteração de cor	<input type="checkbox"/> Mobilidade
<input type="checkbox"/> Fístula	<input type="checkbox"/> Extrusão	<input type="checkbox"/> Oclusão	<input type="checkbox"/> Problema periodontal	

TESTES

<input type="checkbox"/> Frio	<input type="checkbox"/> Calor	<input type="checkbox"/> Choque térmico	<input type="checkbox"/> Percussão
-------------------------------	--------------------------------	---	------------------------------------

EXAME RADIOGRÁFICO

Câmara pulpar:	Canal radicular:
Estruturas adjacentes:	Diagnóstico provável:
Tratamento indicado:	

TRATAMENTO RADICAL

Medida aparente do dente no RX inicial:

Canal	Ponto de Referência	Comprimento real do instrumento ao ser retirado do canal:	Diferença entre ponta do instrumento ao ápice radicular:	Comprimento Real do canal (I.A.F.):	Comprimento de trabalho C.T. (I.A.I.):

Diâmetro do I.A.F. (n° do instrumento):

Diâmetro do I.A.I. (n° do instrumento):

Diâmetro cirúrgico do canal:

Escalonamento até:

Irrigação:

Curativo de demora:

Obturação (técnica e material):

Selamento:

DATA	TRATAMENTO	Visto Professor
OBS. Pós-operatória:		
Terapêutica sistêmica:		

CONTROLES RADIOGRÁFICOS

Data	Observações
1°	
2°	
3°	

APÊNDICE C – Extração do DNA bacteriano

A extração do DNA bacteriano foi realizada utilizando o conjunto QIAamp DNA mini Kit – Cat. 51306 (QIAGEN, Valência, Califórnia, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

1. Identificar eppendorfs de 1,5 mL de acordo com os grupos e coletas (Figura 11).

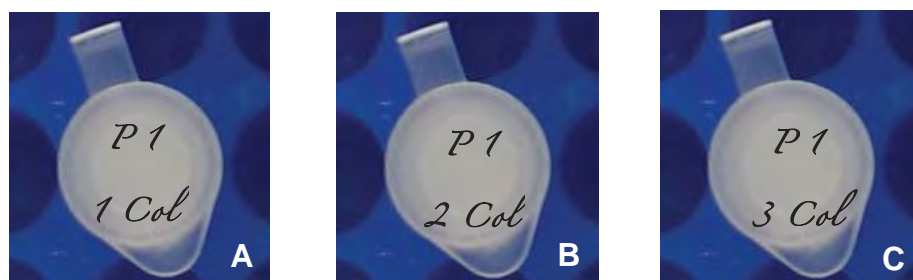


Figura 11 – Identificação dos eppendorfs: a) eppendorf para 1ª coleta; b) eppendorf para 2ª coleta; c) eppendorf para 3ª coleta.

2. Agitar a amostra armazenada em VMGA III e alíquotar 300 µl para o eppendorf previamente identificado.
3. Centrifugar a 8000 rpm por 5 minutos (Figura 12).



Figura 12 – a, b e c) posicionamento dos eppendorfs de 1,5 mL na centrífuga.

4. Remover sobrenadante, com bastante cuidado para não aspirar o *pelet* (Figura 13).

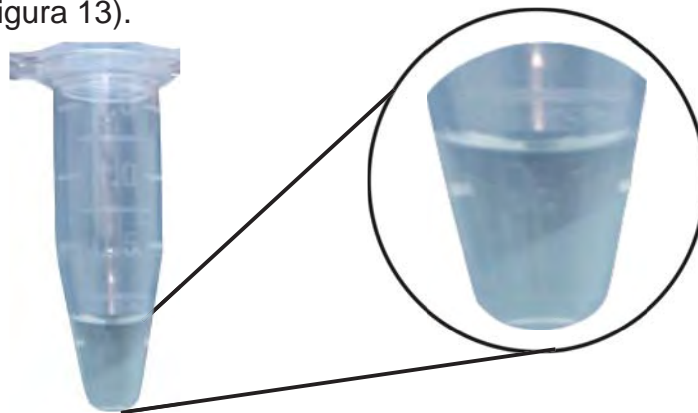


Figura 13 – Formação do *Pelet*.

5. Adicionar 180 μ l de Buffer ATL (1) e 20 μ l de proteinase K (2).
6. Incubar a 56°C por 30 minutos (banho seco) (Figura 14).



Figura 14 – Incubação em banho seco.

7. Adicionar 200 μ l de AL (3) (Agitar levemente antes)
8. Agitar levemente e incubar a 70° por 10 minutos em banho maria (Figura 15).

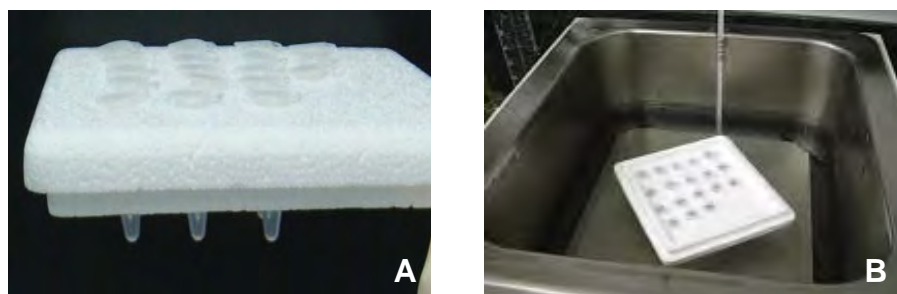


Figura 15 – Incubação dos eppendorfs: a) posicionamento dos eppendorfs em suporte; b) incubação em banho maria.

9. Adicionar 200 μ l de etanol 100%.
10. Agitar e transferir para tubos com filtros/colunas (Kit QIAamp mini Spimcollum - QIAGEN, Valência, Califórnia, EUA) (Figura 16).



Figura 16 – Tubos com filtros/colunas Kit QIAamp mini SpimCollum.

11. Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.
12. Transferir o filtro para outro tubo vazio do kit (Figura 17).



Figura 17 – Esquema de filtros: a) Filtro; b) Tubo vazio; c) Filtro com tubo vazio.

13. Adicionar 500 μ l de AW1 (4).
14. Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.
15. Transferir o filtro para outro tubo vazio.
16. Adicionar 500 μ l de AW2.
17. Centrifugar a 130000 rpm por 3 minutos.

18. Transferir o filtro para um eppendorf de 1,5 mL (Figura 18).

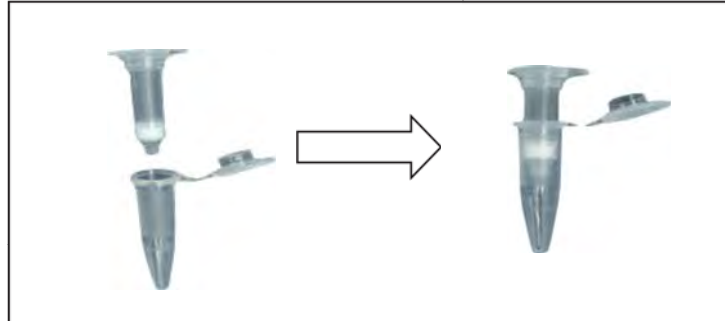


Figura 18 – Transferência do filtro para eppendorf 1,5 mL.

19. Adicionar 100 μ l do eluente AE (6).

20. Aguardar 3 minutos.

21. Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto (Figura 19).



Figura 19 – Posicionamento dos eppendorfs com filtro dentro.

22. Descartar o filtro e guardar o DNA extraído a -20°C .

APÊNDICE D – Protocolo das técnicas moleculares de PCR

1. Ligar a termocicladora (Gene Pro - Thermal Cycler, BIOER Technology Hangzhou, China) e programá-la de acordo com o *primer* referente ao microrganismo escolhido (Figura 21).



Figura 21 – Termocicladora Gene Pro (Thermal Cycler, BIOER Technology Hangzhou, China).

2. Identificar na tampa os eppendorfs para PCR.
3. Pipetar 1,5 µl da amostra do DNA extraído para os eppendorfs de PCR previamente identificados.
4. Preparar o Master Mix em eppendorf de 1,5 mL. O preparo do MIX dependerá da quantidade de reações que será realizada. Cada eppendorf para PCR equivale a 1 reação (Quadro 1).

Quadro 1 – Proporções dos reagentes no Master Mix.

Reagentes	Quantidade (µL)
H ₂ O extra pura (MiliQ - Invitrogen® - Life Technology do Brasil)	18,6 µL
Tampão (10x Reaction <i>buffer</i> Invitrogen® - Life Technology do Brasil)	2,5 µL
MgCl ₂ (Invitrogen® - Life Technology do Brasil)	1,25 µL
Taq Platinum (Invitrogen® - Life Technology do Brasil)	0,125 µL
<i>DNTPs</i> (Invitrogen® - Life Technology do Brasil)	0,5 µL
<i>Primer</i> Forward 100 µL (Invitrogen® - Life Technology do Brasil)	0,25 µL
<i>Primer</i> Reverse 100 µL (Invitrogen® - Life Technology do Brasil)	0,25 µL

5. Misturar o Master Mix fazendo fluxo e refluxo.
6. Pipetar 23,5 μ l do Master Mix nas amostras.
7. Posicionar as amostras na termocicladora (Figura 22).

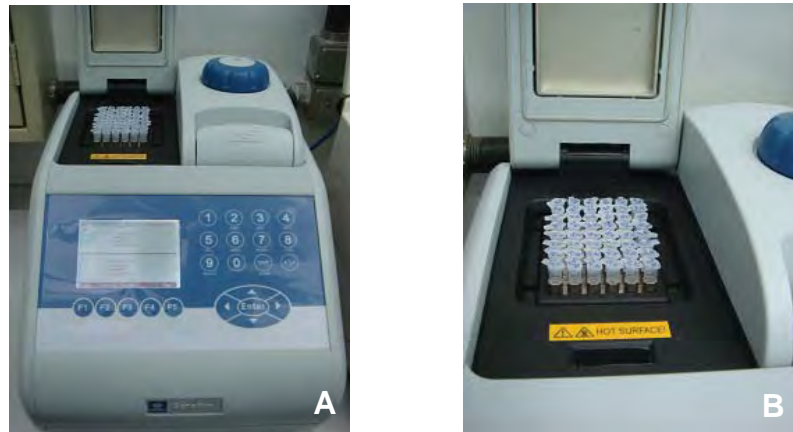


Figura 22 – a e b) amostras posicionadas na termocicladora.

8. Iniciar o ciclo (o tempo do ciclo depende do *primer* escolhido).
9. Fim de ciclo: tirar as amostras da termocicladora e posicioná-las em suporte para eppendorf para, em seguida, realizar a eletroforese em gel de agarose.

APÊNDICE E – Eletroforese em gel de agarose

1. Montar a fôrma do gel encaixando as tiras de borracha para vedar bem as extremidades e não vazar gel.
2. Preparar em becker de vidro o gel de agarose na seguinte proporção: 0,9 g de agarose (1%) (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) para 90 mL de Tris-borato EDTA (TBE) (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) diluído.
 - Diluição do TBE: 900 mL de água destilada para 100 mL de TBE puro.
3. Aquecer em microondas por aproximadamente 1 minuto. A mistura deverá estar bem homogênea e transparente.
4. Transferir o conteúdo do becker de vidro (não contaminado com brometo) para o becker de plástico (contaminado com brometo).
5. Acrescentar 2 µl de brometo de etídio no gel.
6. Verter o gel na fôrma previamente preparada. Em seguida, encaixar os pentes (Figura 25).



Figura 25 – Colocação dos pentes no gel.

7. Esperar o gel endurecer.

- Pipetar 2 μl de corante azul (*Blue juice*, Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) nas amostras, de tal modo que as ponteiros permaneçam dentro do Eppendorf (Figura 26).

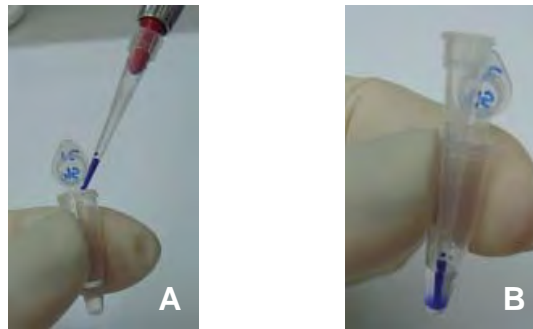


Figura 26 – a e b) noculando 2 μl de corante azul na amostra.

- Quando o gel endurecer, remover cuidadosamente as tiras de borracha e os pentes (Figura 27)

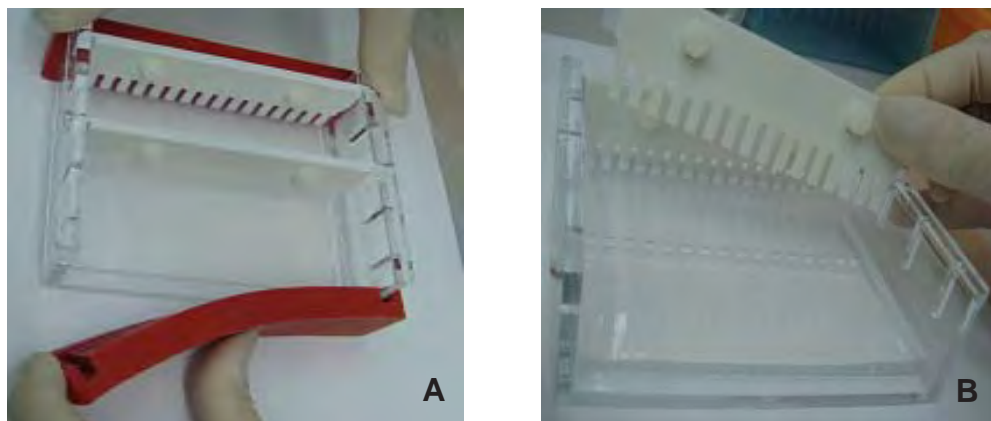


Figura 27 – Remoção dos acessórios para preparo do gel: a) remoção das tiras de borracha; b) remoção dos pentes.

10. Encaixar o gel na cuba de eletroforese preenchida com solução tampão (TBE diluído) (Figura 28).

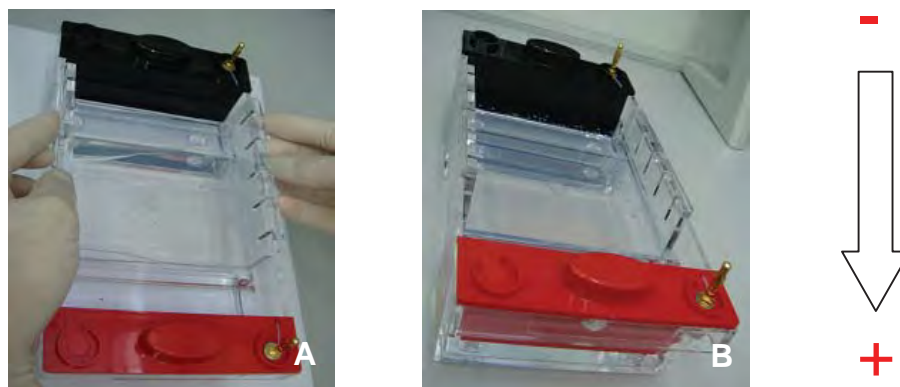


Figura 28 – a e b) Encaixe do gel na cuba de eletroforese. Certificar-se de que o gel está colocado na direção certa, ou seja, do Negativo para o Positivo.

11. Misturar o corante com a amostra de DNA fazendo fluxo / refluxo.
12. O primeiro poço de cada pente do gel deve ser preenchido com *LADDER* (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) diluído e o segundo poço com a ATCC do microrganismo.
- Diluição do *LADDER*: 2 μ l para 15 μ l de água extra pura.
13. Colocar a primeira amostra no terceiro poço do gel e assim sucessivamente (Figura 29).

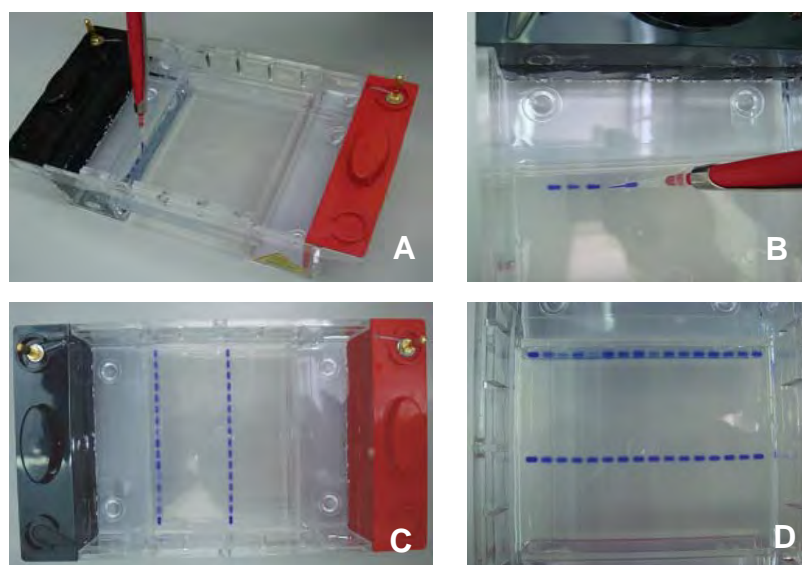


Figura 29 – a, b, c e d) Preenchimento do gel de agarose com *ladder* diluído, ATCC e amostras.

14. Pipetar 4 μ L do *LADDER* diluído e misturar com a bolinha de *blue juice*.
15. Fechar a cuba de eletroforese.
16. Rosquear os fios, e ligar a fonte (o ciclo demora em torno de 35 minutos) (Figura 30).



Figura 30 – Fonte ligada à cuba de eletroforese.

17. Decorridos os 35 minutos, remover o gel da plataforma.
18. Posicionar o gel sobre o transiluminador.
19. Posicionar o fotodocumentador sobre o transiluminador e ligar os equipamentos (Figura 31).

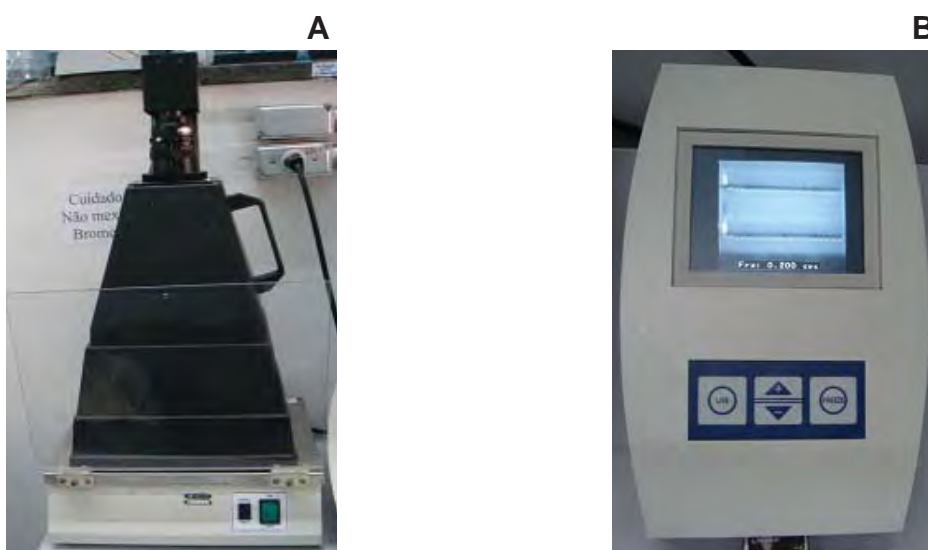


Figura 31 – Documentação fotográfica dos géis: a) fotodocumentador sobre o transiluminador ; b) captura das imagens realizadas pelo programa LISCAP Image Capture software (Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra).

20. Verificar as bandas que acenderam e anotar os resultados (Figura 32).

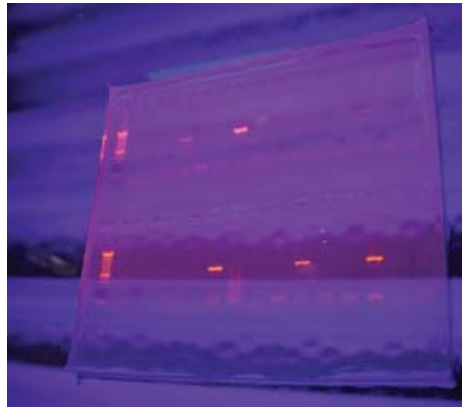


Figura 32 – Leitura das bandas no gel de agarose.

21. Remover o gel do transiluminador e descartar em recipiente contendo NaOCl 5% para neutralização (deixar agir por 30 minutos).

APÊNDICE F – Realização da curva padrão

1. Ver certificado para conferência do número do lote e quantidade de volume para endotoxina.
2. Colocar a quantidade de água apirogênica (Lonza, Walkersville, MD, EUA) de acordo com as instruções do fabricante na Endotoxina de *E. coli*, encontrado no Kit fornecido pela empresa (Figura 33).

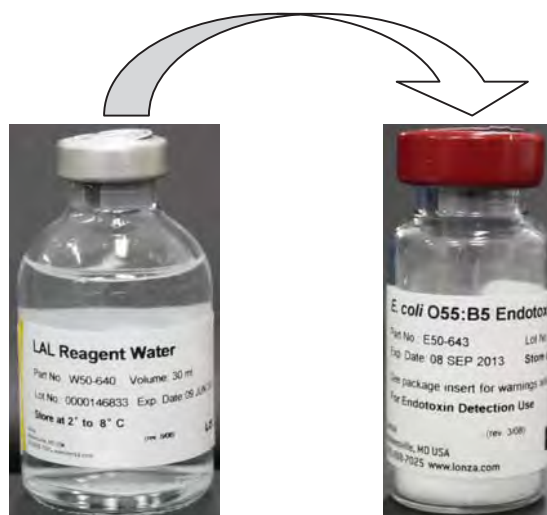


Figura 33 – Esquema para suspender endotoxina de *E. coli* utilizando água apirogênica.

3. Agitar durante 15 minutos.
4. Separar 4 tubos de vidro apirogênicos, tamanho 13 mm x 100 mm (Lonza, Walkersville, MD, EUA), identificá-los de acordo com as diluições (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) e pipetar 0,9 mL de água apirogênica em cada tubo de vidro (Figura 34).

APÊNDICE G – Teste de endotoxina – Processamento das amostras

Para quantificar endotoxinas foi utilizado o kit de acordo com as instruções do fabricante.

1. Nomear os eppendorfs de acordo com a diluição (Figura 36).

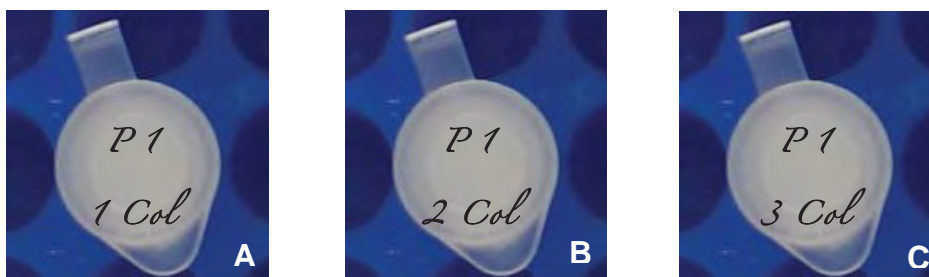


Figura 36 – Eppendorfs nomeados: a) eppendorf para 1ª coleta; b) eppendorf para 2ª coleta; c) eppendorf para 3ª coleta.

2. Pipetar 0,9 mL em cada eppendorf.
3. Agitar durante 1 minuto o eppendorf contendo o cone de papel em 1 mL de água apirogênica (Matriz), obtido nas coletas (Figura 38).
4. Transferir 100 μ l deste eppendorf para o próximo (Diluição 10^{-1}). Agitar 1 minuto, passar 100 μ l para o próximo eppendorf (Diluição 10^{-2}) (Figura 37).

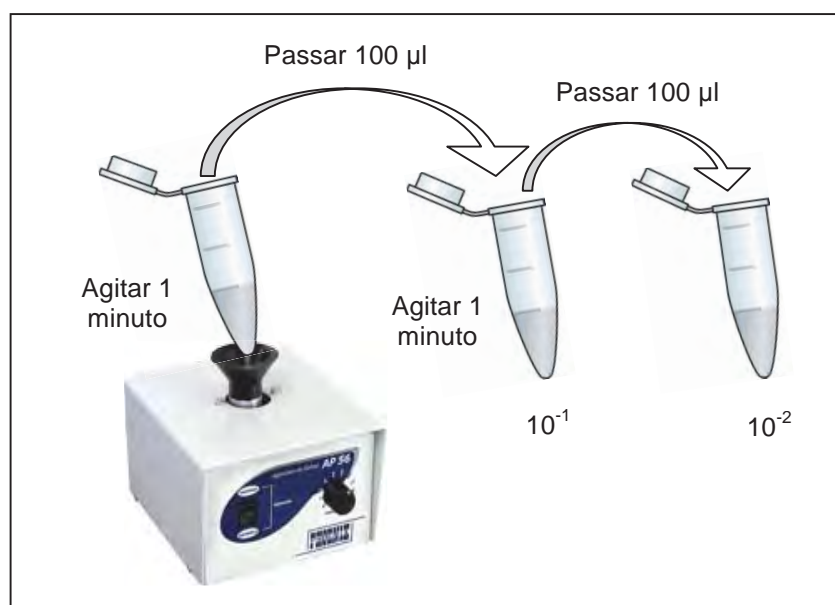


Figura 37– Sequência de diluições da amostra.

5. Após realização da diluição da amostra, agitar o eppendorf por 1 minuto e pipetar, em quadruplicata, 100 μ l da diluição 10^{-2} em placa apirogênica de 96 poços (TPP, Trasadingen, Switzerland), à partir do poço G1 (Figura 38).

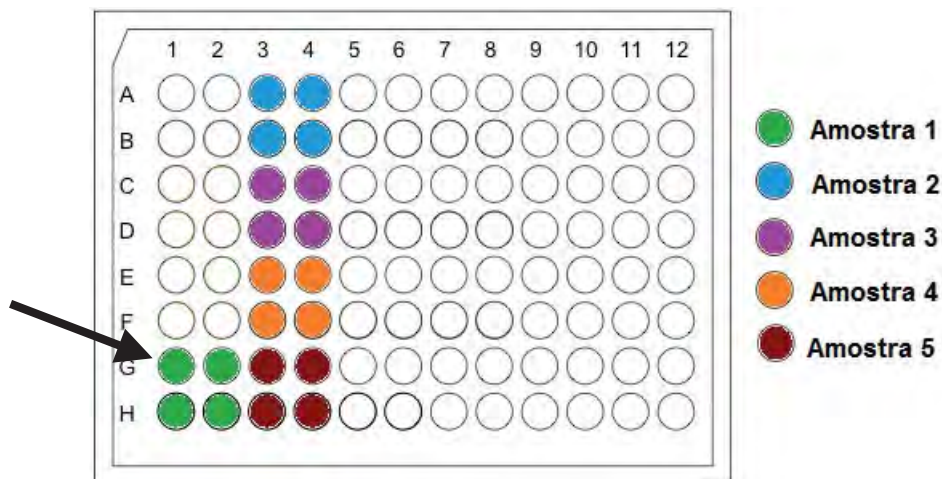


Figura 38– Placa de 96 poços: A seta indica o primeiro poço onde a amostra deverá ser colocada (G1). Cada amostra deverá ser colocada em quadruplicata, ou seja, amostra 1 será colocada nos poços G1, G2, H1 e H2, por exemplo.

6. Após a colocação de todas as amostras na placa, pipetar 100 μ l do branco da reação (água apirogênica), em duplicata, nos poços A1 e A2. Em seguida, pipetar em duplicata, as diluições da endotoxina de *E. coli* para a curva padrão, do mais diluído para o menos diluído (Figura 39).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	BL	3	3	11	11	19	19				
B	S1	S1	+4	+4	+12	+12	+20	+20				
C	S2	S2	5	5	13	13	21	21				
D	S3	S3	+6	+6	+14	+14	+22	+22				
E	S4	S4	7	7	15	15	23	23				
F	S5	S5	+8	+8	+16	+16	+24	+24				
G	1	1	9	9	17	17						
H	+2	+2	+10	+10	+18	+18						

Figura 39 – Placa de 96 poços: BL= Branco da reação (água apirogênica); S1 = diluição 10^{-4} da Endotoxina padrão de *E.coli*; S2 = diluição 10^{-3} da Endotoxina padrão de *E.coli*; S3 = diluição 10^{-2} da Endotoxina padrão de *E.coli*; S4 = diluição 10^{-1} da Endotoxina padrão de *E.coli*; S5 = Endotoxina padrão de *E.coli* (matriz).

7. Adicionar 10 μ l da Endotoxina padrão de *E.coli* (matriz) nos últimos poços de cada amostra (Controle Positivo – poços em amarelo da Figura 39).
8. Incubar a placa no leitor cinético QCL (Cambrex – São Paulo, SP, Brasil) (Figura 40) a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos, acoplado a um microcomputador com *software* Wink QCL específico para gerenciamento, execução e emissão de relatórios.



Figura 40 – Leitor cinético QCL.

9. Pipetar 2,6 mL de água apirogênica no reagente cinético cromogênico do Lisado do amebócito *Limulus* (LAL) (Figura 41).

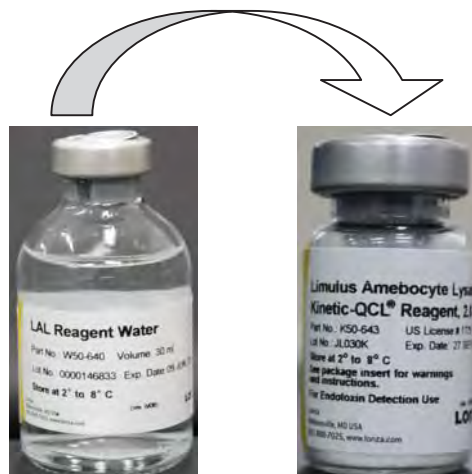


Figura 41 – Esquema para suspender LAL utilizando água apirogênica.

10. Misturar levemente, sem agitar.
11. Adicionar 100 µl do reagente cinético cromogênico do Lisado do amebócito *Limulus* (LAL) em cada poço da placa (Figura 42).

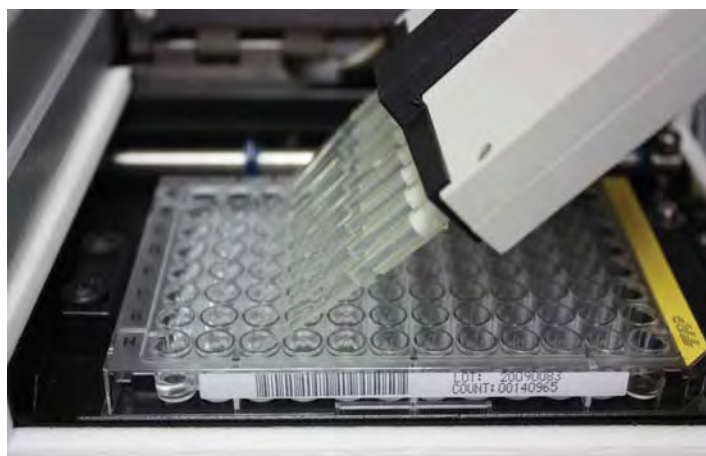


Figura 42– Reagente LAL sendo inoculado em todos os poços da placa.

12. Fechar a tampa do Leitor cinético QCL e iniciar o ensaio cinético. O ciclo demora em torno de 1:15 horas.
13. Ao final do ciclo, os resultados ficam salvos no computador. Retirar a placa do leitor, descartá-la e desligar o equipamento.

ANEXO A – Certificado do comitê de ética em pesquisa

unesp  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028
Fax (12) 3947-9010 / janete@fosjc.unesp.br



CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Com Seres Humanos

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **010/2011-PH/CEP**, referente ao Projeto intitulado “**Identificação in vivo de microrganismos e quantificação de endotoxinas em retratamento endodônticos utilizando extrato glicólico de gengibre como substância química auxiliar**”, sob a responsabilidade de **FLÁVIA GOULART DA ROSA CARDOSO**, tendo como orientadora a Profa. Titular **MARCIA CARNEIRO VALERA**, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, com seres humanos, conforme, Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 12 de abril de 2011.


Profa. Adjunto JÂNETE DIAS ALMEIDA
Coordenadora



**Comitê de Ética em Pesquisa
Com Seres Humanos**

São José dos Campos, 08 de julho de 2011

Ofício nº 040/11-CEP

Prezado(a) Sr.(a)	FLÁVIA GOULART DA ROSA CARDOSO
Projeto	Identificação in vivo de microrganismos e quantificação de endotoxinas em retratamento endodônticos utilizando extrato glicólico de gengibre como substância química auxiliar
PARECER	
De acordo com solicitação da Pesquisadora Responsável fica alterado o título do projeto para "DETECÇÃO E AÇÃO ANTIMICROBIANA E ANTI ENDOTÓXICA DO EXTRATO GLICÓLICO DE GENGIBRE UTILIZADO COMO SUBSTÂNCIA QUÍMICA AUXILIAR DURANTE O RETRATAMENTO ENDODÔNTICO, Convalidando dessa forma o Protocolo nº 010/2011-PH/CEP de 12/04/2011.	

Atenciosamente,


Prof. Adjunta JANETE DIAS ALMEIDA
 Coordenadora