

**MARIA TEREZA PEDROSA DE ALBUQUERQUE**

**AÇÃO DE MEDICAÇÕES INTRACANAL SOBRE BIOFILME  
MICROBIANO LOCALIZADO EM ÁREAS DE REABSORÇÃO  
APICAL DE DENTES HUMANOS EXTRAÍDOS**



2012

**MARIA TEREZA PEDROSA DE ALBUQUERQUE**

**AÇÃO DE MEDICAÇÕES INTRACANAL SOBRE BIOFILME  
MICROBIANO LOCALIZADO EM ÁREAS DE REABSORÇÃO APICAL  
DE DENTES HUMANOS EXTRAÍDOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Especialidade em Endodontia.

Orientador: Profa. Tit. Márcia Carneiro Valera

São José dos Campos

2012

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.

A15a Albuquerque, Maria Tereza Pedrosa de  
Ação de medicações intracanal sobre biofilme microbiano localizado em áreas de  
reabsorção apical de dentes humanos extraídos / Maria Tereza Pedrosa de  
Albuquerque. - São José dos Campos : [s.n.], 2012.  
100.f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) – Faculdade de  
Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2012.  
Orientador: Profa. Dra. Marcia Carneiro Valera.

1. Biofilmes. 2. Sistema de medicações. 3. Reabsorção da raiz. I. Valera, Marcia  
Carneiro. II. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ  
Estadual Paulista. III. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho". IV.  
UNESP – Univ Estadual Paulista. V. 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, 28 de Novembro de 2012.

Assinatura: 

E-mail: [terezapedrosa@hotmail.com](mailto:terezapedrosa@hotmail.com)

**BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera (Orientadora)**

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

**Prof. Adj. Cláudio Antônio Talge Carvalho**

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

**Prof. Adj. Caio Casar Randi Ferraz**

Faculdade de Odontologia de Piracicaba  
UNICAMP – Universidade de Campinas

São José dos Campos, 07 de dezembro de 2012.

## *Dedicatória*

*D*edico...

*Aos meus pais, Cláudio Eugênio Tenório de Albuquerque e Simone Pedrosa de Albuquerque, por tudo o que vocês fizeram e fazem por mim. Por me proporcionarem todo o suporte, apoio, ensinamentos e principalmente o amor incondicional. Vocês são meu porto seguro, nunca me deixaram faltar nada, sempre fizeram questão de estar presentes em todos os momentos da minha vida, e isso foi fundamental para a formação dos meus conceitos de amizade, caráter, dignidade, disciplina, ética e justiça. Sei o quanto foi e é difícil superar a distância, já que fomos sempre tão unidos, mas, por mais doloroso que seja, vocês sempre me deram força pra continuar. Só Deus sabe o quão doloroso é o momento da partida, e vocês estão sempre lá me consolando e me motivando a seguir em frente. Não há palavras suficientes pra agradecer a vocês por tudo e nem tampouco*

*pra expressar o meu amor por vocês. Agradeço a Deus todos os dias por tê-los em minha vida. AMO MUITO VOCÊS!*

*A minha avó, **María Lúcia Tenório de Albuquerque**, uma pessoa maravilhosa e iluminada que sempre esteve presente na minha vida, me incentivando e apoiando em todas as decisões. Sinônimo de amor, carinho, força e delicadeza ao mesmo tempo. Sempre me estimulou a estudar e seguir em frente, me recebendo de braços abertos toda vez que eu volto pra casa, falando com um enorme sorriso: "Oi, meu coração amado". A senhora não sabe como é bom ouvir isso. Amo muito você vovó!*

## *Agradecimentos Especiais*

*À minha querida orientadora de mestrado, professora **Márcia Carneiro Valera**, por ter me escolhido como sua orientada e ter me recebido tão bem sem ao menos me conhecer. Obrigada por ter acreditado e confiado em mim. Obrigada por ter me apoiado e me confortado sempre, oferecendo a sua casa, sua companhia e de sua família, para que eu não me sentisse tão só. Obrigada pelas palavras de carinho e incentivo nos momentos que eu mais precisei, durante toda essa jornada. Obrigada também pelos ensinamentos transmitidos e pela oportunidade de aprender a orientar alunos de graduação em seus TCCs. A nossa convivência diária e os seus atos, despertou em mim um enorme carinho e uma grande admiração pela senhora, pelo seu dom de ensinar, humildade e paciência que tem com suas orientadas e com os alunos de graduação, e pela ética na realização das pesquisas. Sou muito feliz e abençoada de ter a senhora como minha orientadora. Muito obrigada por tudo!*

*À minha querida orientadora da graduação, Stella Maris Wanderley Nobre, uma pessoa maravilhosa, de um caráter incrível, que sempre me incentivou a realizar pesquisa, me influenciando a seguir para a área de pós-graduação. Obrigada pela oportunidade de ter convivido com você, pelos ensinamentos, pelos bons momentos que passamos na clínica, no HU, no CCBI, pelo seu apoio sempre, por acreditar em mim, pela sua amizade. Sou muito feliz e honrada de tê-la tido como orientadora. Muito obrigada!*



*À minha querida professora de Endodontia da graduação, Inês de Fátima de Azevedo Jacinto Inojosa, que também considero minha orientadora da graduação. Uma pessoa a quem admiro muito pelo amor que tem à endodontia, realizando seu trabalho sempre com ética e entusiasmo, pelo prazer que tem de dar aula e estar com os alunos e pela maneira como se porta na clínica de graduação. Este seu jeito foi responsável por despertar em mim a vontade de seguir os caminhos da endodontia. Obrigada por acreditar sempre em mim, pelas palavras de conforto e incentivo nos meus momentos de indecisões, pelas nossas discussões sobre a endodontia, pelos trabalhos que realizamos juntas, pela disposição de me ensinar e de tirar todas as minhas dúvidas sempre com a maior alegria, pelo exemplo de profissional e principalmente pela amizade sincera que construímos. Muito obrigada!*

# *Agradecimentos*

*A*gradeço...

... acima de tudo a **Deus**, pois sem ele, esta conquista jamais seria possível. Tudo que acontece em minha vida tem um ensinamento e um aprendizado, proporcionados por ele, que resultam no meu crescimento pessoal. Ele esteve presente em todos os momentos bons e difíceis dessa caminhada. Obrigada pela minha família, que é tudo pra mim, e por ter colocado pessoas maravilhosas em meu caminho.

... ao meu *Irmão*,

A meu querido irmão, **Claudio de Albuquerque Neto**, pelo amor, carinho, apoio e incentivo sempre. Agradeço por estar ligada a você para toda a vida. Ter você como irmão me faz lembrar que numa família nunca se está só. A fraternidade é sinônimo de um amor sem limites e que independente de tudo e de qualquer desavença, permanece o mesmo, pois temos em comum, em nossa alma, as pessoas mais lindas e amadas, os nossos pais. Muito obrigada por tudo Claudinho. Te amo muito!

... ao meu *Namorado*,

**Gustavo Henrique de Barros Callado Macedo**, uma pessoa maravilhosa que apareceu na minha vida, que sempre esteve presente, me apoiando e me dando todo o amor e carinho pra que eu continuasse em frente. Só a gente sabe o quanto é difícil toda essa distância, e mesmo assim, o nosso amor prova ser maior que esses obstáculos. Agradeço a Deus por tê-lo ao meu lado. Obrigada por tudo. Amo muito você!

... às minhas *Queridas amigas de Maceió*,

**Iana Gabriela, Anna Luiza Gaia, Luísa Bastos, Luiza Leão, Natasha Gusmão, Paula Mariane, Marcella Barros, Lia Rodrigues**, que são as irmãs que eu não tive, essenciais pra mim. Vocês são sinônimos de uma amizade verdadeira, cumplicidade e amor, que vem desde a infância e nunca se perdeu, mesmo quando cada uma seguiu seu caminho. Sempre me incentivaram e me apoiaram em tudo. Muito obrigada por vocês existirem. Amo muito vocês!

... às minhas *Primas*,

**Carolina Pedrosa, Renata Pedrosa, Fernanda Pedrosa e Larissa Pedrosa, Mariana Pedrosa e Thaisa Pedrosa** as melhores primas que eu poderia ter na vida. O amor que existe entre a gente é inexplicável. Somos e seremos amigas por toda a vida. Crescemos juntas

e criamos um amor indestrutível que nem o tempo e nem a distância conseguem superar. Muito obrigada por vocês existirem. Amo muito vocês!

... aos meus *Tios*,

**Fernando Gomes, Solange Melo e Angela Maria**, pelo amor dedicado a mim. Obrigada por sempre me apoiarem, se preocuparem comigo e me receberem com o maior prazer e felicidade em suas casas. Vocês são muito importantes na minha vida. Amo vocês!

... aos *meus amigos de graduação*,

**Mariana Quintela, Aline Barbirato, Thayse Rodrigues, Paloma Romagna, Renata Cabral, Amanda Torres, Cristine Borges, Leandro Ferreira, Paulo Fragoso e Thiago Mesquita**, pelos ótimos momentos vividos nos 5 anos de convivência durante a graduação. Vocês foram e são muito importantes pra mim. Obrigada por tudo!

... aos *meus amigos de Piracicaba*,

À minha querida amiga **Juliana Yuri Nagata**, uma pessoa muito especial na minha vida, que surgiu de forma inesperada e se tornou uma das minhas melhores amigas. Jú, você foi um presente de Deus pra mim, está ao meu lado sempre, me acompanhou desde a especialização até o final do meu mestrado, me dando força e apoio nos momentos mais

difíceis, sempre me estimulando a seguir em frente. Obrigada por fazer parte da minha vida. Você é uma pessoa pura, inteligentíssima, honesta, ética e com um talento incrível para a docência. A cada dia que passa eu a admiro mais, e espero um dia chegar a ser um pouquinho do que você é. Tenho certeza que nossa amizade é eterna, pois mesmo com a distância ela só cresce e se concretiza. Obrigada por tudo Juzinha. Amo muito você!

À **Fernanda Lins**, por ter me acolhido tão bem quando no momento em que mais precisei e principalmente por ter se tornado uma grande amiga minha, que sei que vou levar por toda a vida. Você esteve comigo nos momentos difíceis e também nos mais felizes dessa minha jornada fora de casa. Obrigada pelas nossas conversas, momentos de descontração e choro também. Obrigada por ter me estendido a mão sempre que eu precisei e principalmente pela sua amizade. Admiro muito você pela sua força de vontade, perseverança, caráter, inteligência e sinceridade. Obrigada por tudo Suki. Amo você!

À **Nubia Pini**, pela sua amizade sincera, por me receber em sua casa de braços abertos, por nossas conversas, pela sua preocupação comigo e por todos os momentos bons e ruins que nós vivemos. Uma menina simples, humilde e ao mesmo tempo de uma inteligência incrível. Admiro muito você e agradeço a Deus por ter colocado você na minha vida. Obrigada por estar ao meu lado sempre. Amo você!

À **Thais Mageste**, pela amizade sincera em todos esses anos de convivência em Piracicaba. Por ter me apoiado nos momentos que precisei, pelos nossos almoços de fins de semana, pelas boas risadas que demos. Muito obrigada por tudo majestade! Gosto demais de você!

Ao **Thiago Farias**, por ter me recebido tão bem quando cheguei em Piracicaba, por nossas conversas e pela sua amizade. Admiro muito você e sei que vai ter um futuro brilhante pela frente. Obrigada por tudo!

À **Vanessa Rossi** uma pessoa muito especial e querida que apareceu na minha vida assim que cheguei em Piracicaba. Obrigada por ter me acolhido tão bem, pelos nossos almoços de sábados, pelos ensinamentos transmitidos, por ter me apoiado e me dado muita força e incentivo quando eu passei na prova do mestrado. Obrigada por tudo Van!

À **Aniele Lacerda, Dani Myagaki, Daniel Herrera, Tiago Rosa, Letícia Nóbrega, Maíra Prado**, pela convivência, por todo o apoio oferecido sempre que precisei, pelas nossas viagens para os congressos, pelas boas risadas, por fazer da minha vida em Piracicaba mais feliz. Muito obrigada!

### *... aos Amigos e Colegas da Pós-graduação*

À minha amiga, **Rafaela Vasconcelos**, pois se não fosse por você eu não estaria nesta faculdade, conquistando esse Título neste momento. Obrigada pela sua amizade sincera, por ter me incentivado muito, sem nem me conhecer direito, em um dos momentos que eu mais precisava de incentivo e apoio. Obrigada por todos os momentos, bons e ruins, que passamos juntas nessa jornada, todos eles foram um grande aprendizado e a prova de que nossa amizade permanece. Obrigada por ter ficado ao meu lado quando minha tese deu errado, rezando por mim e me incentivando a seguir em frente. Obrigada pelos momentos de alegrias. Admiro muito você Rafa, e agradeço a Deus por ter te colocado em minha vida.

À minha querida amiga **Cláudia Bin**, pela amizade verdadeira e especial que construímos, por estar ao meu lado sempre, e por ter me apoiado e me consolado nos momentos mais difíceis que passei em São José dos Campos. Obrigada pelas conversas diárias, pelas boas risadas, por ter me recebido tão bem em sua casa. Admiro muito você e agradeço a Deus por ter você em minha vida. Muito obrigada por tudo!

À minha amiga **Heleine Rêgo**, pela sua amizade e presença na minha vida, me apoiando, ajudando e estando ao meu lado em todos os momentos, desde que te conheci. Obrigada pelas nossas longas conversas e pelos nosso almoços. Sou muito grata em tê-la como amiga e espero que a nossa amizade só cresça. Muito obrigada por tudo!

À minha amiga **Nádia Ferreira**, pois foi um presente pra mim ter você ao meu lado no trabalho e na vida. Obrigada pela nossa amizade, que cresce a cada dia, por todo apoio e ajuda que você me deu quando eu mais precisei, pelas boas risadas em momentos de descontração, pelas nossas conversas. Muito obrigada por fazer parte da minha vida!

Às minhas amigas **Marcella Pavanello, Camila Said e Sara Almeida**, por tornarem minha vida aqui em São José dos Campos mais feliz. Sou muito grata por ter tido vocês como colegas e amigas de mestrado. Passamos por muitas coisas juntas, e sempre permanecemos unidas. Muito obrigada pela amizade e carinho de vocês e por tudo o que fizeram por mim.

À minha amiga **Ivany Baptista**, uma pessoa muito especial que apareceu na minha vida, e que me ajudou tanto, sempre com um sorriso no rosto e um abraço de conforto nos momento em que eu mais precisei. Muito obrigada por tudo!

À **Adriana Chung, Flávia Goulart e Lilian Maekawa** por todos os ensinamentos sobre microbiologia a mim transmitidos, pela agradável convivência no laboratório e pela amizade de vocês. Muito obrigada!

Às alunas do Doutorado **Gleyce, Ana Cláudia, Raffaella, Sylvia e Aletéia**, pela agradável convivência durante meu curso de Mestrado.

À **Sabrina Freitas e Fernanda Papaiz** pela amizade de vocês, por me proporcionarem momentos de alegria, pela agradável companhia, por nossos almoços e viagens de fim de semana. Muito obrigada!

Aos colegas da Microbiologia, **Cristiane, Ana Carolina, Simone, Júnia, Fernanda, Rodnei, Lírian, Michele e Patrícia**, pela convivência durante todo o período da parte experimental da minha pesquisa. Obrigada por me apoiarem e oferecerem toda a ajuda possível para que meu trabalho fosse realizado com sucesso. Muito obrigada a todos vocês!

... aos *Mestres*,

Aos Professores da Disciplina de Endodontia por terem me recebido de braços abertos. Agradeço ao **Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo** pela sua disposição em ajudar em qualquer momento, pelas nossas conversas e discussões sobre a endodontia e por ter me recebido tão bem quando cheguei a São José dos Campos. Ao **Prof. Adj. Cláudio Antonio Talge Carvalho**, meu conterrâneo, pela alegria que sempre me recebeu, pela convivência muito divertida durante todo o curso de Mestrado e por estar sempre disposto a me ajudar. À **Profa. Adj. Ana Paula Martins Gomes e à Profa. Assist. Simone Helena Gonçalves de Oliveira**, pelo carinho, pelo sorriso no rosto sempre,



transmitindo uma sensação de paz e tranquilidade, pela convivência, mesmo sendo por pouco tempo. Meus sinceros agradecimentos a todos vocês, por participarem da minha formação como Mestre.

À **Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira** e ao **Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge** pelas orientações, ensinamentos, incentivo e apoio durante a execução deste trabalho.

À **Profa. Dra. Elaine Costa de Azevedo Ferreira**, por estar sempre presente, me estimulando e incentivando no aprendizado e na boa conduta. Obrigada pela sua amizade e carinho. Admiro muito você pela maneira como você vive a vida, pela sua força interior, pelo seu carinho, honestidade, paciência que faz com que eu me sinta confortável na sua presença. Muito obrigada por todos os conselhos e ensinamentos transmitidos. Obrigada por tudo!

Ao meu orientador da especialização **Prof. Adj. Alexandre Augusto Zaia**, por ter me recebido de braços abertos como sua estagiária, me estimulando sempre a crescer e ir atrás dos meus objetivos. Obrigada por todos os ensinamentos transmitidos sobre Endodontia e sobre a vida.

Aos professores do curso de Especialização em Endodontia da FOP- UNICAMP, **Prof. Adj. Alexandre Augusto Zaia**, **Prof. Adj. Caio Randi Ferraz**, **Prof. Dr. José Flávio de Almeida**, **Prof. Adj. Francisco José de Souza-filho**, **Profa. Dra. Adriana de Jesus Soares** e **Profa. Tit. Brenda Paula de Almeida Gomes**, por todos os conhecimentos transmitidos, pela convivência agradável durante todo o curso de Especialização.

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

... às *Alunas de Iniciação Científica*,

**Manuella Oliveira, Flávia Nicoli e Denise Almeida** pelo ótimo convívio durante a realização dos trabalhos de Iniciação Científica, pela amizade que surgiu neste tempo, por tornar tão prazerosa a realização dos trabalhos. Admiro muito vocês, pela força de vontade e dedicação que tem, e tenho certeza que serão pessoas e profissionais incríveis. Muito obrigada!

... aos *Secretários*,

**Rosângela**, do Departamento de Odontologia Restauradora, que sempre se mostrou disposta a ajudar.

**Erena, Rosemary, Maria Aparecida, Bruno e Ivan**, da Pós-Graduação pelas informações prestadas.

**Carlos Alberto Guedes**, pelas orientações nos projetos e relatórios da FAPESP durante o curso de Mestrado.

... aos *Técnicos*,

Às técnicas de laboratório de Odontologia Restauradora **Josiana, Fernanda** e à **Thaís**, do Microscópio Eletrônico de Varredura, por toda a ajuda prestada.

Ao técnico de laboratório **Sérgio**, pela amizade, e disposição de ajudar sempre. Obrigada pelos ensinamentos e convivência, quase sempre bem humorada, durante toda a fase experimental deste trabalho. Muito obrigada!

À **Dona Marinete**, pela alegria e boa vontade de ajudar sempre, pelo carinho e pelo delicioso cafezinho de todos os dias.

... à *FAPESP*,

À **fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão da Bolsa de Mestrado (processo número 2011/04349-2) e auxílio à pesquisa (processo número 2012/08274-0) possibilitando a realização deste trabalho.

... à *FOSJC*

**Faculdade de Odontologia de São José dos Campos**  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do Diretor, Prof. Dr. José Roberto Rodrigues e do Vice-Diretor, Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli.

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

***MUITO OBRIGADA!!!***

*“Depois de algum tempo você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida”.*

*William Shakespeare*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	21
<b>ABSTRACT</b> .....	22
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	23
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	27
<b>2.1 Biofilme bacteriano</b> .....	27
<b>2.2 Métodos utilizados para eliminar biofilme bacteriano radicular</b> .....	35
2.2.1 Substâncias químicas auxiliares e medicações intracanal .....	35
2.2.2 <i>Zingiber officinalis</i> .....	45
<b>PROPOSIÇÃO</b> .....	49
<b>MATERIAL E MÉTODO</b> .....	50
<b>4.1. Seleção dos dentes</b> .....	50
4.1.1 Preparo prévio .....	50
4.1.2 Critérios para seleção das raízes .....	51
<b>4.2 Preparo das raízes</b> .....	51
<b>4.3 Montagem das raízes nas placas de 24 poços</b> .....	53
<b>4.4 Divisão dos grupos experimentais</b> .....	55
<b>4.5 Formação do biofilme apical</b> .....	55
<b>4.6 Medicação intracanal</b> .....	59
<b>4.7 Análise microbiológica por UFC/ml</b> .....	61
<b>4.8 Análise estatística</b> .....	63
<b>4.9 Análise por Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)</b> .....	63
<b>RESULTADOS</b> .....	65
<b>5.1 Análise microbiológica</b> .....	65
5.1.1 Análise Estatística Descritiva .....	66
5.1.2 Análise Estatística Inferencial .....	68
<b>5.2 Análise por Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)</b> .....	69
<b>DISCUSSÃO</b> .....	76
<b>CONCLUSÕES</b> .....	86

<b>REFERÊNCIAS</b> .....	88
<b>APÊNDICE A</b> .....	97
<b>ANEXO A</b> .....	100

Albuquerque MTP. Ação da medicação intracanal sobre biofilme microbiano localizado em áreas de reabsorção apical de dentes humanos extraídos [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2012.

## RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar a ação de medicações intracanal sobre biofilme microbiano localizado em áreas de reabsorção externa de dentes humanos extraídos. Para isto, 90 raízes de dentes humanos extraídos apresentando reabsorção apical externa foram submetidas à instrumentação padronizada. Em seguida foram divididas aleatoriamente em 6 grupos (n=15). As raízes foram expostas a cepa de *E. faecalis* (ATCC 29212) por 10 dias para induzir a formação de biofilme microbiano nas áreas de reabsorção externa apical. Após a formação do biofilme, foram inseridas medicações intracanal de acordo com os grupos. Grupo (HC): hidróxido de cálcio com solução fisiológica; Grupo (HC-CHX): hidróxido de cálcio com Clorexidina gel 2%; Grupo (HC-GEN) hidróxido de cálcio com extrato glicólico de gengibre 20%; Grupo (CHX): clorexidina gel 2%; Grupo (GEN): extrato glicólico de gengibre; Grupo controle (CC): solução salina fisiológica. Cada grupo permaneceu com medicação no interior dos canais radiculares por um período de 15 (quinze) dias. Ao final desse período as raízes foram avaliadas através do cálculo de unidades formadoras de colônias por superfície do espécime (UFC/ml) e através de análise em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). Os resultados foram analisados pelos testes estatísticos de ANOVA e Tukey. Verificou-se que nenhuma medicação intracanal eliminou completamente o biofilme, mas houve redução dos microrganismos pela contagem de UFC/mL no grupo CHX, seguido pelo grupo HC. Os demais grupos apresentaram resultados semelhantes ao grupo controle. As imagens por MEV confirmaram a permanência do biofilme nas áreas de reabsorção apical. Conclui-se que as medicações intracanal não foram capazes de eliminar completamente o biofilme apical de *E. faecalis* in vitro.

Palavras-chaves: Biofilme microbiano. Medicação intracanal. Reabsorção apical.

*Albuquerque MTP. Action of intracanal dressing on bacterial biofilm located in apical resorption areas of extracted human teeth [dissertation]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2012.*

### **ABSTRACT**

*The aim of this study is to evaluate the effects of intracanal medication on microbial biofilm located in apical external root resorptions of extracted human teeth. 90 roots of extracted human teeth with apical external root surface were submitted to standardized instrumentation. The roots will be randomly divided into 6 groups of 15 roots each (n=15). The roots were exposed to *E. faecalis* strains (ATCC 29212) for 10 days to induce microbial biofilm formation in resorptions of apical external root surface. After biofilm formation, intracanal medications were inserted in each group. Group (HC): calcium hydroxide with sterile saline solution; Group (HC-CHX): calcium hydroxide with Chlorhexidine gel 2%; Group (HC-GEN): calcium hydroxide with glycolic extract of ginger 20%; Group (CHX): chlorhexidine gel 2%; Group (GEN): extract of ginger 20%; Control group (CC): sterile saline solution. Each group remained with medication in the root canal for fifteen (15) days. After this period the roots were evaluated by calculating the colony-forming units per surface of the specimen (CFU / ml) and by analysis of Scanning Electron Microscope. The results will be analyzed using statistical tests of ANOVA and Tukey. It was found that no dressing completely eliminated biofilm, but it was a decrease in microorganisms number according to CFU / mL in the CHX group, followed by HC group. The other groups showed similar results to the control group. The SEM images confirmed the permanence of biofilm in areas of apical resorption. It is concluded that the dressing is not able to completely eliminate the biofilm apical *E. faecalis* in vitro.*

*Key words: Bacterial biofilm. Intracanal dressing. Apical root resorption.*



## INTRODUÇÃO

Os microrganismos e seus produtos são de fundamental importância na indução de doenças pulpares e perirradiculares (Takehashi et al., 1965; Sjögren et al., 1990; Sundqvist et al., 1998). Estes podem sobreviver ao preparo químico-mecânico dos canais radiculares tornando-se uma das principais causas de insucesso nos tratamentos endodônticos (Distel et al., 2002). Algumas bactérias resistentes possuem mecanismos adaptativos eficientes que permitem sua sobrevivência em novos ambientes e circunstâncias biológicas, mesmo com a realização de limpeza e modelagem adequadas dos canais radiculares (Sundqvist et al., 1998; George et al., 2005). Grande parte destes microrganismos que persistem, estão localizados no terço apical do canal radicular (Nair et al., 1990).

Os dentes que apresentam lesão perirradicular visível em exames radiográficos possuem na superfície externa do ápice radicular, áreas de reabsorção no cimento envolvendo, muitas vezes, todo o ápice. Essas áreas podem reter microrganismos ou facilitar a colonização dos mesmos (Tronstad et al., 1981). Estes microrganismos podem se aderir à superfície radicular e se agrupar em comunidades altamente organizadas, com formato de cogumelo, embebidas em uma matriz extracelular de polissacarídeos e rodeada por canais de água que fornecem nutrientes e eliminam resíduos, conhecidas como biofilme (Distel et al., 2002; Chavez de Paz, 2007). O biofilme dental é uma das principais causas de insucesso do tratamento endodôntico, já que localiza-se em regiões de difícil acesso (Ricucci, Siqueira Jr., 2010). Vários autores relatam casos clínicos de insucesso no tratamento endodôntico causados pela presença

de biofilme apical (Carr et al., 2009; Ricucci, Siqueira jr., 2008; Ricucci, Siqueira jr., 2011).

Dentre as espécies bacterianas endodônticas que podem estar envolvidas na formação de biofilme, *Enterococcus faecalis* é a uma das mais importantes (Spratt et al., 2001). Trata-se de bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa, que possui a habilidade de sobreviver no interior de canais radiculares, mesmo após a realização do tratamento endodôntico. Ela tem a capacidade de adaptar-se em ambientes com tensão de oxigênio reduzida, pouca disposição de nutrientes e com a presença de antibióticos que agem selecionando microrganismos no interior do canal radicular (Sundqvist et al., 1998; Kayaoglu et al., 2011). Essa bactéria parece ser mais resistente a medicações utilizadas durante o tratamento e é um dos poucos organismos que tem se mostrado resistente ao efeito antibacteriano do hidróxido de cálcio (Byström et al., 1985; Ørstavik et al., 1990; Gomes et al., 2003).

Medicações intracanal tendem a ser efetivas contra microrganismos que resistem ao preparo químico mecânico do sistema de canais radiculares e possuem a capacidade de controlar o exudato persistente e a ação destrutiva de osteoclastos nas áreas de reabsorção radicular externa (Estrela et al., 2009).

A medicação intracanal mais utilizada mundialmente é o hidróxido de cálcio  $[Ca(OH)_2]$ , conhecido por possuir muitas das propriedades consideradas ideais para uma medicação intracanal como indução da formação de tecido duro, ação antimicrobiana moderada e capacidade de dissolução tecidual (Nerwich et al., 1993). Sua atividade antimicrobiana provém da sua capacidade de elevar o pH do meio, promovendo um ambiente alcalino e osteogênico sobre os tecidos circundantes através da liberação de íons hidroxila ( $OH^-$ ) (Tronstad et al., 1981), eliminando assim grande parte dos microrganismos que são incapazes de sobreviver em um ambiente com pH tão elevado (Byström et al., 1985). Seu pH é em torno de 12,5 tendo efeito destrutivo sobre as

membranas celulares e estruturas protéicas das bactérias (Spangberg, 1994).

Considerando a importância da medicação intracanal, a clorexidina tem sido bastante pesquisada por possuir amplo espectro antimicrobiano, habilidade de manter sua atividade antimicrobiana por tempo prolongado quando aderida a substratos aniônicos e por sua lenta liberação enquanto sua concentração decresce (Basrani et al., 2002; Gomes et al., 2006; Siqueira jr. et al., 2007). A partir disto, pesquisas começaram e a ser produzidas visando verificar a ação da clorexidina como substância química irrigadora e também como medicação intracanal sozinha ou associada ao hidróxido de cálcio no combate a bactérias extremamente resistentes como *E. faecalis* (Gomes et al., 2003; Menezes et al., 2004; Valera et al., 2010; Kayaoglu et al., 2011).

Apesar de a Clorexidina apresentar excelente efeito antimicrobiano quando utilizada sozinha ou associada ao hidróxido de cálcio (Gomes et al., 2003; Ercan et al., 2006), estudos recentes mostram que a mesma apresenta citotoxicidade liberando paracloroanilina quando utilizada sozinha e espécies de oxigênio reativo quando associada ao hidróxido de cálcio (Barbin et al., 2008). Segundo Ribeiro et al. (2005), em seu estudo para avaliar se os agentes antimicrobianos endodônticos podem induzir quebras no DNA de células de ovários de hamster chinês (CHO), nenhuma das substâncias causou danos às células avaliadas, inclusive a clorexidina. Assim, percebe-se a necessidade de mais estudos sobre a toxicidade da clorexidina.

Uma alternativa, que vem sendo estudada recentemente, é a utilização de fitoterápicos (Prabhakar et al., 2010; Lantz et al., 2007). A literatura tem mostrado que *Zingiber officinalis*, conhecido como gengibre, possui ação antibiótica e antiinflamatória, sugerindo-se assim, a sua utilização na endodontia como um potencial agente irrigante e medicamento intracanal.

Baseando-se nos resultados destes estudos e no escasso conhecimento sobre a atuação de medicações intracanal em biofilmes localizados nas áreas de reabsorção da porção apical externa da raiz, o presente estudo tem por objetivo avaliar a ação de medicações intracanal sobre biofilmes microbianos localizados em áreas de reabsorção externa apical de dentes humanos extraídos.

## **REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Biofilme bacteriano**

O princípio do tratamento endodôntico para alcançar resultados favoráveis, principalmente em casos de infecções persistentes, é primeiramente o reconhecimento do problema e posteriormente a remoção dos fatores etiológicos (Estrela et al., 2009). Assim, a principal causa de insucesso no tratamento endodôntico é a presença de microrganismos persistentes, difíceis de serem eliminados mesmo com a realização de um preparo químico-mecânico eficiente e utilização de substâncias químicas auxiliares (Distel et al., 2002). Grande parte destes microrganismos encontra-se alojada no terço apical do canal radicular (Nair et al., 2009), e podem se associar e aderir a alguma superfície, formando comunidades complexas conhecidas como biofilme bacteriano (Ricucci, Siqueira Jr., 2010). Essas comunidades podem localizar-se na superfície externa do ápice radicular, dificultando o acesso de instrumentos e medicações intracanal, passando a ser a causa de insucesso do tratamento endodôntico com grande dificuldade de resolução (Ricucci, Siqueira Jr., 2010).

Tronstad et al. (1990) avaliaram o ápice radicular de dente portador de lesão periapical refratária, que necessitou ser removido cirurgicamente por apresentar falha no tratamento endodôntico. Ao observar, por microscópio eletrônico de varredura, áreas próximas ao forame apical (superfície externa da raiz) foi notada a presença de cocos circundados por matriz extracelular, principalmente nas regiões onde

havia reabsorção de cemento e de cemento e dentina. Eles atribuíram a falha do tratamento à presença de infecção extraradicular, concluindo que os microrganismos, rodeados por matriz extracelular ou na lesão periapical, foram protegidos contra as defesas do hospedeiro e terapia antibiótica sistêmica.

Tronstad et al. (1990) examinaram microscopicamente as superfícies de pontas das raízes removidas durante cirurgia parendodôntica. Para isto, 2 a 3 mm do ápice destas raízes foram seccionados, lavados com solução salina e imersos em formalina neutra tamponada 10%. Em seguida, as amostras foram fixadas, desidratadas e metalizadas para posterior análise em microscópio eletrônico de varredura. Este estudo mostrou que havia grande quantidade de bactérias na região apical, cobertas com material extracelular, formando uma placa com predominância de cocos e filamentos.

Segundo Costerton et al. (1999), os biofilmes microbianos são comunidades estruturadas de células bacterianas aderidas umas as outras que produzem uma matriz polimérica hidratada e encontram-se aderidas a alguma superfície inerte ou viva. Estes biofilmes podem estar presentes em muitas infecções bacterianas crônicas persistentes na região periapical da raiz dental e são altamente resistentes a agentes antimicrobianos.

Nair et al. (1990) avaliaram a presença ou ausência de bactérias no terço apical dos canais radiculares e na região periapical. Selecionaram dentes tratados endodonticamente, com evidências radiográficas de lesões periapicais e cultura bacteriana negativa antes da obturação dos canais radiculares. Os dentes foram preservados por um período de que variou de 4 a 10 anos. Destes casos, 90% apresentaram sucesso e 10% apresentaram insucesso. Estes foram submetidos à cirurgia, de onde foram obtidos os espécimes utilizados neste estudo. Os mesmos eram compostos pelo terço apical da raiz, lesão periapical e por uma fina lâmina de osso circundante. Em seguida, os espécimes foram

preparados para análise microscópica. Os resultados mostraram que 6 dos 9 casos analisados, apresentaram bactérias ou fungos, visíveis a microscopia de luz ou ao microscópio eletrônico. Desta forma pode-se concluir que, dos 9 casos avaliados a maioria apresentou bactéria ou fungo nos canais radiculares e encontravam-se assintomáticos por longo período de tempo. Observou-se também que o microscópio de luz, por si só, foi ineficaz em detectar infecções persistentes no canal radicular, necessitando assim, do microscópio eletrônico para a detecção de microrganismos. Os achados deste estudo mostraram que a presença de microrganismos persistentes atua de maneira significativa no insucesso do tratamento endodôntico e na manutenção das lesões periapicais.

Lenonardo et al. (2002) realizaram estudo como o objetivo de avaliar a presença de biofilme bacteriano na superfície externa do ápice radicular em dentes portadores de necrose pulpar com ou sem lesões periapicais visíveis radiograficamente. Foram utilizados 21 dentes humanos, sendo 5 com polpa viva (G1), 8 com necrose pulpar e sem lesão periapical visível radiograficamente (G2) e 8 necrose pulpar e lesão periapical crônica (G3). Após a exodontia, os dentes foram cuidadosamente lavados e fixados. Em seguida, os ápices radiculares foram seccionados e preparados para análise em Microscópio eletrônico de varredura (MEV). Não foram encontrados microrganismos na superfície externa apical dos grupos G1 e G2. No G3, ao lado do forame apical, foram encontradas áreas de reabsorção superficiais e profundas no cimento e, nestas áreas, havia grande quantidade de microrganismos tanto sozinhos quanto em associação. Houve presença de biofilme apical em todos os espécimes. Assim, o biofilme bacteriano apical é de grande relevância clínica, já que é bastante resistente aos agentes microbianos e não podem ser removidos apenas com o preparo biomecânico, podendo levar a falha do tratamento endodôntico.

Stanley e Lazazzera (2004) realizaram revisão de literatura visando estudar os sinais ambientais que afetam tanto o início

da formação do biofilme microbiano quanto à natureza estrutural do biofilme maduro. Eles observaram que os sinais regulatórios do ambiente induzem a formação do biofilme de maneiras diferentes de acordo com a espécie bacteriana, permitindo que cada espécie colonize o ambiente ideal com eficiência. Este estudo sugere que a viabilidade de nutrientes regula a profundidade do biofilme de maneira que a quantidade máxima de células presentes aparenta ocorrer em condições nutricionais reduzidas. Por outro lado, quando há um ambiente muito rico ou muito pobre em nutrientes, há um grande número de células em fase planctônica. Afirmaram ainda, que o amadurecimento do biofilme promove a formação de canais e estruturas similares a pilares que podem proporcionar uma eficiente chegada de nutrientes para as células que compõem esse biofilme.

Svensäter e Bergenholtz (2004) realizaram revisão de literatura visando mostrar desde o conceito de biofilme, seus estágios de formação e como ele pode ser aplicado às infecções endodônticas. Este estudo afirma que o conhecimento acumulado sobre o biofilme sugere que os organismos que crescem no mesmo, desenvolvem propriedades diferentes daquelas apresentadas no estado planctônico. Afirma ainda, que a organização em biofilmes proporciona proteção aos microrganismos residentes, tornando-os resistentes a influências nocivas incluindo agentes antimicrobianos. Assim, as condições em que os biofilmes ocorrem em infecções endodônticas e as medidas que devem ser tomadas para a sua erradicação, ainda não são bem compreendidas. Nessa revisão, foi apresentado o conceito de biofilme, e discutido como ele pode ser aplicado a infecções endodônticas.

George et al. (2005) analisaram em seu estudo a estrutura do biofilme bacteriano formado no interior do canal radicular e a penetração de *E. faecalis* nos túbulos dentinários, ambos em condições ambientais e nutricionais diferentes. Para isto, foram utilizados 48 molares superiores sem cáries que tiveram suas coroas seccionadas abaixo da



junção cimento-esmalte e o tamanho das raízes foi padronizado em 8 mm. Os espécimes foram instrumentados com limas k-file e irrigados com NaOCl 2,5% e EDTA 17%. Em seguida, foram divididos em 4 grupos contendo 8 dentes cada e quatro espécimes adicionais foram incluídas como controles em todos os grupos sob as mesmas condições de preparo com exceção da inoculação bacteriana. Os espécimes de todos os grupos foram inoculados com *E.faecalis* sob diferentes condições ambientais: G1) meio enriquecido com nutrientes em condições aeróbias; G2) meio enriquecido de nutrientes sob condições anaeróbias; G3) meio desprovido de nutrientes sob condições aeróbias; G4) meio desprovido de nutrientes sob condições anaeróbias. Os mesmos foram avaliados por um período de 21 dias. As análises foram realizadas através de microscópio eletrônico de varredura, confocal e de luz, e raios-x de energia dispersiva (EDX), focando na variação da estrutura do biofilme formado sob diferentes condições ambientais. Foi observado, por avaliação com o EDX, um aumento do nível de cálcio no G4 em relação à superfície de dentina. Este estudo mostrou que o desenvolvimento, a modificação de biofilme de *E. faecalis* e a profundidade de penetração nos túbulos dentinários foram mais evidentes nos grupos em que os meios eram enriquecidos.

Kishen et al. (2006) analisaram a interação entre o *E. faecalis* e a dentina radicular. Para esta análise, 40 dentes tiveram suas coroas seccionadas, foram instrumentados até a lima k 40 e divididos em dois grupos. Os dentes do grupo 1 foram seccionados verticalmente no plano médio-sagital, em seguida foram incubados com *E. faecalis* por períodos de 2, 4 e 6 semanas, sendo a composição química do biofilme formado determinada por difração de raios-x e espectroscopia transformadora infravermelha de Fourier (FTIR). Já os dentes do grupo 2 não foram seccionados, foram incubados com *E. faecalis* por 6 semanas e a topografia e ultraestrutura do biofilme foram analisadas por microscópio eletrônico de varredura (MEV), microscópio de luz e

microscópio de varredura laser confocal. Estes experimentos evidenciaram diferentes estágios de interação entre o *E. faecalis* e a dentina do canal radicular. No estágio 1, observou-se a formação do biofilme. No estágio 2, a bactéria induziu dissolução da fração mineral do substrato da dentina. No estágio 3, uma camada de precipitado de apatita foi formado na estrutura do biofilme maduro. Esta habilidade do *E. faecalis* formar biofilme calcificado pode ser um fator que contribui para sua persistência após o tratamento endodôntico.

Chávez de paz (2007) realizou uma revisão literária com a finalidade de apresentar evidências de que a origem de infecções endodônticas persistentes não depende da forma do microrganismo, mas sim da sua capacidade em adaptar-se a novas condições ambientais ocasionadas pelo tratamento endodôntico. Nesta revisão ele percebeu que mudanças no ambiente original, como o aumento do pH pelo hidróxido de cálcio ou o efeito de antimicrobianos, podem desencadear alterações genéticas que modificam as características das células bacterianas. A capacidade de se aderirem umas as outras e a uma superfície formando um biofilme é bom exemplo de adaptação das bactérias ao novo ambiente, fazendo com que a infecção permaneça no canal radicular, sendo assim uma das principais causas de insucesso do tratamento endodôntico. Tendo em vista o problema das infecções persistentes na endodontia, sugere-se que a ação individual de espécies bacterianas nestes casos é secundária comparada a capacidade de mudanças adaptativas provenientes de uma comunidade polimicrobiana de biofilmes em resposta a mudanças ambientais proporcionadas pelo tratamento endodôntico.

Carr et al. (2009) analisaram o terço apical de um caso clínico de molar inferior com insucesso do retratamento endodôntico causado pela presença de biofilme bacteriano. O paciente realizou o tratamento de canal há 10 anos e retornou ao consultório com dor espontânea e sensibilidade no dente em questão. Optou-se pelo

retratamento dos canais radiculares utilizando-se sistema rotatório e manual. Aproximadamente 2 anos após o retratamento dos canais radiculares, o paciente retornou com as mesmas queixas relatadas no início do retratamento. A lesão do canal distal regrediu, porém nos canais mesiais a mesma progrediu decidindo-se assim por fazer uma cirurgia periapical removendo-se o ápice dos canais mesiais que foram processados para a análise histológica através de microscópio de luz e eletrônico. Ao microscópio de luz foi possível observar a presença de istmo e canais laterais, porém nenhuma colônia de bactérias pode ser observada. Já ao microscópio eletrônico pode-se observar biofilme bacteriano em todos os cortes histológicos analisados. As comunidades de biofilme encontradas, não se apresentavam homogêneas, mas sim com grande variação de forma. A constatação da presença de comunidades de biofilme no terço apical da raiz, bem como a observação e o estudo da complexidade das mesmas, permite um melhor entendimento sobre as infecções bacterianas crônicas e o seu papel na falha do tratamento endodôntico.

Estrela et al. (2009) realizaram uma revisão de literatura visando fazer uma análise crítica da eficácia antimicrobiana de medicações intracanal em biofilmes bacterianos. Eles observaram que há contradições nos resultados dos estudos quanto essa eficácia, já que alguns mostram sucesso e outros falhas das substâncias antimicrobianas. Assim, são necessárias mais pesquisas sobre o assunto para confirmar se existe realmente alguma medicação eficaz no combate desta patologia que é uma das principais causas de insucesso do tratamento endodôntico.

Guo e Wang (2009) avaliaram os padrões da infecção microbiana localizada na superfície externa apical de dentes tratados e não tratados endodonticamente que estavam associados a periodontites apicais crônicas. Estudaram também, as espécies bacterianas presentes no biofilme, sua origem e constituição. Foram analisados 10 dentes, com

lesão periapical evidenciada por exame radiográfico, sendo 5 deles tratados e 5 não-tratados. Foram coletadas amostras microbianas dos canais radiculares. Os dentes analisados necessitaram ser extraídos. Após exodontia, parte dos dentes teve o terço apical seccionado e os outros foram preparados para análise do terço apical por microscópio eletrônico de varredura. Os resultados deste estudo mostraram que: as bactérias predominantes foram *P. micros* e *F. nucleatum*; dentre os dentes não tratados, apenas um apresentou bactérias próximo ao ápice radicular, sendo estas na forma de cocos, já nos dentes que foram tratados, foi observado um agregado bacteriano denso característico de biofilme, ao redor do forame apical, compostos principalmente por cocos e bastonetes. Assim, pode-se concluir que a presença do biofilme bacteriano apical é clinicamente importante e pode ser a causa de insucesso no tratamento endodôntico principalmente dos casos onde há infecções persistentes.

Ricucci e Siqueira Jr. (2010) propuseram avaliar a prevalência de biofilme bacteriano intraradicular e extraradicular em canais radiculares de dentes humanos tratados e não tratados endodonticamente evidenciados pela presença de lesão periapical através de análise histobacteriológica, bem como procurar possíveis associações entre biofilme e algumas condições clínicas como o tamanho da lesão periapical na radiografia e tipo de lesão periodontal apical através de análise histopatológica. Para isto, foram utilizadas 106 raízes ou pontas de raízes contendo a lesão periapical circundante que foram extraídas ou submetidas à cirurgia periapical. Em seguida as amostras foram preparadas para análise histológica. Os resultados mostraram que houve presença de bactéria em todos os espécimes avaliados. A presença de biofilme intraradicular na região apical das raízes foi observada em 82 das 106 (77%) raízes avaliadas. Os autores observaram ainda, que houve predominância de um tipo de bactéria nos biofilmes formados. Com relação ao tamanho radiográfico da lesão periradicular, foi

notado que 62% dos casos onde havia lesão pequena ( $\leq 5$  mm) havia também presença de biofilme e 82% onde havia lesão de grande diâmetro ( $> 5$  mm) havia também a presença de biofilme. Assim, o presente estudo constatou uma alta incidência de biofilme bacteriano no ápice de raízes com lesão periradicular.

## **2.2 Métodos utilizados para eliminar biofilme bacteriano radicular**

### **2.2.1 Substâncias químicas auxiliares e medicações intracanal**

A medicação intracanal mais utilizada mundialmente é o hidróxido de cálcio [ $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ], conhecido por possuir muitas propriedades consideradas ideais para uma medicação intracanal, com destaque para sua ação antimicrobiana proporcionada pelo seu elevado pH (Byström, 1985; Nerwich et al., 1993; Siqueira, Lopes, 1998).

Tronstad et al., 1981, avaliaram o pH dos tecidos dentais após a utilização do hidróxido de cálcio como medicação intracanal. Foram utilizados neste estudo, dentes de macaco com ápice aberto, semi-aberto e fechado; dentes reimplantados; dentes portadores de necrose pulpar com lesão periradicular evidente radiograficamente. Os canais radiculares foram instrumentados, utilizando-se NaOCl 1 %, sendo em seguida inserida pasta de hidróxido de cálcio como medicação intracanal. A mesma permaneceu por 4 semanas no interior dos canais radiculares. Após esse período os animais foram sacrificados e amostras foram obtidas para análise. Os resultados mostraram que tanto os dentes reimplantados quanto os não-reimplantados com formação radicular completa e medicados com hidróxido de cálcio apresentaram o pH da

dentina circumpulpar variando entre 8.0 a 11.1. Nos dentes com ápice aberto o pH da dentina variou entre 8.0 e 10.0. Nos dentes portadores de necrose pulpar onde não foi realizada a instrumentação do canal radicular o pH variou de 6.0 a 7.4. Pode-se observar neste estudo que o pH do cimento não foi influenciado pelo hidróxido de cálcio, entretanto nas áreas de reabsorção foi observado pH alcalino nas superfícies dentinárias expostas.

Byström e Sundqvist (1985) avaliaram clinicamente a ação antibacteriana do Hipoclorito de sódio (NaOCl) nas concentrações de 0,5% e 5% e do EDTA em canais radiculares infectados, submetidos ao tratamento endodôntico. Foram realizados 60 tratamentos endodônticos em dentes uniradiculados, portadores de necrose pulpar, cujas paredes da câmara pulpar apresentaram-se intactas e com evidências radiográficas de destruição óssea periapical. Os dentes foram divididos em 3 grupos, onde no primeiro foi utilizada irrigação com NaOCl 0,5%, no segundo NaOCl 5% e no terceiro foi intercalado NaOCl 5% e EDTA 15%. Os resultados mostraram que não houve diferença estatística entre as duas concentrações utilizadas da solução irrigadora, porém, a utilização do EDTA associado ao hipoclorito mostrou melhores resultados na eliminação de microrganismos. Este estudo evidenciou ainda, que as bactérias que sobreviveram à instrumentação e à ação dos agentes irrigantes aumentaram em número no período entre a análise dos resultados nos casos em que a medicação intracanal não foi utilizada.

Byström et al. (1985) avaliaram a eficácia bactericida do hidróxido de cálcio, do fenol canforado e do paramoclorfenol canforado utilizados como medicação intracanal. Foram utilizados 65 dentes uniradiculares, portadores de necrose pulpar, com as paredes da câmara pulpar intacta e com evidência radiográfica de lesão periapical. Em 35 dentes foi inserido o hidróxido de cálcio com auxílio do espiral lentulo, destes, 20 foram irrigados com NaOCl 0,5% e 15 com NaOCl 5%. Os outros 30 dentes foram irrigados com NaOCl 0,5%, sendo 15 deles

medicados com fenol canforado e 15 com paramonoclorofenol canforado. Em seguida, amostras bacteriológicas foram coletadas dos canais radiculares. A primeira coleta foi realizada após o preparo do canal radicular, a segunda foi realizada após 1 mês, nos dentes onde foi inserido o  $\text{Ca(OH)}_2$ , e após 2 semanas nos dentes em que foram inseridas as outras duas medicações, e a terceira foi realizada após 2 a 4 dias da remoção das medicações intracanal de todos os dentes. Para a análise dos resultados foi utilizada uma técnica bacteriológica capaz de detectar microrganismos anaeróbios presentes no interior do canal radicular, mesmo quando em pequenas quantidades. Este estudo mostrou que em apenas um caso dos 35 tratados com  $\text{Ca(OH)}_2$  apresentou reincidência de microrganismos. Já, quando foram utilizados paramoclorofenol canforado ou fenol canforado, 10 de 30 casos apresentaram reincidência de microrganismos. As bactérias predominantes eram anaeróbias e gram-positivas. Os resultados deste estudo mostraram que o tratamento endodôntico de dentes com polpas necrosadas portadores de lesão periapical pode ser finalizado após 2 sessões quando utiliza-se o hidróxido de cálcio como medicação intracanal.

Lima et al. (2001) avaliaram a eficácia de medicações alternativas na eliminação de biofilme de *E. faecalis*. Primeiramente foi induzida a formação de biofilme de *E. faecalis* de 1 e 3 dias em filtros de membranas de nitrato celulose. Essas membranas foram totalmente cobertas com 1 ml das seguinte substâncias: digluconato de clorexidina (CHX) 2% e natrosol; CHX 2% e sulfato de sódio lauril-dietileno-glicol-éter 1,25%; Clindamicina 2% e natrosol; Clindamicina 2%, sódio lauril-dietileno-glicol-éter 1,25% e natrosol; CHX 2%, óxido de zinco 15%, sódio lauril-dietileno-glicol-éter 1,25% e natrosol; Clindamicina 2%, Metronidazol 10%, sódio lauril-dietileno-glicol-éter 1,25% e natrosol. Todas as medicações encontravam-se na forma de gel e permaneceram em contato com o biofilme por o período de um dia a 37° C. Após esse período as amostras foram diluídas e plaqueadas em placas de ágar,

permanecendo por 48 h incubadas para posterior contagem de unidade formadora de colônias por ml (UFC/ml). Os resultados mostraram que a associação da clindamicina com o metronidazol reduziu significativamente o número de células bacterianas no biofilme de um dia. Entretanto, de todas as medicações testadas, apenas as medicações contendo clorexidina foram capazes de eliminar completamente os biofilmes de *E. faecalis* de 1 e 3 dias. Este estudo mostrou que a clorexidina gel pode exercer um importante papel na erradicação de infecções endodônticas persistentes.

Distel et al. (2002) propuseram em seu estudo avaliar a hipótese de que o *E. faecalis* forma biofilme no interior do canal radicular e que este resiste à ação das medicações intracanal (MIC) mais usuais e a infecção crônica do sistema de canais radiculares. Para isto foram utilizados 46 dentes anteriores superiores que foram instrumentados e em seguida montados em modelos de testes. As raízes, já montadas nos modelos de testes, foram divididas aleatoriamente em 4 grupos de acordo com as medicações intracanal utilizadas: G1) Ca(OH)<sub>2</sub> / metilcelulose; G2) pontas de Ca(OH)<sub>2</sub>; G3) controle positivo sem a presença de medicação; G4) controle negativo, onde os canais foram preenchidos com solução fisiológica. Os grupos 1, 2 e 3 foram inoculados com suspensão de *E. faecalis*. Os resultados foram analisados por meio de microscópio eletrônico de varredura (MEV) e Microscópio confocal Este estudo evidenciou que há presença de colonização de *E. faecalis* e formação de biofilme no interior dos canais radiculares mesmo com a presença de MIC.

Abudallah et al. (2005) investigaram e compararam a eficácia de substâncias irrigadoras e medicação intracanal sob *E. faecalis* em sua forma planctônica (suspensão ou pastilha) ou de biofilme. As substâncias química auxiliares e medicação intracanal avaliadas foram o NaOCl 3%, o Iodo polvidine 10%, o Gluconato de clorexidina 0,2%, o EDTA 17% e o hidróxido de cálcio pH 12,3. Cepas de *E. faecalis* foram



coletadas de canais radiculares infectados e cultivadas de maneira isolada ou em forma de biofilme, sendo em seguida, expostas às substâncias testadas por períodos de 1, 2, 4, 8, 15, 30 e 60 min. Uma solução de fosfato tamponada foi utilizada como controle. Verificou-se a eficácia de 100% do NaOCl sob todas as formas de *E.faecalis* após o período de exposição de 2 minutos. O hidróxido de cálcio eliminou 99,9% dos microrganismos após um período de 4 min de exposição.

Clegg et al. (2006) analisaram a eficácia antimicrobiana de soluções irrigadoras endodônticas sobre biofilmes multiespécies. Para isto, amostras de microrganismos foram coletadas de canais radiculares de 10 pacientes diagnosticados com necrose pulpar e periodontite apical crônica. Estas foram inoculadas em seções dos 5 mm apicais de 70 dentes uniradiculares para induzir a formação de biofilme polimicrobiano por 7 dias. Após a formação dos biofilmes, os mesmos foram expostos ao hipoclorito de sódio (NaOCl) 6%, 3 % e 1 %, a clorexidina 2% (CHX), ao NaOCl 1% seguido do BioPure MTAD e a solução de fosfato tamponada. A análise por microscópio eletrônico de varredura mostrou que o NaOCl 6% e 3% foram capazes de alterar e remover o biofilme, NaOCl 1% e NaOCl 1% seguido de irrigação com MTAD foram capazes apenas de alterar o biofilme e a CHX 2% não foi capaz de alterar o biofilme. Verificou-se que o NaOCl 6 % foi o agente antibacteriano mais efetivo no combate ao biofilme bacteriano.

Sena et al. (2006) avaliaram a ação do hipoclorito de sódio 2,5% e 5,25% e da Clorexidina 2%, gel e líquida, sob modelos de biofilme de sete monoespécies bacterianas: *E. faecalis*, *S. aureus*, *C. albicans*, *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *P. endodontalis* e *F. nucleatum*. Estes microrganismos foram induzidos a formarem biofilme em membranas de nitrato de celulose em meio ágar. Os biofilmes formados foram imersos nas substâncias químicas auxiliares avaliadas por períodos de tempo de 30 segundos e 5, 10, 15, 30 e 60 min, com e sem agitação mecânica. A solução salina foi utilizada como controle. Em seguida as

membranas foram transferidas para tubos contendo 2 ml de meio de cultura novo que foram agitados por 30 seg. Após, foi realizada diluição seriada, plaqueamento em ágar e incubação em condições adequadas para posterior contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/ml). Os resultados mostraram que a agitação do meio proporcionou efetividade antimicrobiana sob o biofilme em menor tempo na maioria das espécies avaliadas. Os agentes antimicrobianos na forma líquida, principalmente o NaOCl 5,25% e a clorexidina 2%, foram capazes de eliminar os microrganismos avaliados mais rapidamente (30 seg). Os autores concluíram que a agitação mecânica aumentou a ação antimicrobiana das substâncias químicas testadas nos modelos de biofilme.

Chai et al. (2007) propuseram avaliar a ação de seis grupos de antibióticos e do hidróxido de cálcio sob biofilme de *E. faecalis* em modelos de membranas filtradas de celulose. O biofilme de *E. faecalis* foi formado nos discos em um período de 48 horas, sendo em seguida, expostos, por uma hora, ao Hidróxido de cálcio p.a., ampicilina, à eritromicina, oxitetraciclina, co-trimoxazol, vancomicina, vancomicina seguida de sulfato de gentamicina e solução de fosfato tamponada (PBS) (grupo controle). Para cada medicação foram utilizados 5 discos e 1 disco foi utilizado como controle. Após o período de exposição, os discos foram lavados em PBS e foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) das bactérias viáveis remanescentes. Os resultados mostraram que apenas o hidróxido de cálcio, a eritromicina e a oxitetraciclina foram capazes de eliminar 100% do biofilme.

Ariaz-Moliz et al. (2009) avaliaram, em seu estudo, a concentração mínima necessária de soluções irrigadoras para a eliminação do biofilme bacteriano. Foram utilizados o NaOCl 0,1%, a CHX 4%, o EDTA 17% e os ácidos cítrico 25% e fosfórico 5% como agentes irrigantes que foram submetidas a diluições e permaneceram em contato com o biofilme de *E. faecalis* por períodos de tempo de 1, 5 e 10 min. Os resultados deste estudo evidenciaram que o NaOCl na

concentração de 0,00625% e no tempo de 1 min foi capaz de eliminar o biofilme de *E. faecalis*, seguido da CHX nas concentrações de 2 % ou mais, que eliminou o biofilme no tempo de 5 min. O EDTA e os ácidos cítrico e fosfórico não foram capazes de eliminar o biofilme. Desta forma conclui-se que o NaOCl foi a substância que apresentou-se mais eficaz na erradicação de biofilme bacteriano de *E. faecalis*.

Williamson et al. (2009) compararam o efeito bactericida de quatro formulações antimicrobianas sobre biofilmes de *E. faecalis* formados a partir de cepas coletadas de canal radicular, que apresentou insucesso ao tratamento endodôntico e possuía lesão periapical. As soluções irrigadoras avaliadas foram: hipoclorito de sódio 6% (NaOCl), clorexidina 2% (CHX), CHX 2% com modificadores de superfície (CHX-plus), NaOCl 6% com modificadores de superfície (Chlor-XTRA) e solução salina estéril (grupo controle). Estas soluções permaneceram em contato com as amostras por períodos de tempo de 1, 3 e 5 min. Dentre as substâncias avaliadas, aquelas que continham o NaOCl (NaOCl 6% e Chlor-XTRA) apresentaram resultados superiores, quanto a eliminação do biofilme, em relação aos grupos que continham CHX, porém todas as formulações antimicrobianas testadas exibiram atividade bactericida significativa sobre o biofilme de *E. faecalis*.

Delgado et al. (2010) testaram se a clorexidina, sozinha ou associada ao hidróxido de cálcio, era capaz de eliminar completamente *E. faecalis*. Para isto, foram utilizados 60 dentes humanos extraídos e expostos a cepas de *E. faecalis* por 21 dias. Após este período, os dentes foram irrigados com solução salina e secos com cones de papel absorventes. Em seguida, os espécimes foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos (n=15), de acordo com a medicação intracanal inserida:  $\text{Ca(OH)}_2$ , clorexidina gel 2 %,  $\text{Ca(OH)}_2$  com clorexidina gel 2% e solução salina (grupo controle negativo). Os dentes foram então colocados em placas petri e cobertos com gaze estéril úmida por 14 dias. Ao fim deste período, os mesmos foram irrigados com ácido cítrico 0,5%

(grupos  $\text{Ca(OH)}_2$ ), Tween 80 0,5% (Clorexidina gel 2% e  $\text{Ca(OH)}_2$  com clorexidina gel 2%) e solução salina, como irrigação final para todos os grupos. Em seguida, foram coletadas amostras de dentina, utilizando-se alargadores Gates Gliden, com profundidades de 0 a 100  $\mu\text{m}$  e 100 a 200  $\mu\text{m}$ , onde foram avaliadas a contagem de UFC/mL e a viabilidade bacteriana, utilizando-se o microscópio de fluorescência. Este estudo mostrou que houve grande diminuição no número e na viabilidade de microrganismos com a utilização de todas as medicações. Porém, a clorexidina sozinha ou associada ao  $\text{Ca(OH)}_2$  apresentou maior efetividade contra *E. faecalis* que o  $\text{Ca(OH)}_2$ .

Baca et al. (2011) realizaram estudo com o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana residual e a capacidade de eliminar biofilme de *E. faecalis* de várias soluções irrigadoras utilizadas sozinhas ou associadas. Para isto, foram utilizadas como soluções irrigadoras o hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5%, a Clorexidina (CHX) 2%, Cetrimida (CTR) 0,2% ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 17%, Ácido maleico (MA) 7%, e as associações entre NaOCl 2,5% seguida de irrigação com EDTA ou MA, e NaOCl 2,5% seguida de irrigação primeiramente com EDTA ou MA e posteriormente CTR ou CHX. Este estudo evidenciou que as soluções irrigadoras mais efetivas na eliminação de biofilme de *E. faecalis* foram no NaOCl e o CTR. Entretanto, CHX e CTR, utilizadas sozinhas ou como soluções irrigadoras finais, mostraram-se mais efetivas quanto à inibição da formação do biofilme de *E. faecalis* devido à sua ação residual.

Ariaz-molis et al. (2011) propuseram avaliar, por meio de ensaios com vários períodos de tempo de exposição, a eficácia do cetramide e da clorexidina, sozinhas ou em associação, para eliminar biofilme de *E. faecalis*. Os biofilmes cresceram no dispositivo MBEC–alto-rendimento por 24 h e foram expostos às soluções irrigadoras, diluídas em séries, por períodos de tempo de 30 seg, 1 e 2 min. O cetramide foi capaz de erradicar o biofilme de *E. faecalis* nas concentrações de 0,5%

em 30 seg, 0,0312% em 1 min e 0,0078% em 2 min. Já a clorexidina não conseguiu eliminar o biofilme em nenhuma das concentrações avaliadas (4% foi a concentração máxima). A associação de cetramide, nas concentrações de 0,1% e 0,05%, com a clorexidina, em qualquer concentração, foi capaz de eliminar o biofilme em todos os períodos de tempo avaliados. Este estudo mostrou que a associação do cetramide com a clorexidina pode proporcionar melhores resultados do que a utilização destas substâncias sozinhas. Além disto, a forma de aplicação alternada das substâncias aparentou ser mais eficaz que a combinação destes.

Shen et al. (2011) avaliaram a susceptibilidade de biofilmes bacterianos multiespécies, em diferentes fases de crescimento, a soluções irrigadoras utilizadas no tratamento endodôntico. Inicialmente, foi induzida a formação do biofilme bacteriano em discos de hidroxiapatita por períodos de 2 dias, 1, 2, 3, 6 e 12 semanas. Em seguida, estes biofilmes foram expostos às soluções irrigadoras clorexidina 2% (CHX) e CHX-Plus (clorexidina com modificadores de superfície) por 1, 3 ou 10 min. A espessura de cada período de tempo de formação dos biofilmes foi avaliada por meio de microscópio eletrônico de varredura. A análise da relação entre a solução irrigadora utilizada e a morte dos microrganismos foi analisada utilizando-se o microscópio de varredura laser confocal. Observou-se que os biofilmes maduros e os que foram privados de nutrientes, apresentaram-se mais resistentes à CHX que os biofilmes mais jovens e providos de nutrientes. Entretanto, o CHX-Plus mostrou-se eficiente no combate ao biofilme maduro e desprovido de nutrientes nos períodos de 3 e 10 min. Quanto à espessura, foi observado um aumento seguindo o processo de desenvolvimento do biofilme. Assim, é muito importante padronizar nos estudos a idade e o estágio nutricional do biofilme quando for comparar a ação de diferentes agente microbianos.

Du et al. (2012) avaliaram a atividade antibacteriana do plasma em não-equilíbrio da pressão atmosférica (APNPs) na remoção de

biofilme intraradicular de *E. faecalis* durante o tratamento endodôntico. Foram utilizadas 96 raízes de dentes humanos extraídos, que foram instrumentadas com o sistema Pro-Taper. Primeiramente os biofilmes foram formados em lamínulas estéreis inseridas em poços de placas de cultura de 12 poços, contendo caldo BHI com *E. faecalis*. Eles foram expostos ao APNPs e a clorexidina 2% por 5 min e a viabilidade do biofilme bacteriano foi observada por microscópio de varredura laser confocal e coloração das lamínulas. Em seguida as raízes foram expostas às mesmas substâncias por tempos de 5, 10 e 15 min. Após o tratamento os canais foram lavados com caldo BHI por 1 min, e este caldo foi coletado para a análise microbiológica. A análise das lamínulas e dos canais radiculares por meio de microscopia confocal, mostrou que houve redução significativa dos microrganismos viáveis no biofilme tanto com a utilização do APNPs quanto da clorexidina e que houve maior redução das bactérias com o aumento do período de exposição. A análise por meio da tomografia computadorizada evidenciou que a redução bacteriana ocorreu em todo o sistema de canais radiculares. Desta forma, o APNPs pode ser uma substância efetiva no auxílio ao combate do biofilme de *E. faecalis* presente no sistema de canais radiculares.

Persoon et al. (2012) realizaram estudo com objetivo de avaliar a eficácia antimicrobiana dos produtos de reação da cloroperoxidase de Vanádio (VCPO) sobre biofilmes de *E. faecalis* formados a partir de 4 cepas diferentes em um período de 24 h. Estes biofilmes foram incubados com VCPO, sais haloides (brometo ou cloreto) e peróxido de hidrogênio. O efeito antimicrobiano foi analisado por meio de contagem de unidade formadora de colônias (UFC), e foi verificado que os produtos de reação do VPCO apresentaram efeito similar na redução da viabilidade das 4 cepas de *E. faecalis*. Assim, estes produtos podem ser uma alternativa ao tratamento endodôntico tradicional para alcançar uma completa inativação do biofilme no sistema de canais radiculares.

Saber e EL-Hady (2012) desenvolveram biofilme maduro de *E. faecalis*, no interior de canais radiculares e testaram sua susceptibilidade à algumas medicações intracanal. Cento e quarenta e oito pré-molares inferiores uniradiculares humanos foram instrumentados com pro-taper universal, utilizando-se NaOCl 2,5% como substância química auxiliar. Em seguida, os dentes foram inoculados com suspensão de *E. faecalis* e permaneceram incubados por 30 dias, havendo a troca do caldo a cada 72 h. Os dentes foram divididos em cinco grupos de acordo com a medicação intracanal a ser utilizada: amoxicilina e clavulanato, ciprofloxacina, clindamicina, doxiciclina e pasta de hidróxido de cálcio. As medicações permaneceram por uma semana no interior dos canais radiculares. Amostras bacterianas foram coletadas e plaqueadas para posterior contagem de unidade formadora de colônias (UFC). A observação em microscópio eletrônico de varredura confirmou o crescimento do biofilme bacteriano. Notou-se que todos os agentes quimioterapêuticos foram superiores ao hidróxido de cálcio em eliminar o biofilme, tendo destaque para a amoxicilina com clavulanato, ciprofloxacina e clindamicina. Assim, a utilização de agentes antimicrobianos pode ser benéfica em casos de periodontite apical resistente, mas apenas após a realização de teste microbiológico para saber qual o antimicrobiano apropriado.

### 2.2.2 *Zingiber officinalis*

Os produtos fitoterápicos vêm sendo bastante estudados na área de saúde como alternativa a tratamentos convencionais (Prabhakar et al., 2010; Lantz et al., 2007). O *zingiber officinale* (gengibre) é largamente aplicado como condimento em comidas e bebidas no mundo

todo, além de ser utilizado na tradicional medicina chinesa (Lin et al., 2010). Ele é indicado para o tratamento da artrite, reumatismo, doenças infecciosas, dores musculares, resfriados, febre, dentre várias outras patologias tratadas pela medicina popular desde os tempos mais antigos (Grégio et al., 2006; Afzal et al., 2001; Chrubasik et al., 2005; Ali et al., 2008). Os gingeróis são os maiores constituintes frescos do rizoma do gengibre responsáveis pelos efeitos analgésicos, antipirético, atividade anti-hepatotóxica, antinauseante e anti-inflamatória (Grégio et al., 2006).

Lantz et al. (2007) estudaram as propriedades anti-inflamatórias dos componentes do gengibre e verificaram que o gingerol e o shogaol foram capazes de minimizar o processo inflamatório já que diminuíram significativamente a produção de prostaglandinas E2, que foram liberadas por indução de LPS provenientes da *Escherichia coli*. Observou-se também que os extratos que continham principalmente o gingerol apresentaram capacidade de inibir a produção de COX-2.

A literatura relata que dentre as várias ações do gengibre, tem destaque as ações antibióticas e anti-inflamatórias e cicatrizantes (Afzal et al., 2001; Chrubasik et al., 2005; Grégio et al., 2006 Kim et al., 2007; Fouda, Berika, 2009). Devido a estas propriedades, sugere-se a sua utilização na endodontia como um potencial agente irrigante e medicação intracanal. O gengibre ainda é pouco estudado na odontologia, porém, os estudos realizados nessa área tem mostrado resultados promissores.

Aguiar et al. (2009) avaliaram a eficácia antimicrobiana do extrato glicólico de gengibre e do hipoclorito de sódio, como agentes irrigante, sobre *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e sua endotoxina . Os resultados mostraram que o gengibre conseguiu reduzir significativamente as bactérias avaliadas e apresentou atividade antifúngica excelente, conseguindo eliminar a *C. albicans* por completo do interior dos canais radiculares.



Tendo em vista a diversidade de estudos focados nas propriedades terapêuticas do gengibre principalmente nas suas ações bactericida e anti-inflamatória, esse medicamento tende a ser uma alternativa promissora de substância irrigadora no tratamento endodôntico, como mostram alguns estudos realizados in vivo nesta instituição (Aguiar et al., 2009; Cardoso et al., 2010; Chung et al., 2010; Maekawa et al., 2010).

Cardoso et al. (2010) realizaram estudo in vivo, onde avaliaram a ação antimicrobiana do extrato glicólico de gengibre como solução irrigadora e medicação intracanal sobre *E. faecalis*, *C. albicans*, *E. coli* e suas endotoxinas. Foram selecionados dez dentes com insucesso no tratamento endodôntico e portadores de lesão periapical. Estes foram submetidos ao retratamento endodôntico utilizando-se o extrato glicólico de gengibre e o hipoclorito de sódio como soluções irrigadoras. Coletas foram realizadas após a remoção de toda a gutapercha e cimento endodôntico, logo após a instrumentação do sistema de canais radiculares e após 14 dias da inserção da medicação intracanal. Este estudo mostrou que houve boa atividade antimicrobiana do gengibre, sendo inclusive, capaz de reduzir significativamente tanto o número bactérias quanto de endotoxinas, entretanto, não foi capaz de neutralizar as endotoxinas completamente.

No estudo de Chung et al. (2010) que utilizou metodologia similar ao de Cardoso et al., porém avaliou ação antimicrobiana do extrato glicólico de gengibre apenas como medicação intracanal utilizando o hipoclorito de sódio como solução irrigadora. Observou-se também que houve redução microbiana e de endotoxinas nos canais radiculares.

Maekawa (2010) avaliou a ação da associação do hidróxido de cálcio com os extratos de gengibre e o própolis sobre microrganismos e endotoxinas e raízes de dentes humanos extraídos, mostrando que os dois fitoterápicos apresentaram-se eficazes na

eliminação tanto de microrganismos quanto de endotoxina quando associados ao hidróxido de cálcio.

Gulve e Gulve (2010) realizaram estudo com o objetivo de comparar a eficácia antimicrobiana do extrato de gengibre e do hipoclorito de sódio 2% contra *Enterococcus faecalis* através do método de difusão em ágar. Foram preparadas 6 placas de ágar Mueller-Hinton contendo três poços circulares de 4 mm de profundidade e 8 mm de diâmetro onde foram inoculadas cepas de *E. faecalis*. Em seguida, foram inseridos em cada poço o extrato de gengibre, o hipoclorito de sódio 2% e o solvente dietil-éster, utilizado para a extração do gengibre (controle). Observou-se que o extrato de gengibre apresentou maior halo de inibição de crescimento microbiano, mostrando efeito antibacteriano sobre *E. faecalis* superior ao hipoclorito de sódio.

A literatura apresentada mostra que um dos desafios da endodontia continua sendo a eliminação do biofilme bacteriano. Além disto, os resultados promissores do *Zingiber officinale* em pesquisas anteriores mostram a necessidade de estudá-lo na eliminação do biofilme.

## PROPOSIÇÃO

O presente estudo tem como objetivo avaliar a ação de diferentes medicações intracanal sobre biofilme de *Enterococcus faecalis* formado nas áreas de reabsorção apical externa de dentes humanos extraídos. Foram avaliadas as seguintes medicações intracanaís:

- a) Hidróxido de cálcio [Ca (OH)<sub>2</sub>] + Soro;
- b) Clorexidina gel 2% (CHX);
- c) Ca (OH)<sub>2</sub> + CHX;
- d) Ca (OH)<sub>2</sub> + gengibre (GEN);
- e) Gengibre (GEN);
- f) Solução Salina Fisiológica (SS)

Todas as avaliações foram realizadas pelo método de cultivo microbiológico após o período de ação das medicações intracanal, e por Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) dos ápices radiculares.

## **MATERIAL E MÉTODO**

Este trabalho foi enviado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – FOSJC/UNESP (Anexo A).

### **4.1. Seleção dos dentes**

#### **4.1.1 Preparo prévio**

Foram utilizadas 90 raízes de dentes humanos portadores de reabsorção externa apical. Os dentes foram extraídos por indicação cirúrgica e ficaram armazenados em solução de formol a 10 % por um período de 48 horas, sendo em seguida colocados em solução de hipoclorito de sódio 1 %, por 24 (vinte e quatro) horas, com a finalidade de promover a dissolução de restos teciduais aderidos às superfícies dentárias. Logo após, foram lavados e escovados em água corrente para promover a total remoção de remanescentes teciduais e da solução de hipoclorito de sódio. Em seguida foram secos e esterilizados em autoclave.

#### 4.1.2. Critérios para seleção das raízes

As 90 raízes utilizadas foram provenientes de dentes humanos extraídos por motivos diversos na clínica de cirurgia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos / UNESP (n=90). Estas raízes apresentaram:

- a) Áreas de cavitação na região apical da raiz caracterizando reabsorção apical externa;
- b) Apenas um canal radicular;
- c) Completa formação radicular;
- d) Diâmetro semelhante dos canais radiculares e forame apical;
- e) Não possuíam tratamento endodôntico prévio

Foram descartados do estudo dentes em que não foi possível o acesso a toda extensão do canal radicular.

#### 4.2 Preparo das raízes

O preparo das raízes foi realizado no laboratório de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP. Os dentes tiveram suas raízes analisadas sob lupa esteriomicroscópica (Zeiss Stemi 2000-C), com aumento de 5X (figura 1), para verificar se havia presença de erosões ao redor do forame apical, caracterizando reabsorção externa nessa região. Após esta prévia seleção, os dentes tiveram suas coroas clínicas seccionadas no nível da junção cimento-esmalte, com o auxílio de disco de carborundum inserido

na peça de mão, ficando as raízes com um comprimento padronizado  $13 \pm 0,5$  mm. Estas foram distribuídas aleatoriamente entre os grupos experimentais.



Figura 1 – Imagem da reabsorção apical externa com aumento de 5 vezes em lupa esteriomicroscópica.

Limas tipo K número 10, foram introduzidas no interior dos canais radiculares até alcançar o forame apical. Após, foi realizada a limpeza foraminal com o auxílio de limas tipo K número 15 e 20. Em seguida, o comprimento de trabalho (CT) foi obtido reduzindo-se 1mm do comprimento que a lima apresentou ao chegar até o forame apical, e este comprimento foi adotado para todo o resto do preparo químico-mecânico. A técnica de preparo dos canais radiculares utilizada foi a técnica Coroa-ápice utilizando para isto, alargadores Gates-Gliden (GG) números 5, 4, 3 e 2 e o sistema rotatório Mtwo na sequência 10/.04, 15/.05, 20/.06, 25/.06, 30/.05, 35/.04, 40/.04, 25/.07, segundo instruções do fabricante. Após a utilização do sistema rotatório foi utilizada lima tipo Kerr nº 40 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) para confirmação do batente apical.

Durante todo preparo os canais foram irrigados abundantemente com 5 ml de solução de NaOCl 1% a cada troca de instrumento. Ao final do preparo, os canais foram irrigados com solução de EDTA 17% (Inodon Ind. Edit. Impe Exp. De Produtos Odontológicos, Porto Alegre, RS, Brazil) por 3 minutos sendo a solução agitada com o auxílio de uma lima tipo Kerr nº 20. Posteriormente, as raízes foram irrigadas com 5 ml de soro fisiológico para neutralizar e remover o EDTA e os resíduos produzidos durante a instrumentação. Em seguida os canais foram secos com cones de papel e montados em placas de cultura celular de 24 poços (Costar, New York, NY, USA).

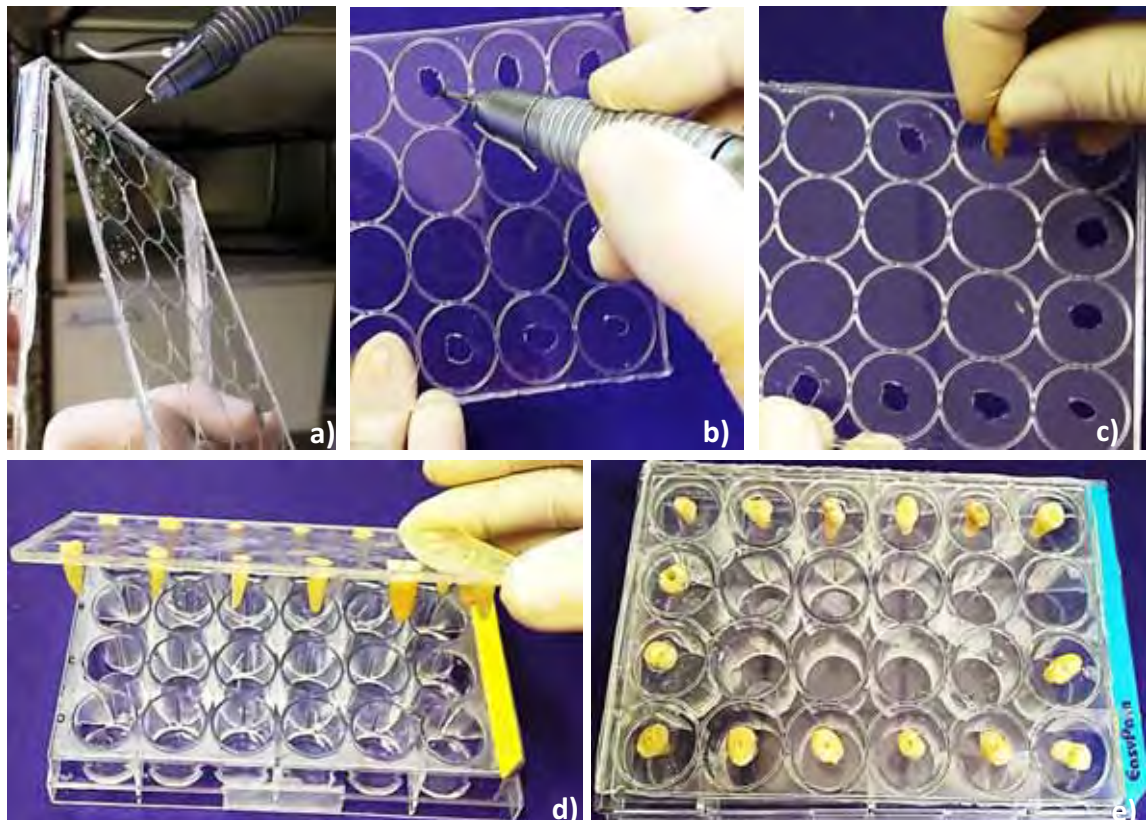
#### **4.3 Montagem das raízes nas placas de 24 poços**

As raízes foram distribuídas aleatoriamente em placas de cultura celular de 24 poços (Costar, New York, NY, USA), contendo 15 espécimes em cada placa.

Para a montagem de cada placa do experimento foram utilizadas duas placas de cultura celular de 24 poços. Com o auxílio de uma broca de prótese montada em contra-ângulo a tampa de uma das placas teve suas bordas seccionadas formando uma plataforma para o suporte das raízes (Figura 2). Nesta tampa modificada, foram confeccionados orifícios nos círculos equivalentes a cada poço, com o auxílio da mesma broca utilizada para cortar as bordas da tampa, e estes foram ampliados até que a raiz ficasse devidamente encaixada (Figura 2). Este procedimento foi realizado para todas as raízes.

Após o encaixe de todas as raízes na tampa modificada, esta foi colocada sobre os poços e foi vedada com a tampa de uma nova placa de cultura de células de 24 poços.

Foi montado um total de 6 placas, estas foram enviadas para esterilização por radiação gama com cobalto 60 (20 KGy por 6 h), já que o plástico deforma com esterilização por autoclave ou estufa.



Figuras 2 – Preparo da placa para o experimento: a) Imagem da secção das bordas da tampa da placa de cultura de células de 24 poços b) Confeção dos orifícios c) Encaixe das raízes nos orifícios d) Raízes encaixadas nos orifícios confeccionados na tampa modificada e) Placa montadas com 15 raízes.



#### 4.4 Divisão dos grupos experimentais

Após o preparo dos canais, as raízes foram divididas aleatoriamente em 6 grupos experimentais de acordo com a medicação intracanal que foi utilizada:

- HC - 15 raízes medicadas com hidróxido de cálcio e solução salina fisiológica;
- HC/CHX - 15 raízes medicadas com hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2%;
- HC/GEN - 15 raízes medicadas com hidróxido de cálcio e extrato glicólico de gengibre 20%;
- CHX - 15 raízes medicadas apenas com clorexidina gel 2%;
- GEN - 15 raízes medicadas apenas com extrato glicólico de gengibre 20%;
- SS - 15 raízes com solução fisiológica (controle positivo).

#### 4.5 Formação do biofilme apical

Após o preparo dos canais, as raízes foram submetidas à formação de biofilme apical por *E. faecalis in vitro* utilizando placas de cultura de células de 24 poços (Costar Corning, Nova York, EUA). Todos os procedimentos microbiológicos foram realizados na câmara de fluxo laminar utilizando instrumentais e materiais previamente esterilizados.

A partir da cepa padrão de *E. faecales* (ATCC 29212), foi preparada uma suspensão padronizada contendo  $10^6$  células/mL. Para o preparo dessa suspensão, a cepa de *E. faecalis* foi cultivada em ágar

Infuso Cérebro Coração (Brain Heart Infusion – BHI, Difco, Detroit, EUA) e mantida em estufa microbiológica a  $37^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$  por 48 horas. A partir do crescimento nas placas, foram preparadas suspensões em soro fisiológico estéril (Segmenta, Ribeirão Preto, SP, Brasil), comprovadas pela leitura em espectrofotômetro (modelo B-582, Micronal S/A, São Paulo, SP, Brasil) com comprimento de onda de 760 nm e densidade óptica de 0,298 (Figura 3).



Figura 3 – Espectrofotômetro utilizado e especificações da fotometria.

Em ambiente estéril (câmara de fluxo laminar) (VecoFlow Ltda. – Campinas, SP, Brasil), foram inseridos 1600  $\mu\text{L}$  de Caldo Infuso Cérebro Coração (BHI) com sacarose 5% e 200  $\mu\text{L}$  da suspensão de *E. faecalis*, previamente padronizada, em 15 poços de uma placa de cultura de células de 24 poços nova (Figura 4 a). Em seguida, a tampa modificada contendo as raízes foi colocada sobre esta placa com auxílio de duas pinças clínicas estéreis, de maneira que aproximadamente 3 mm do terço apical de cada raiz mantivesse contato com o líquido presente nos poços induzindo assim a formação do biofilme apical (Figura 4b,c). As placas foram vedadas com as respectivas tampas e fita crepe, e então foram incubadas em incubadora Shaker a  $37^{\circ} \text{C}$  por 10 dias em agitação a 75 rpm (Quimis, Diadema, SP, São Paulo). A cada 48 horas o caldo BHI

mais sacarose 5% era trocado. A troca do caldo foi realizada inserindo-se 1800  $\mu$ L desta solução em 15 poços de uma nova placa de cultura de células de 24 poços e transferindo, com auxílio de pinças clínicas, a tampa modificada contendo os dentes, para a nova placa. O tempo utilizado para a formação do biofilme foi escolhido baseado na metodologia utilizada estudo piloto prévio (figura 5).

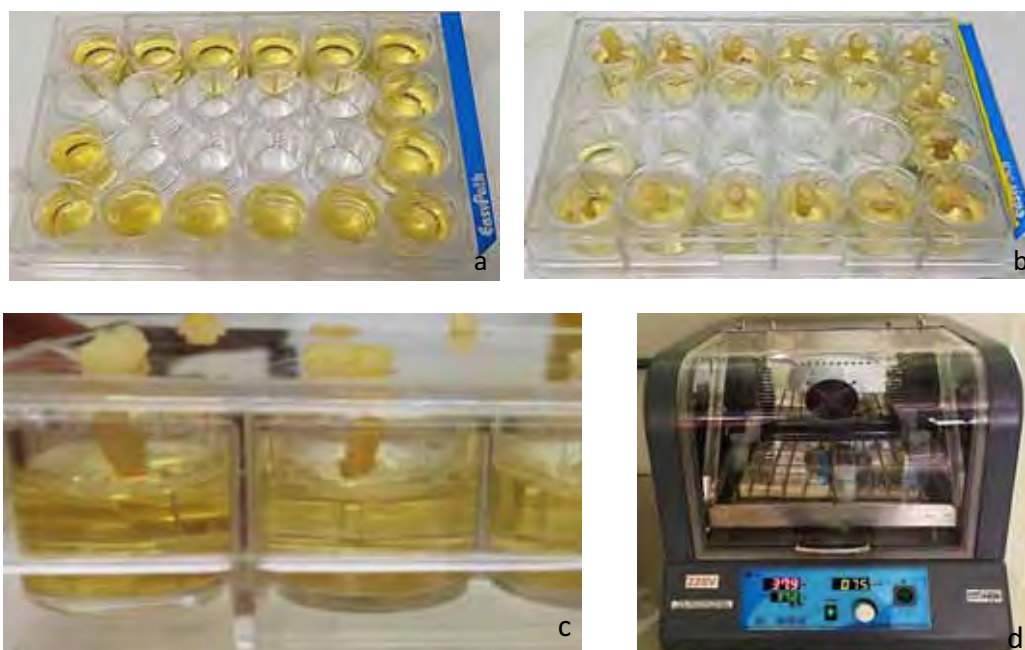


Figura 4 – Indução à formação do biofilme de *E. faecalis* na região apical das raízes; a) Inserção de 1600  $\mu$ L de Caldo BHI com sacarose 5% e 200  $\mu$ L da suspensão de *E. faecalis* previamente padronizada; b) tampa modificada contendo as raízes posicionadas nos poços contendo a suspensão de *E. faecalis*; c) aproximadamente 3mm apicais das raízes em contato com o caldo contendo a suspensão de *E. faecalis*; d) Incubadora Shaker.

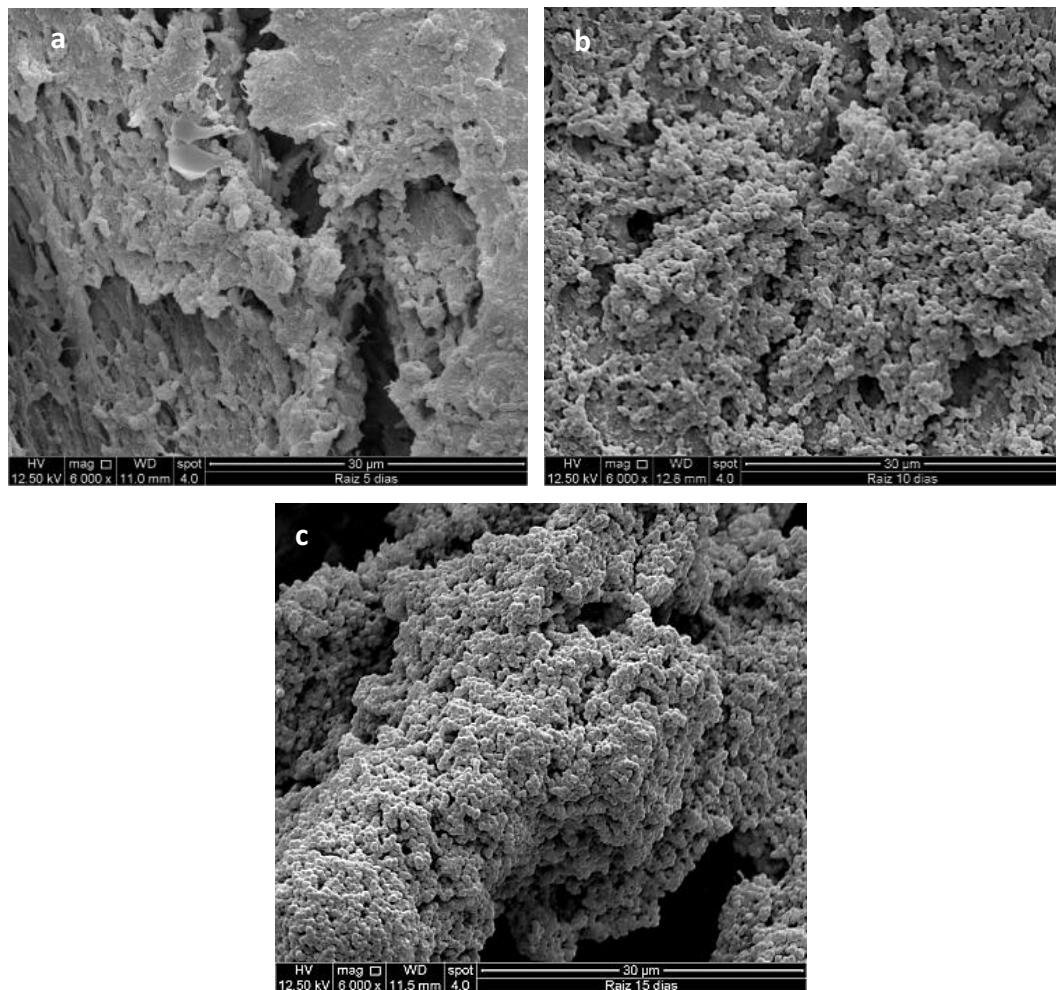


Figura 5 – Avaliação da formação de biofilme apical através de microscópio eletrônico de varredura: a) Biofilme formado em 5 dias; b) Biofilme formado em 10 dias; c) Biofilme formado em 15 dias

Após o período de incubação, as raízes foram transferidas com auxílio de duas pinças clínicas estéreis para uma nova placa de 24 poços contendo solução fisiológica tampão fosfato a 10% (PBS) para remoção das células não aderidas (Figura 6). Essa lavagem em PBS foi realizada duas vezes. A seguir, as raízes foram transferidas para uma nova placa de cultura de células de 24 poços vazia, onde cada uma foi irrigada com 5 ml de solução salina fisiológica estéril, seca com seringa de aspiração e cones de papel estéril, e foram inseridas as medicações

intracanal referentes a cada grupo. Após, as mesmas foram transferidas para uma nova placa de cultura de células de 24 poços contendo 1800  $\mu\text{L}$  de Caldo Infuso Cérebro Coração (BHI) em 15 poços.

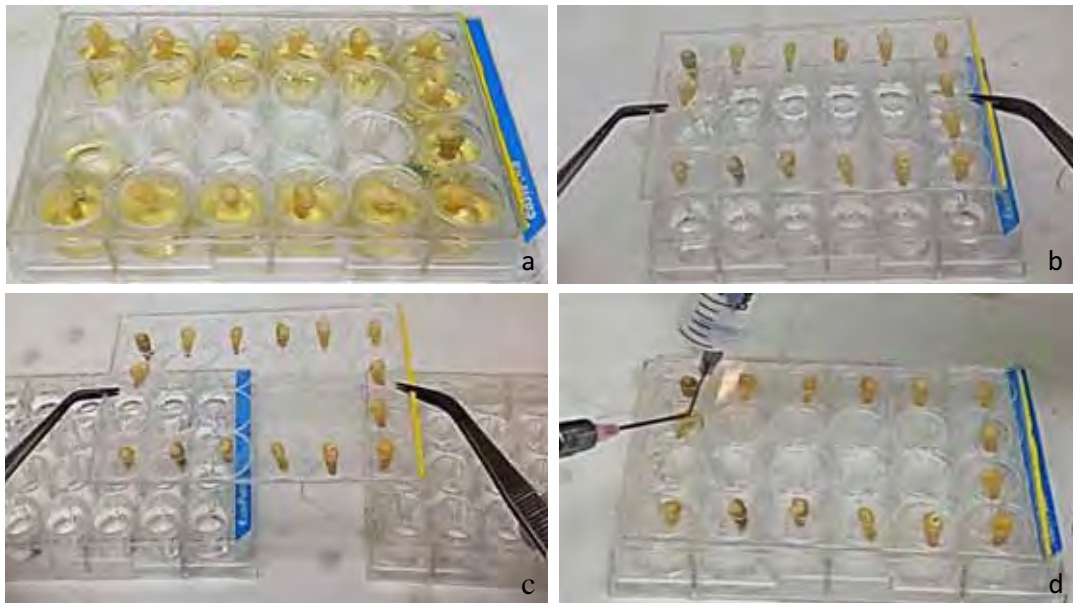


Figura 6 – a) Raízes em caldo BHI com suspensão de *E.faecalis*; b) Transferência das raízes para solução de PSB 10%; c) Transferência das raízes para placa de cultura de 24 poços nova e vazia; d) Irrigação das raízes com 5 mL de Solução salina fisiológica.

#### 4.6 Medicação intracanal

A medicação intracanal foi realizada conforme os grupos experimentais descritos no item 4.3. A medicação hidróxido de cálcio + soro fisiológico foi realizada na proporção de 0,1 g de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  para 100  $\mu\text{l}$  de soro fisiológico (Figura 7); a associação de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  + Clorexidina gel 2 % foi realizada na proporção de 1:1 em volume (Figura 8), na consistência de pasta de dente (Gomes *et al.*, 2006; Valera *et al.*, 2010);

a medicação hidróxido de cálcio + Gengibre foi realizada na proporção de 0,1 g de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  para 100  $\mu\text{l}$  de extrato glicólico de gengibre 20% (Figura 9) e foram inseridas com o auxílio de limas tipo Kerr. Já as medicações GEN, CHX e Soro fisiológico foram inseridas nos canais com auxílio de seringas de 1ml (Injex Indústrias Cirúrgicas Ltda., Ourinhos, SP, Brasil) até o completo preenchimento dos canais radiculares. Após a inserção da medicação no interior dos canais radiculares, foi colocada uma bolinha de algodão estéril na entrada de cada canal.



Figura 7 – a)  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  e soro fisiológico e suas proporções; b) Inserção da MIC no canal radicular com auxílio de lima tipo K#20.



Figura 8 – a)  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  e CHX em iguais proporções; b) Inserção da MIC no canal radicular com auxílio de lima tipo K#20.

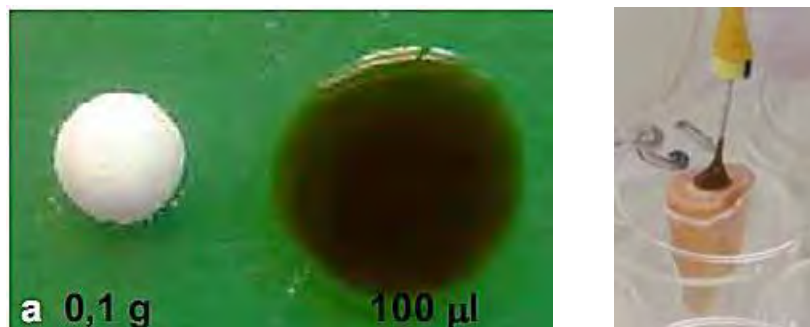


Figura 9 – a)  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  e GEN e suas proporções; b) Inserção da MIC no canal radicular com auxílio de lima tipo K#20.

Após a inserção da medicação, as placas de 24 poços foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por um período de 15 (quinze) dias. A cada 48 horas, as raízes foram transferidas para uma nova placa de cultura de células contendo caldo BHI. Passado o período de 15 dias os canais foram irrigados com 5 ml de solução salina fisiológica utilizando seringas estéreis de 5 ml e agulhas (25X7) (Injex Indústrias Cirúrgicas Ltda., Ourinhos, SP, Brasil) e a aspiração foi realizada com bomba à vácuo (NSR, Indústria, Comércio e Representações Ltda.), intermediários e agulhas (40X12) (Nipro Medical Ltda., Sorocaba, SP, Brasil).

#### 4.7 Análise microbiológica por UFC/ml

Após 15 dias de incubação, as raízes foram lavadas duas vezes com PBS. Em seguida, foram escolhidas aleatoriamente 12 raízes para avaliação de unidade formadora de colônias por ml. Cada espécime foi colocado em tubos Falcon contendo 10 mL de solução de PBS 10% esterilizada. As raízes foram homogeneizadas por 30 segundos, utilizando

homogeneizador ultrassônico (Sonoplus HD 2200, Bandelin Eletronic) com potência de 25 W para promover a dispersão das bactérias do biofilme (figura 10). A partir da solução obtida ( $10^{-1}$ ), foram realizadas diluições decimais ( $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ) da suspensão do biofilme de cada raiz, das quais alíquotas de 100  $\mu$ L foram semeadas em placas de Petri em duplicata contendo Ágar Infuso Cérebro-Coração (Brain Heart Infusion – Difco, Detroit, EUA).

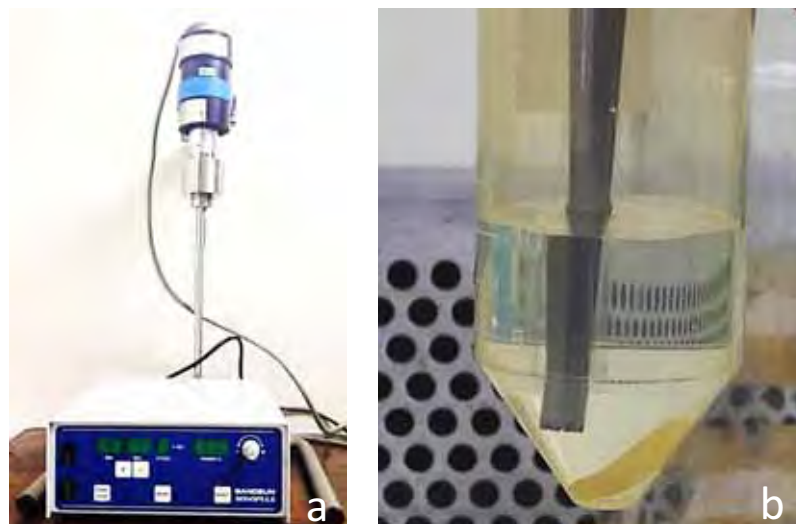


Figura 10 – Processo de sonicção das raízes para análise microbiológica: a) homogeneizador ultrassônico; b) tubo falcon contendo 10 ml de PBS 10% e a raiz a ser sonicada.

As placas de petri foram incubadas em estufa a 37° C por 48 horas. A seguir, as placas foram contadas para o cálculo de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL).



#### **4.8 Análise estatística**

Foi realizada contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/ml) de cada raiz fazendo-se uma média avaliada estatisticamente pelos testes de análise de variância ANOVA e Tukey.

#### **4.9 Análise por Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)**

Foram escolhidas aleatoriamente 3 raízes de cada grupo para análise pelo MEV. As mesmas foram fixadas, em solução de glutaraldeído a 2,5% durante 2 horas. Após a fixação, os espécimes foram desidratados em soluções de concentração crescente de álcool (10%, 25%, 50%, 70%, 90% e 100%), sendo realizadas imersões sucessivas de 20 minutos nas soluções de álcool com concentração até 90% e 1 hora em solução de álcool 100%. Em seguida as raízes foram lavadas em água destilada e secas em estufa a  $37 \pm 1^\circ \text{C}$  por 24 horas. Com os ápices voltados para cima, as bases seccionadas dos espécimes foram fixadas com fitas adesivas de dupla face de carbono nos suportes metálicos padronizados (“stubs”) de latão de diâmetro de 30 mm. Posteriormente foi realizada a metalização das raízes em uma câmara a vácuo (Desk II – Denton Vacuum – Buffalo, New Jersey, USA) e um período de “sputtering” (banho de ouro) de 120 segundos.

O microscópio eletrônico de varredura (JEOL – Modelo JSM T330A – Tokyo, Japão) (figura 11) foi utilizado para avaliar as áreas de reabsorção apical externa, verificando se havia a presença de biofilme nos grupos experimentais e no grupo controle. As imagens obtidas foram transferidas para o Windows Paint image editor para avaliação.



Figura 11 – a) Microscópio Eletrônico de Varredura utilizado para a obtenção das imagens; b) Aparelho utilizado para a metalização dos espécimes; c) Raiz passando pelo processo de metalização.

## RESULTADOS

### 5.1 Análise microbiológica

A figura 12 (a, b e c) ilustra placas de petri com meio BHI ágar, contendo *E. faecalis*, após a semeadura das diluições para seguinte contagem de UFC/mL que permitiu a obtenção dos dados analisados.

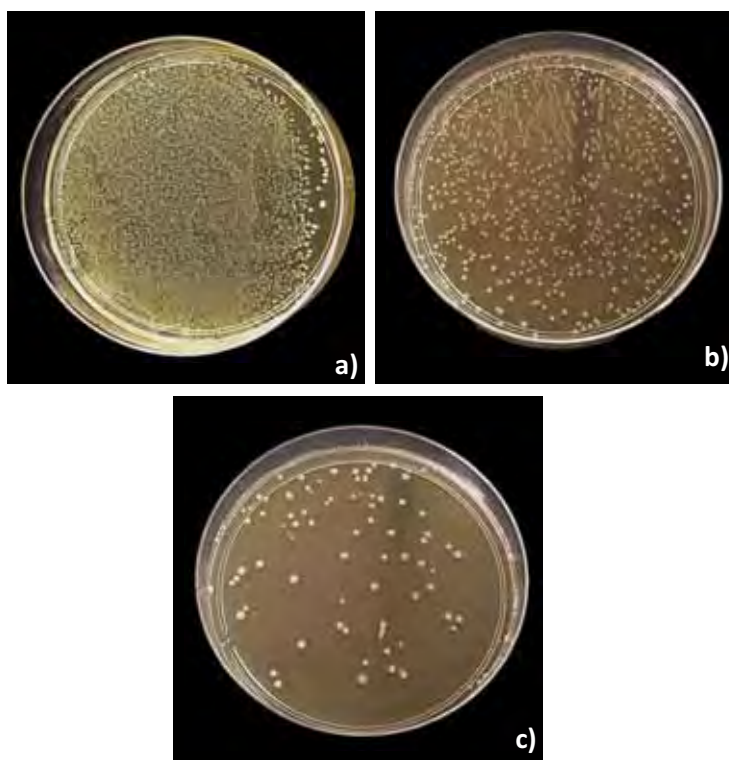


Figura 12 – Placas de petri com ágar BHI contendo *E. faecalis* para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL): a) placa contendo *E. faecalis* semeados com diluição  $10^{-2}$ ; b) Placa contendo *E. faecalis* semeados com diluição  $10^{-3}$ ; c) placa contendo *E. faecalis* semeados com diluição  $10^{-4}$ .

Os dados obtidos a partir da contagem de unidade formadora de colônias por mL (UFC/mL), referentes à ação das medicações intracanaais avaliadas sobre o biofilme microbiano apical foram analisados por meio da estatística descritiva e inferencial.

### 5.1.1 Análise Estatística Descritiva

Os resultados obtidos pela contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml) e em log<sub>10</sub>, em cada espécime, em todas as coletas, estão apresentados nas Tabelas 5 a 11 (Apêndice A).

A Tabela 1, apresentada nas figuras 13 3 14, ilustram a média dos valores de UFC/ml (log<sub>10</sub>) em todos os grupos experimentais.

Tabela 1 – Médias dos valores de UFC/mL (log 10) de todos os grupos

<b>Grupo</b>	<b>Valores da média de UFC/mL</b>	<b>Transformação em Log 10 de UFC/mL</b>
SS	4403333	6,61
Ca(OH) <sub>2</sub> + SS	1626667	6,03
CHX	151667	4,22
Ca(OH) <sub>2</sub> + CHX	3905833	6,53
GEN	4109167	6,55
Ca(OH) <sub>2</sub> + GEN	2935833	6,43

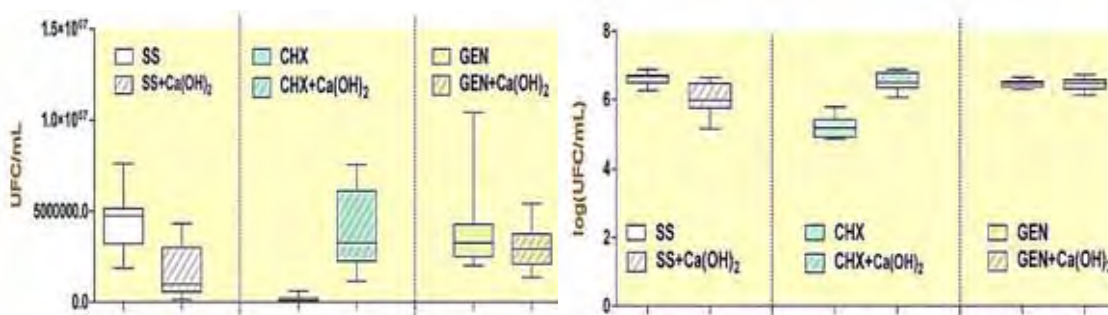


Figura 13 – Comparação da eficácia das medicações intracanaís sobre o biofilme microbiano apical em UFC/mL gráfico Boxplot.

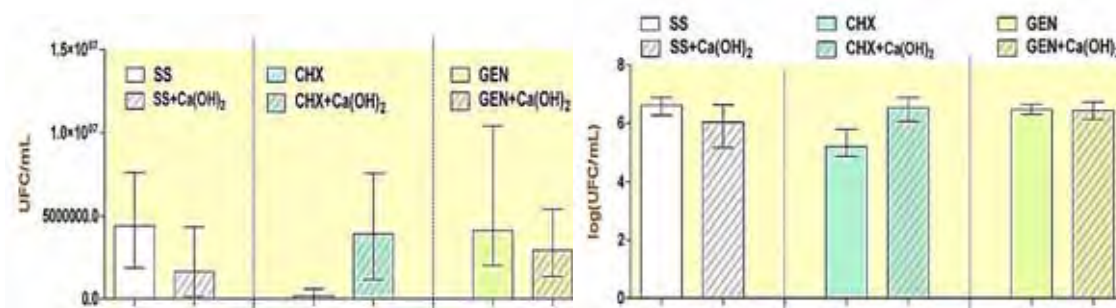


Figura 14 – Comparação da eficácia das medicações intracanaís sobre o biofilme microbiano apical em log 10 pelo gráfico de colunas.

Tabela 2 – Estatística descritiva dos valores da média, desvio-padrão e mediana de UFC/mL (log10)

Grupos	N	Média + DP*	Mediana
SS	12	6,61 ± 0,17	6,67
Ca(OH) <sub>2</sub> + SS	12	6,03 ± 0,44	5,98
CHX	12	5,18 ± 0,32	5,18
Ca(OH) <sub>2</sub> + CHX	12	6,52 ± 0,25	6,50
GEN	12	6,47 ± 0,10	6,49
Ca(OH) <sub>2</sub> + GEN	12	6,43 ± 0,18	6,46

\* DP: desvio-padrão

Tabela 3 – Estatística descritiva dos valores mínimos, Q1, mediana, Q3 e valores máximos de UFC/mL (log10)

<b>Grupos</b>	<b>n</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Q1</b>	<b>Mediana</b>	<b>Q3</b>	<b>Máximo</b>
SS	12	6.2742	6.4992	6.6753	6.7106	6.8808
Ca (OH) <sub>2</sub> + SS	12	5.146	5.752	5.985	6.468	6.635
CHX	12	4.845	4.903	5.176	5.416	5.778
Ca (OH) <sub>2</sub> + CHX	12	6.0607	6.3535	6.5070	6.7859	6.8785
GEN	12	6.3032	6.3859	6.4967	6.5324	6.6474
Ca (OH) <sub>2</sub> + GEN	12	6.1335	6.3206	6.4611	6.5729	6.7324

A estatística realizada neste estudo foi baseada na contagem de UFC/ml dos microrganismos presentes no biofilme bacteriano formado no ápice dos espécimes de cada grupo de medicações intracanal avaliados em relação ao grupo controle.

Pôde-se verificar que o grupo que apresentou menor quantidade de *E. faecalis* provenientes do biofilme formado, foi o grupo CHX, seguido pelo grupo Ca(OH)<sub>2</sub> + SS. Os grupos Ca(OH)<sub>2</sub> + CHX, GEN e Ca(OH)<sub>2</sub> + GEN apresentaram contagens similares de *E. faecalis* após o período de 15 dias de permanência da medicação intracanal.

### 5.1.2 Análise Estatística Inferencial

Para a comparação entre as seis condições experimentais, quanto ao desempenho das medicações intracanal sobre o biofilme microbiano formado, foi efetuado o teste de Kruskal-Wallis.

Verificou-se a possibilidade de rejeitar a hipótese de igualdade entre os valores medianos (estatística  $k_w = 0,000000$ ;  $gl = 5$ ;  $p = 0,001$ ).

A distribuição dos valores de UFC/mL difere entre os grupos, segundo o teste ANOVA não paramétrica de Kruskal-Wallis ( $k_w = 40,424$ ;  $gl = 6-1 = 5$ ;  $p\text{-valor} = 0,0001 < 0,05$ ). Pode-se estabelecer, via teste de Dunn (5%), que os grupos CHX e  $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{SS}$ , diferem do grupo controle (SS), Tabela 4.

Tabela 4 - Formação de grupos homogêneos (conjuntos de mesmo desempenho) quanto valores obtidos em UFC/mL (log 10) de 72 espécimes, de acordo com a medicação intracanal, após a aplicação do Teste de Comparação Múltipla de Dunn (5%)

MIC	Média	Grupos Homogêneos*
Soro	6,6149	<b>A</b>
Soro+ $\text{Ca}(\text{OH})_2$	6,0299	<b>B</b>
CLX	5,1881	<b>C</b>
CLX+ $\text{Ca}(\text{OH})_2$	6,5291	<b>A</b>
Gengibre	6,4729	<b>A</b>
Gengibre+ $\text{Ca}(\text{OH})_2$	6,4349	<b>A</b>

\*medianas seguidas de letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa

## 5.2 Análise por Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

As Figuras 15 a 20 ilustram as imagens obtidas por meio do MEV com aumento de 6000 x.

Pôde-se observar, no grupo da solução salina fisiológica (SS), que nas áreas adjacentes ao forame apical e nas crateras de reabsorção, havia um grande aglomerado de células bacterianas que encontravam-se aderidas à superfície dentária. Observou-se ainda, que nas áreas onde a reabsorção expunha os túbulos dentinários, havia uma grande concentração destas bactérias. Em nenhuma imagem deste grupo pode-se observar estrutura com organização típica do biofilme verdadeiro, mas havia sim, uma grande quantidade de cocos aderidos uns aos outros e à superfície dentária. A figura 13 ilustra uma imagem representativa do grupo SS.

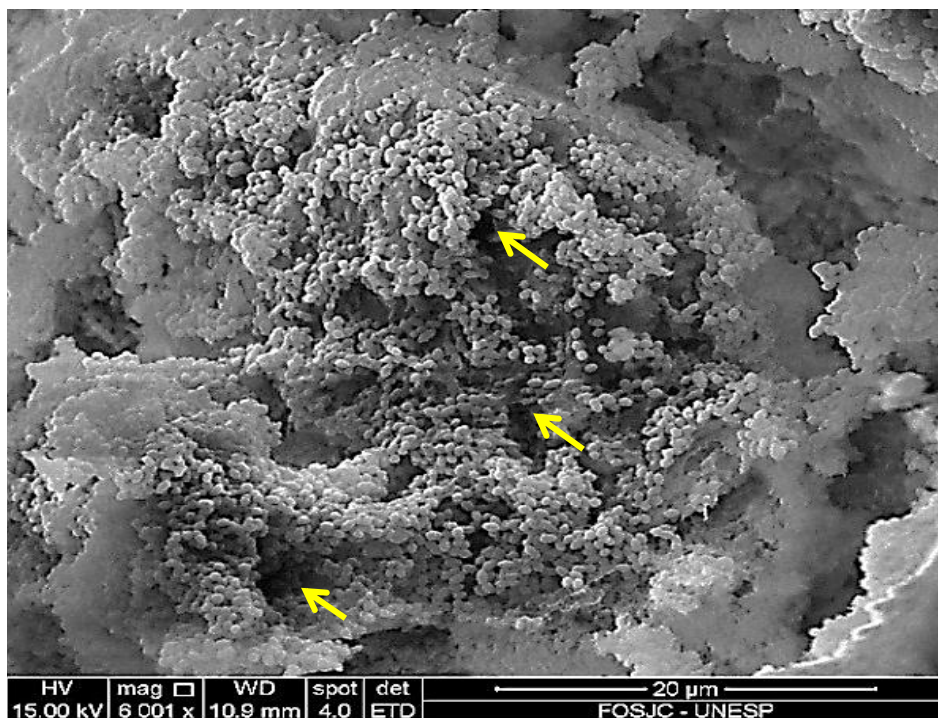


Figura 15 – Imagens obtidas a partir da microscopia eletrônica de varredura do grupo solução salina fisiológica (Controle); aumento 6000 x. Observa-se grande quantidade de cocos aderidos as áreas de reabsorção e na periferia dos túbulos dentinários (setas).



Nas imagens obtidas do grupo  $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{SS}$  verifica-se menor quantidade de microrganismos sobre a superfície dentária quando comparada ao grupo SS. Os cocos foram vistos nas áreas de reabsorção, áreas adjacentes ao forame apical e próximo a entrada dos túbulos dentinários expostos. Entretanto, estas bactérias não encontravam-se aglomeradas, mas, espalhadas por toda a superfície apresentando prolongamentos sugestivos de matriz de polissacarídeos (figura 14 – setas). Na figura 14 verifica-se a superfície radicular reabsorvida (a), com a presença de cocos espalhados e com prolongamentos ao seu redor (seta).

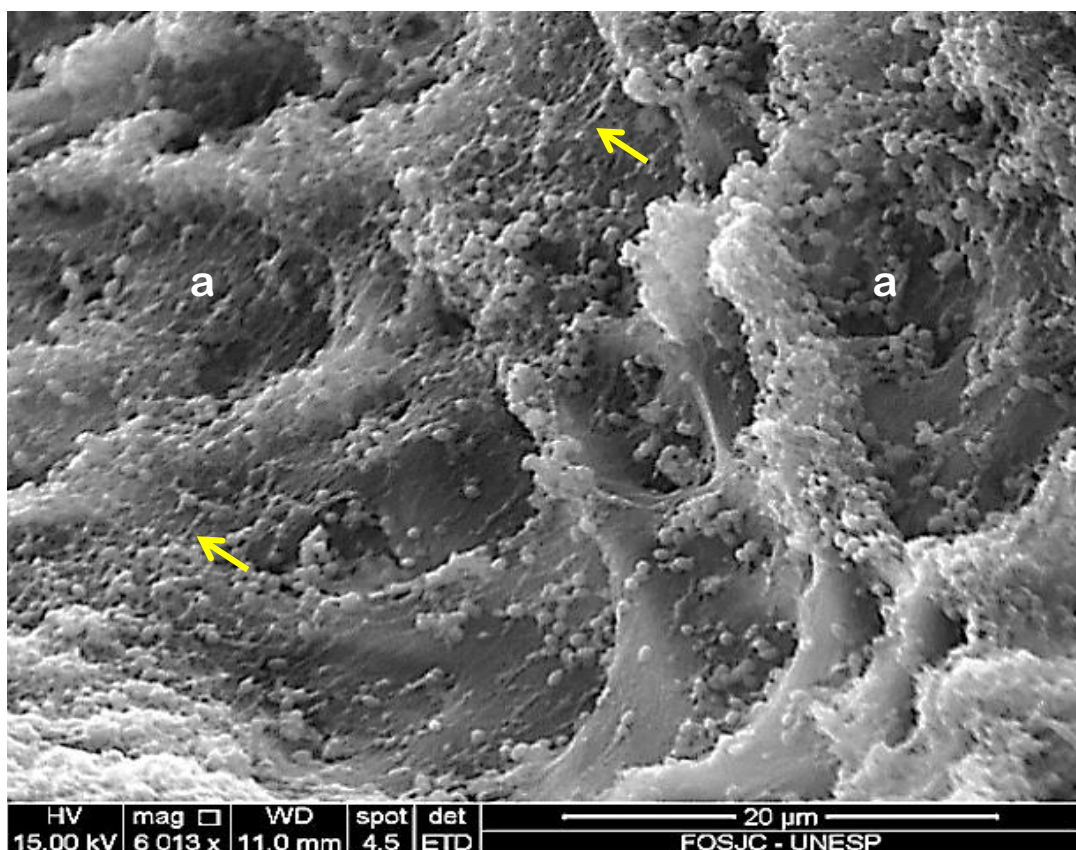


Figura 16 – Imagens obtidas a partir da microscopia eletrônica de varredura do grupo  $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{SS}$ ; aumento 6000x. Verificou-se áreas de reabsorção (a), prolongamentos de provável estrutura de matriz de polissacarídeos (setas), e presença de cocos espalhados em toda superfície dentinária.

Nas imagens obtidas do grupo Clorexidina (CHX), percebe-se que há menor quantidade de células bacterianas sobre a superfície reabsorvida. Quando presentes formaram pequenos aglomerados localizados em alguns pontos da superfície radicular. Entretanto, na maior parte desta superfície, eram visíveis os túbulos dentinários expostos e havia ausência ou pouca concentração de *E. faecalis*. Ainda verificou-se que nesta superfície houve formação prévia de biofilme, devido a presença de cristais e calcificações sobre o substrato dentinário nas áreas de reabsorção (setas). A figura 15 ilustra uma imagem representativa deste grupo.

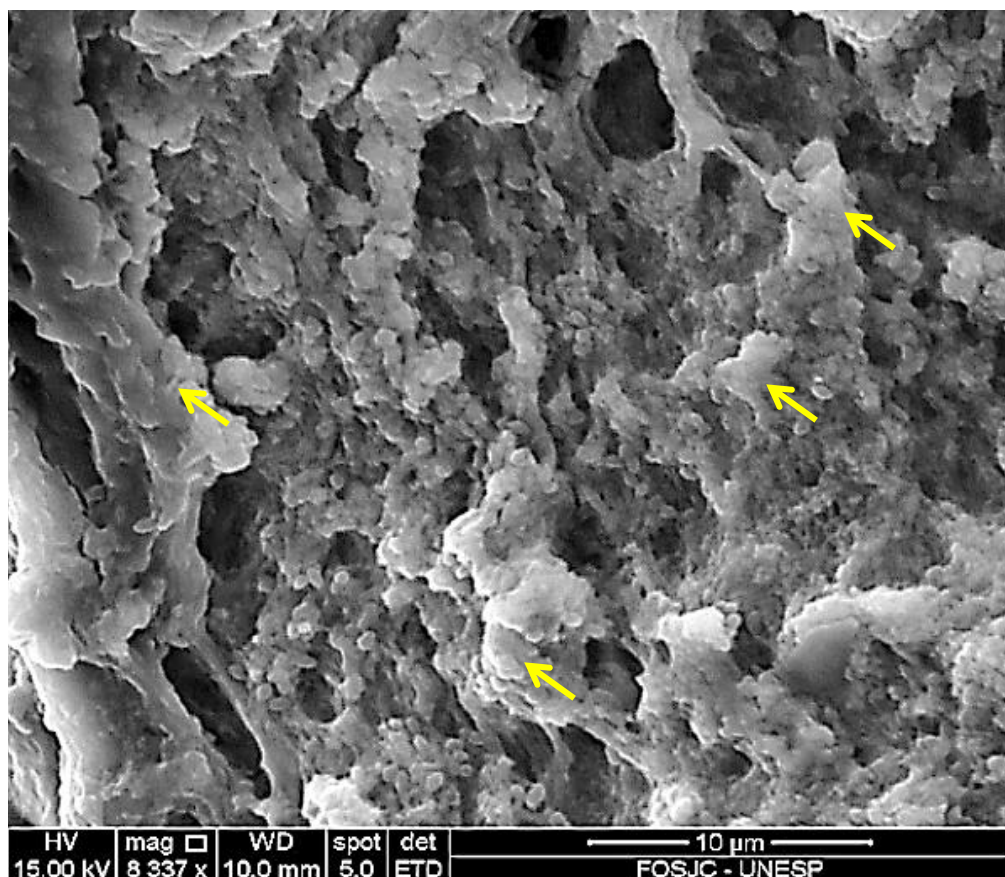


Figura 17 – Imagens obtidas a partir da microscopia eletrônica de varredura do grupo CHX; aumento 8000x. Verificou-se pouca quantidade de bactérias e áreas de cristalização do substrato dentinário exposto (setas).

No grupo  $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{CHX}$ , os cocos estavam presentes mas não apresentavam visibilidade nítida. Os mesmos apresentavam-se envoltos por uma massa de material semelhante a uma calcificação e com estruturas semelhantes aos prolongamentos (setas) vistos no grupo  $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{SS}$ . Havia áreas com maior e outras com menor concentração de microrganismos. Ainda observou-se que na região de forame apical havia um aglomerado de microrganismos aderidos e envoltos pela massa aparentemente calcificada (ac). A figura 16 mostra um espécime que representa este grupo.

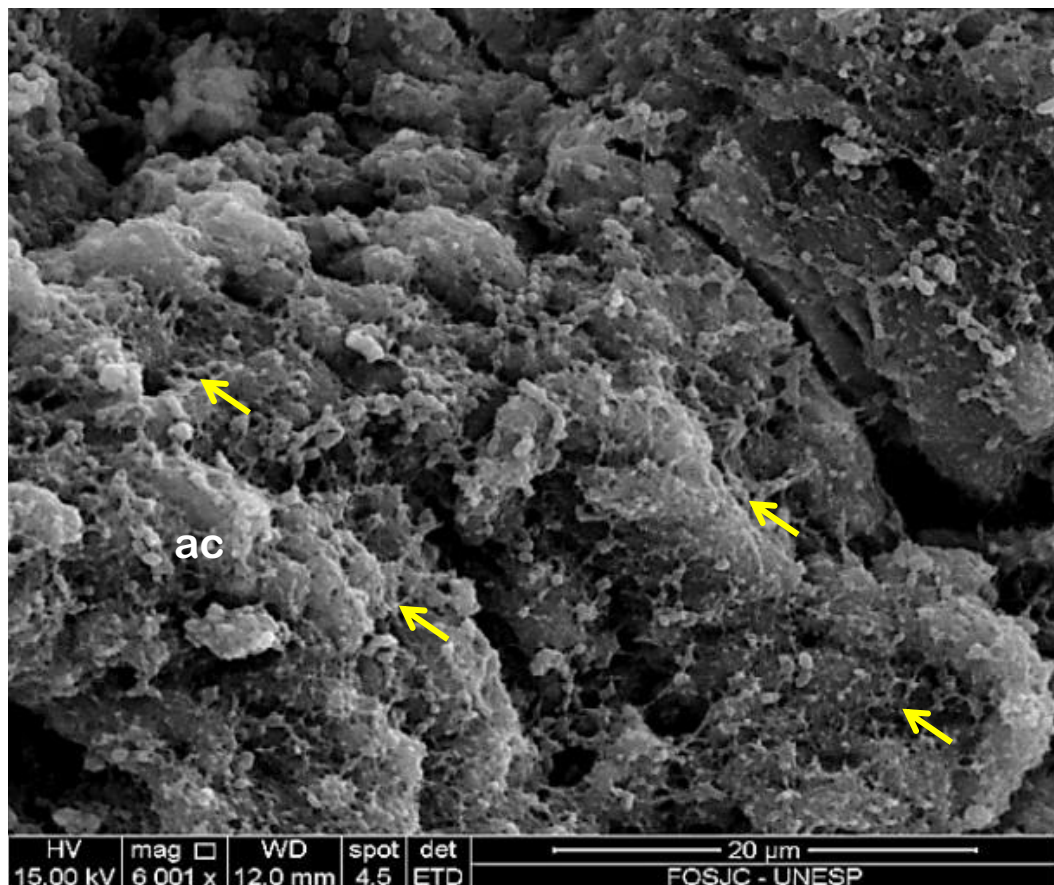


Figura 18 – Imagens obtidas a partir da microscopia eletrônica de varredura do grupo  $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{CHX}$ ; aumento 6000x. Observa-se prolongamentos sugestivos de matriz de biofilme (setas) e massa calcificada envolvendo as bactérias.

No grupo do gengibre (GEN), observou-se grande número de *E. faecalis* aderidos à superfície de regiões com reabsorção apical e aglomerados entre si. Observou-se ainda a presença de estruturas maiores, semelhantes a áreas cristalizadas (setas). A figura 17 apresenta um espécime representativo deste grupo.

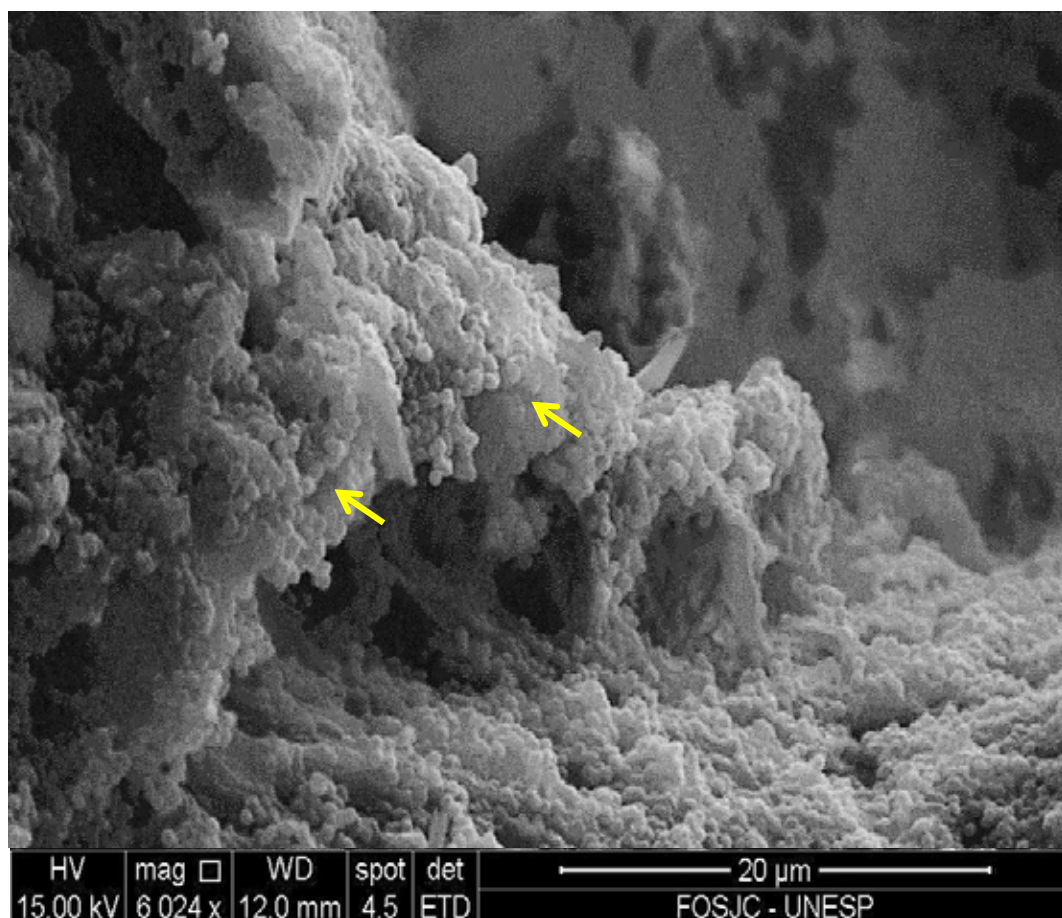


Figura 19 – Imagens obtidas a partir da microscopia eletrônica de varredura do grupo GEN; aumento 6000x. Observa-se grande quantidade de *Enterococcus faecalis*, áreas cristalizadas (setas), e presença de bactérias preenchendo os espaços de reabsorção.

No grupo  $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{GEN}$  não foram observados grandes aglomerados de cocos. Estas bactérias foram vistas espalhadas e associadas a prolongamentos, provavelmente de matriz polissacarídica (seta), de forma semelhante aos demais grupos do  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Também foram observadas grandes quantidades de massa sugestiva de calcificação que parecia estar “aprisionando” os microrganismos presentes (ac). Da mesma forma que nos demais grupos do  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  o forame apical apresentou-se parcialmente calcificado e em cima dessas calcificações havia maior concentração de bactérias. A figura 18 mostra um espécime representativo deste grupo.

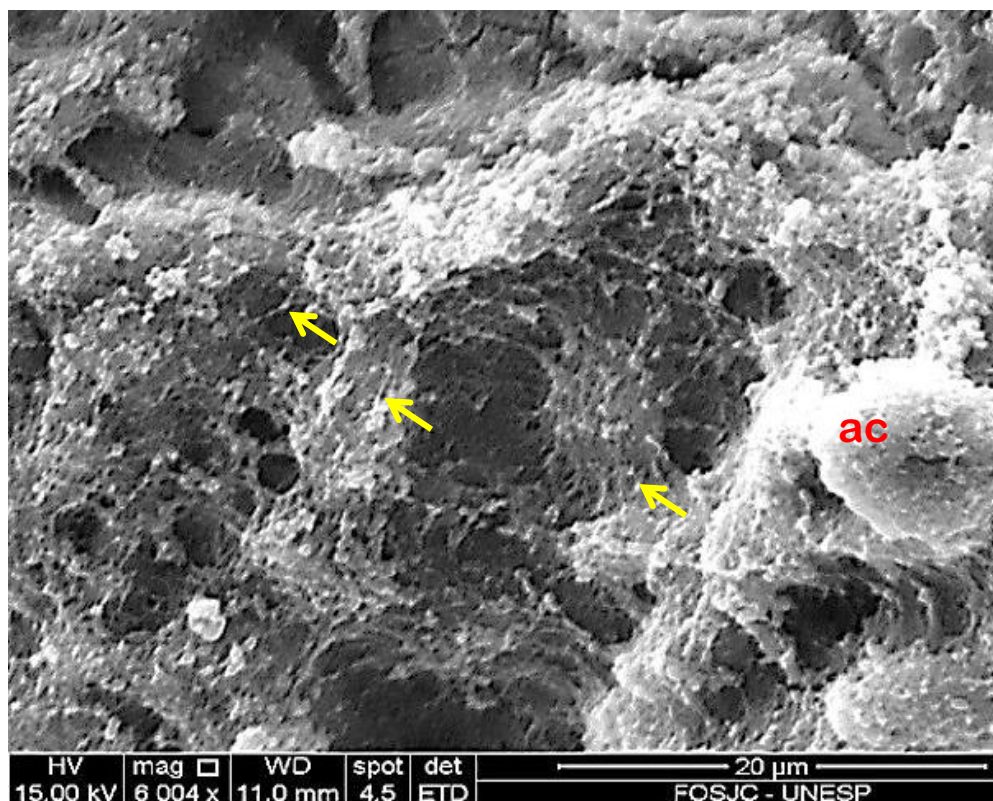


Figura 20 – Imagens obtidas a partir da microscopia eletrônica de varredura do grupo  $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{GEN}$ ; aumento 6000x. Observa-se quantidade reduzida de *Enterococcus faecalis* associados a prolongamentos de suposta matriz de polissacarídeos (setas) e áreas suspeitas de calcificação (ac).

## DISCUSSÃO

A penetração e perpetuação de microrganismos no sistema de canais radiculares são cruciais para o surgimento e manutenção da doença periapical. Assim, o principal objetivo do tratamento endodôntico é eliminar estes microrganismos levando ao reparo da lesão periapical. Vários estudos têm mostrado a importância da medicação intracanal entre as sessões para combater os microrganismos que permanecem viáveis mesmo após a realização do preparo biomecânico (Delgado et al., 2010). Sugere-se que a permanência destes, principalmente quando se organizam na forma de biofilme, possa ser uma das causas para o insucesso do tratamento endodôntico (Distel et al., 2002; Ariaz-Molis et al., 2009). Entretanto, poucos estudos estão focados na eliminação de biofilmes bacterianos localizados em regiões de reabsorção apical via forame.

A formação de biofilme é regulamentada em 3 etapas principais: 1) adsorção de macromoléculas na fase planctônica à superfície, levando à formação de um película de condicionamento composto de proteínas, glicoproteínas e alguns produtos microbianos secretados, que é seletiva para determinados tipos de microrganismos; 2) Adesão e co-adesão de microrganismos, que pode ser reforçada pela produção de polímeros formando microcolônias. Os estreptococcus são geralmente os primeiros a se aderirem à película formada inicialmente; 3) multiplicação e metabolismo dos microrganismos aderidos, que se organizam, desenvolvendo o biofilme maduro (Svensäter, Bergenholtz, 2004; Stanley, Lazazzera, 2004). Assim, o biofilme consiste em uma estrutura altamente organizada de microcolônias embebidas em uma matriz que possui canais de água abertos, que permite um grande fluxo

de água, permitindo a entrada e distribuição de nutrientes dentro do biofilme. (Svensäter, Bergenholtz, 2004).

Uma vez formado, o biofilme é encontrado com frequência em ambientes adversos, e as bactérias que o compõe, conseguem sobreviver por possuírem mecanismos capazes de resistir ao estresse proporcionado por estes ambientes (Svensäter, Bergenholtz, 2004; George et al., 2005; Shen et al., 2011). Além disto, áreas de reabsorção presentes na superfície externa da raiz, principalmente na região que circunda o forame apical, são locais bastante propícios para a aglomeração de microrganismos e consequente formação de biofilme bacteriano. Segundo Tronstad et al. (1990) e Leonardo et al. (2002), estas áreas estão presentes em todos os casos de dentes portadores de lesões periapicais. Considerando a relevância dessas regiões para a formação de biofilmes, o presente estudo selecionou dentes portadores de reabsorções relacionadas ao forame apical.

Nestas áreas, foi observada a formação de biofilme microbiano e a presença de grande concentração de bactérias. Verificou-se ainda, nas imagens obtidas por MEV, que houve formação de calcificações e cristalizações (figuras 13 a 18) e que na superfície dentária abaixo do biofilme, a dentina apresentava pontos de corrosão (figuras 14, 15 e 18). De forma semelhante, estudo prévio também descreveu imagens que continham essas características para o biofilme maduro (Kishen et al., 2006), entretanto, não realizamos análise bioquímica para avaliar a composição destas estruturas.

O crescente conhecimento sobre o papel dos biofilmes nas infecções do corpo humano levou a uma mudança no direcionamento dos estudos voltados para métodos de desinfecção e agentes microbianos, que antes enfatizavam microrganismos planctônicos e passaram a focar os biofilmes (Shen et al., 2011). Assim, o presente trabalho induziu a formação do biofilme nas áreas de reabsorção da região apical, visando encontrar alternativas para eliminá-lo, considerando

a falta de conhecimentos com relação ao combate do mesmo via tratamento endodôntico convencional (via canal radicular).

A maior parte dos estudos sobre biofilme induz sua formação em aparatos como discos de hidroxiapatita (Shen et al., 2011), amostras de dentina (George et al., 2005), filtros de membranas (Chaves de paz et al., 2007) ápices radiculares (Tronstad et al., 1990), e avaliam a ação de substâncias irrigadoras e medicações intracanaís sobre eles. Entretanto, este estudo procurou reproduzir o biofilme de forma mais similar à realidade, utilizando assim, a raiz inteira de dentes humanos extraídos, portadores de reabsorção apical. Sabendo-se que na endodontia, o biofilme bacteriano pode estar aderido à superfície apical externa e que o tratamento convencional só atua diretamente no interior do canal radicular, o modelo utilizado procurou reproduzir, da maneira mais próxima possível às condições clínicas, uma vez que em nenhum momento atuou-se mecanicamente na superfície externa radicular.

Tronstad et al. (1990), observaram, por microscópio eletrônico de varredura, que nas áreas próximas ao forame apical (superfície externa da raiz) foi notada a presença de cocos circundados por matriz extracelular, principalmente nas regiões onde havia reabsorção de cemento e de dentina. Eles atribuíram a falha do tratamento à presença de infecção extraradicular, concluindo que os microrganismos, rodeados por matriz extracelular ou na lesão periapical, foram protegidos contra as defesas do hospedeiro e terapia antibiótica sistêmica. Em nosso estudo foram observadas imagens similares as obtidas por Tronstad et al. (1990) confirmando assim que houve formação do biofilme no período de incubação (figura 2). Estas imagens apresentaram um grande aglomerado de bactérias, contendo estrutura similar à matriz de polissacarídeos.

A maioria das imagens obtidas por MEV após a utilização das medicações intracanaís também apresentavam estruturas sugestivas de matriz extracelular (figuras 12 a 17), evidenciando que todas as



medicações avaliadas foram incapazes de combater o biofilme previamente formado. A persistência de biofilme também foi observada em outro estudo, que demonstrou por microscopia eletrônica de varredura, a presença de placa bacteriana (biofilme), perto do forame apical, na superfície externa da raiz e microrganismos localizados nas lesões periapicais em dentes resistentes ao tratamento endodôntico (Tronstad et al., 1990).

Para a realização deste estudo, foram selecionados dentes humanos extraídos por indicação cirúrgica, portadores de reabsorção apical externa. Considerando a dificuldade de obtenção de dentes nestas condições, não foi possível medir o grau de reabsorção de cada raiz, sendo levada em consideração apenas a presença de reabsorções ao redor do forame apical e diâmetros de forames similares como fatores de padronização.

Outro fator de padronização foi o seccionamento das coroas para se obter espécimes com comprimento de  $13\pm 0,5\text{mm}$ . Essa dimensão foi estipulada devido à grande dificuldade de encontrar raízes padronizadas nestas condições, já que as mesmas deveriam ser uniradiculares e sem achatamento. Dessa forma, a escolha de raízes mais longas, poderia complicar ainda mais a seleção.

Após a seleção dos dentes, os canais radiculares foram previamente instrumentados com o sistema rotatório Mtwo até a lima 40/06 padronizando-se o diâmetro do canal radicular antes da contaminação dos mesmos. A escolha do sistema rotatório Mtwo se deu pelo seu emprego em diversos estudos, que mostraram resultados de limpeza e modelagem bastante satisfatórios.

Em seguida, as raízes foram distribuídas aleatoriamente entre os grupos experimentais e adaptadas em orifícios confeccionados em uma tampa modificada, proveniente de um placa de cultura de células de 24 poços, conforme descrito no item 4.3. O encaixe das raízes se deu sem que houvesse a fixação das mesmas com algum material adesivo, já

que estas necessitariam ser removidas para a realização do processo de sonicação do biofilme e posterior semeadura para contagem de UFC/mL.

Aproximadamente 3mm do terço apical das raízes permaneceu em contato com caldo BHI contendo sacarose 5% e suspensão de *E. faecalis*, e desta forma foi possível induzir a formação do biofilme apical. Inicialmente, foi realizado estudo piloto que comprovou a eficácia desta metodologia, além de ter proporcionado uma definição do tempo necessário para que fosse detectada a formação de biofilme, confirmada pelas imagens do MEV (10 dias).

A escolha do *E. faecalis* para a formação do biofilme se deu por este microrganismo ser normalmente encontrado em casos de infecções endodônticas persistentes, além de ter grande capacidade de sobreviver em condições adversas (Distel et al., 2002; Kayaoglu et al., 2011). O biofilme monoespécie pode ser uma das limitações do presente estudo, entretanto o modelo desenvolvido aqui pode ser usado em pesquisas futuras para a formação de biofilme multiespécies, incluindo bactérias gram-negativas. Além disto, este modelo realiza o teste de forma mais próxima possível das condições in vivo. Essa metodologia inovadora foi escolhida e executada de forma bastante satisfatória, permitindo a realização de todos os passos de forma simples e bem sucedida.

Existem vários estudos na literatura que avaliam a atuação de substâncias químicas auxiliares, soluções irrigadoras e medicações intracanaís sobre biofilme formado no interior do canal radicular (George et al., 2005; Kishen et al., 2006; Distel et al., 2002; Clegg et al., 2006). Por outro lado, pouco se sabe sobre a atuação de medicações em biofilmes formados nas áreas de reabsorção apical externa, situação muito comum em casos de dentes portadores de lesões periapicais, principalmente nos casos onde houve insucesso do tratamento endodôntico.

Analisando os resultados obtidos neste estudo, observou-se que nenhuma das medicações intracanal avaliadas foi capaz de eliminar o biofilme de *E.faecalis* totalmente. Assim, mesmo com a ação destas, o biofilme conseguiu permanecer viável e isto foi comprovado pela contagem de UFC/mL. Isso pode ser explicado, uma vez que as bactérias que compõe o biofilme são até 1000 vezes mais resistentes à fagocitose, anticorpos, e muitos antibióticos, quando comparados às células planctônicas (Costerton et al., 1999).

A substância que se mostrou mais eficaz no combate ao biofilme apical externo, foi a clorexidina gel 2 %, demonstrando grande diminuição na contagem de unidades formadora de colônias por mL quando comparada ao grupo controle (Solução salina) e aos demais grupos avaliados. Soma-se a isto o fato da grande dificuldade de encontrar microrganismos nas imagens desse grupo obtidas por MEV.

A atividade antimicrobiana da clorexidina é proporcionada pela presença de moléculas catiônicas em sua estrutura, que se ligam à matriz extracelular bacteriana, carregada negativamente, levando à quebra do equilíbrio osmótico celular, com perda irreversível de constituintes citoplasmáticos, dano à membrana e inibição enzimática, com conseqüente morte celular do microrganismo (Lima et al., 2001; Shen et al., 2011). Além disso, esta substância possui a capacidade única de se ligar à hidroxiapatita mantendo efeito residual (Rolla et al., 1970).

Vários estudos têm demonstrado a capacidade da CHX 2% em eliminar bactérias do interior dos canais radiculares e túbulos dentinários (Zamany et al., 2003; Abdullah et al., 2005). Porém há controvérsias na literatura com relação a sua eficácia no combate ao biofilme microbiano, onde alguns estudos afirmam que a mesma não é capaz de eliminá-lo (Clegg et al., 2006; Abdullah et al., 2005), enquanto outros demonstram sua efetividade para erradicar o biofilme (Lima et al., 2001; Williamson et al., 2009; Ariaz-molis et al., 2011; Du et al., 2012). Para potencializar a ação da clorexidina, tem sido sugerida sua

associação a agentes modificadores de superfície, que têm a capacidade de reduzir a viscosidade da substância proporcionando melhor capacidade de difusão da mesma (Williamson et al., 2009; Shen et al., 2011). Esta diferença entre os resultados, possivelmente ocorreu devido a variações metodológicas e tempo de exposição de contato das medicações com os microrganismos que variou de 1 a 30 minutos. No presente trabalho, o biofilme foi exposto à clorexidina por um período de 15 dias, e a mesma apresentou resultado bastante satisfatório. Assim, sugere-se que para haver melhor eficácia da ação da CHX gel 2% como medicação intracanal sobre biofilme microbiano apical, seja realizada a associação da mesma a um agente surfactante, além de irrigação abundante com hipoclorito de sódio antes da inserção da mesma no interior do canal radicular.

Vários estudos afirmam que a substância mais efetiva no combate ao biofilme bacteriano é o hipoclorito de sódio (NaOCl) em diversas concentrações (Abdullah et al., 2005; Clegg et al., 2006; Sena et al., 2006; Ariaz-molis et al., 2009). Sabe-se também que esta solução tem seu potencial antimicrobiano aumentado quando se realiza agitação mecânica (Sena et al., 2006) ou a utilização do ultrassom durante a irrigação (Gründling et al., 2011) proporcionando assim melhores resultados no combate ao biofilme.

O hidróxido de cálcio é a substância mais utilizada como medicação intracanal por apresentar propriedades consideradas ideias para uma medicação intracanal, tendo destaque o seu pH alcalino (12,5) que exerce efeito destrutivo sobre as membranas celulares e estruturas proteicas das bactérias (Spangberg, 1994). Além disso, seu elevado pH promove um ambiente alcalino e osteogênico sobre os tecidos circundantes por meio da liberação de íons hidroxila (OH<sup>-</sup>) (Tronstad et al., 1981), eliminando assim grande parte dos microrganismos que são incapazes de sobreviver em um ambiente com pH tão elevado (Byström et al., 1985). Apesar dessas propriedades, a literatura demonstra

controvérsias quanto à eliminação de biofilmes de *E. faecalis* no interior dos canais radiculares pela presença de medicações intracanáis a base de hidróxido de cálcio (Distel et al., 2002; Chai et al., 2007). No presente estudo os grupos com hidróxido de cálcio não apresentaram efeito satisfatório. Observou-se que a associação do hidróxido de cálcio com a solução salina, apresentou pequena redução dos microrganismos do biofilme, porém o suficiente para diferir dos outros grupos avaliados. Isto pode ser explicado, em partes, pela possibilidade da dentina reduzir a atividade antimicrobiana de medicações intracanáis, como o hipoclorito de sódio e a clorexidina, e abolir totalmente a ação do hidróxido de cálcio sobre *E. faecalis* (Haapasalo et al., 2000).

Quanto à associação do hidróxido de cálcio à clorexidina, não foram encontrados trabalhos na literatura que avaliaram ação desta associação de medicamentos sobre o biofilme bacteriano. Entretanto, Gomes et al. (2002) avaliaram a ação da associação do hidróxido de cálcio com a clorexidina gel 2% sobre *E. faecalis* em dentina radicular bovina contaminada, e verificaram que o hidróxido de cálcio sozinho permitiu o crescimento microbiano em todos os períodos de tempo avaliados, enquanto que sua associação com a clorexidina gel 2% eliminou 100% dos microrganismos em um período de 2 dias de exposição. Foi verificado também, que o efeito dessa associação foi reduzido entre 7 e 15 dias. Como em nosso estudo essa associação permaneceu no interior dos canais radiculares por um período de 15 dias, ela pode ter perdido parte da sua ação antimicrobiana. A literatura demonstra que a associação entre o hidróxido de cálcio e a clorexidina inserida por um período de 14 dias, apresentou grande redução de *E. faecalis* na sua forma planctônica do interior dos canais radiculares (Delgado et al., 2010; Valera et al., 2009; e Valera et al., 2010). Esse resultado contrário pode ser explicado pela diferente forma de organização das cepas de *E. faecalis* avaliadas, pois no presente estudo

essa associação foi testada em biofilme localizado em regiões de reabsorção apical externa.

Existe uma grande controvérsia nos estudos *in vitro* sobre a ação da associação da clorexidina ao hidróxido de cálcio. No entanto, é bem estabelecido que a eficácia de CHX é significativamente reduzida quando misturada ao  $\text{Ca(OH)}_2$  (Siqueira jr., et al., 2010). Sabe-se que a Clorexidina permanece estável, exercendo boa ação antimicrobiana, em um pH que varia de 5 a 8, e à medida que ele aumenta, há uma diminuição da ionização, havendo assim grande proporção de moléculas não ionizadas, levando a sua precipitação e perda da ação antimicrobiana (Zerella et al., 2005). Isso pode explicar o fato desta associação não ter apresentado resultados favoráveis no combate ao biofilme microbiano formado neste estudo. Apesar da notável perda de ação da CHX quando misturada ao  $\text{Ca(OH)}_2$ , o efeito proporcionado pela combinação destas substâncias pode ser de relevância clínica (Zerella et al., 2005).

Observou-se nas imagens obtidas pelo Microscópio eletrônico de Varredura que todos os grupos apresentaram estruturas semelhantes a calcificações e cristalizações, porém não se sabe a origem e nem a composição destas estruturas, já que não foi realizado nenhum teste específico para avaliar isto. Foi observada ainda, a presença de erosões na superfície dentinária (figuras 13 a 18), que, segundo Kishen et al. (2006), pode ser um sinal da presença de biofilme microbiano, visto que este estudo afirma que durante a formação e amadurecimento do biofilme de *E. faecalis* foi detectada a presença de erosões na superfície dentinária. Este estudo afirma ainda, que no biofilme maduro observou-se sinais de crescimento de calcificação e cristais que se estenderam a partir do substrato dentina, porém a avaliação realizada por ele, foi por meio de microscópio de luz. No nosso estudo não foi realizado esse tipo de análise.

Com relação ao gengibre, sabe-se que os fitoterápicos têm se mostrado uma alternativa, que vem sendo estudada recentemente

(Prabhakar *et al.*, 2010; Lantz *et al.*, 2007). A literatura tem mostrado que *Zingiber officinalis* (gengibre), possui ação antibiótica e anti-inflamatória, sugerindo-se assim, a sua utilização na endodontia como um potencial agente irrigante e medicamento intracanal. Estudos realizados por nossa equipe, tem mostrado resultados bastante promissores em relação ao combate a infecções de origem endodôntica (Maekawa *et al.*, 2010). Gulve, Gulve (2010) realizaram estudo com o objetivo de comparar a eficácia antimicrobiana do extrato de gengibre e do hipoclorito de sódio 2% contra *Enterococcus faecalis* através do método de difusão em ágar. Foi observado que o extrato de gengibre apresentou ação sobre *Enterococcus faecalis* superior ao hipoclorito de sódio. Apesar dos resultados promissores evidenciados pela literatura, este estudo, verificou que o gengibre foi pouco efetivo no combate ao biofilme microbiano tanto quando utilizado sozinho ou associado ao hidróxido de cálcio.

A sobrevivência das bactérias presentes no biofilme apical mesmo após exposição a medicações intracanaís pode ser atribuída à sua invasão no interior dos túbulos dentinários, onde elas encontram-se protegidas de medicamentos endodônticos por dois mecanismos: a dificuldade de as substâncias penetrarem no interior dos túbulos e pela inativação do medicamento pela dentina (George *et al.*, 2005).

No presente estudo ficou evidente que medicações intracanaís não são capazes de combater o biofilme bacteriano apical. Talvez seja necessário utilizar a associação de uma técnica irrigadora com ultrassom e substância química auxiliar que apresente baixa tensão superficial e poder de dissolução tecidual, seguida de medicação intracanal, para tentar obter-se maior ação antimicrobiana sobre o biofilme formado na região apical de dentes com necrose pulpar.

Ainda, mais estudos se fazem necessários nesta linha de trabalho, inclusive com o desenvolvimento de biofilme multiespécie, a fim de se obter resultados que reproduzam com mais fidelidade as condições

clínicas. Assim, este é o primeiro estudo de uma linha a ser desenvolvida para alcançar maior sucesso na terapia endodôntica.



## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- a) Nenhuma das medicações intracanal avaliadas foram eficazes no combate ao biofilme microbiano.
- b) A clorexidina gel 2% apresentou a menor redução dos microrganismos, seguida pelo grupo hidróxido de cálcio e soro.

## REFERÊNCIAS

Abdullah M, Yuan-Ling NG, Gualabilava K, Moles DR, Spart DA. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. J Endod;2005: 31(1):30-36.

Afzal M, Al-Hadidi D, Menon M, Pesek J, Dhami MS. Ginger: an ethnomedical, chemical and pharmacological review. Drug Metabol Drug Interact. 2001;18(3-4):159–90.

Aguiar APS. Ação in vitro do extrato glicólico de gengibre e medicamentos sobre *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e sua endotoxina em canais radiculares. [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP): UNESP - Universidade Estadual Paulista; 2009.

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; 46(2):409-20.

Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-Garcia M, Baca P. *Enterococcus faecalis* biofilms eradication by root canal irrigants. J Endod. 2009;35(5):711-4.

Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Gonzalez-Rodriguez MP, Valderrama MJ, Baca P. Eradication of *Enterococcus faecalis* biofilms by cetrimide and chlorhexidine. J Endod. 2011;36(1):87-90.

---

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](http://nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, Gonzalez-Rodriguez MP, Ferrer-Luque CM. Residual and antimicrobial activity of final irrigation protocols on *Enterococcus faecalis* biofilm in dentin. *J Endod*. 2011;37(3):363-6.

Barbin LE, Saquy PC, Guedes DF, Sousa-Neto MD, Estrela C, Pécora JD. Determination of para-chloroaniline and reactive oxygen species in chlorhexidine and chlorhexidine associated with calcium hydroxide. *J Endod*. 2008;34(12):1508-14.

Basrani B, Santos JM, Tjaderhane L, Grad H, Gorduysus O, Huang J, et al. Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human root dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94(2):240–5.

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

Byström A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J*. 1985;18(1):35-40.

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;24(1):254.

Carlsson J. Bacterial metabolism in dental biofilms. *Adv Dent Res* 1997;27(11):75-80.

Carr GB, Schwartz RS, Schaudinn C, Gorur A, Costerton JW. Ultrastructural examination of failed molar retreatment with secondary apical periodontitis: an examination of endodontic biofilms in an endodontic retreatment failure. *J Endod* 2009;35:1303–1309.

Chavez de Paz L. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. *J Endod* 2007;33(6):652–62.

Chai WL, Hamimah H, Cheng SC, Sallam AA, Abdullah M. Susceptibility of *Enterococcus faecalis* biofilm to antibiotics and calcium hydroxide. *J Oral Sci.* 2007 Jun;49(2):161-6.

Chrubasik S, Pittler MH, Roufogalis BD. *Zingiberis rhizoma*: a comprehensive review on the ginger effect and efficacy profiles. *Phytomedicine* 2005;12(9):684-701.

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;24(1):217.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284(5418):1318–22.

Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. *J Endod.* 2006 May;32(5):434-7.

Delgado RJR, Gasparoto TH, Sipert CR, Pinheiro CR, Moraes IG, Garcia RB, et al. Antimicrobial effects of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2010;36(8):1389-93.

Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod* 2002;28(10):689–93.

Du T, Ma J, Yang P, Xiong Z, Lu X, Cao Y. Evaluation of antibacterial effects by atmospheric pressure nonequilibrium plasmas against *Enterococcus faecalis* biofilms in vitro. *J Endod.* 2012;38(4):545-9.

Ercan E, Dalli M, Dülgergil CT. In vitro assessment of the effectiveness of chlorhexidine gel and calcium hydroxide paste with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102(2):27-31.

Estrela C, Sydney GB, Figueiredo JA, Estrela CR. Antibacterial efficacy of intracanal medicaments on bacterial biofilm: a critical review. *J Appl Oral Sci*. 2009 Jan-Feb;17(1):1-7.

Fouda AMM, Berika MY. Evaluation of the effect of hydroalcoholic extract of *Zingiber officinale* rhizomes in rat collagen-induced arthritis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2009;104(3):262-71.

George G, Kishen A, Song KP. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2005;31(12):867-72.

Gomes BPFA, Ferraz CCR, Garrido FD, Rosalen PL. Microbial susceptibility to  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  pastes and their vehicles. *J Endod* 2002;28(11):758-61.

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

Gomes BPFA, Vianna ME, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radio Endod* 2006;102(4):544-50.

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.

Gründling GL, Zechin JG, Jardim WM, de Oliveira SD, de Figueiredo JA. Effect of ultrasonics on *Enterococcus faecalis* biofilm in a bovine tooth model. *J Endod*. 2011 Aug;37(8):1128-33.

Gulve MN, Gulve ND. Comparison of antimicrobial efficacy of ginger extract and 2% Sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* using agar diffusion method. JIDA 2010;10(4):347-49.

Guo HJ, Wang JD. Bacterial biofilm on the apical external root surfaces of human teeth associated with chronic periradicular lesions. Beijing Da Xue Xue Bao. Oct 2009;41(5):571-4.

Haapasalo HK, Sirén EK, Waltimo TM, Ørstavik D, Haapasalo MP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. Int Endod J. 2000 Mar;33(2):126-31.

Kakehashi S, Stanleu HP, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposure of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1965;20(3):340-9.

Kayaoglu G, Ormulu H, Akca G, Gurel M, Gençay O, Sorkun K, et al. Antibacterial activity of própolis versus conventional endodontic disinfectants against *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules J Endod 2011;37(3):376-81. Epud2011 jan 8.

Kim JK, Kim Y, Na KM, Surh YJ, Kim TY. [6]-Gingerol prevents UVB-induced ROS production and COX-2 expression in vitro and in vivo. Free Radic Res. 2007;41(5):603-14.

Kishen A, George S, Kumar R. *Enterococcus faecalis*-mediated biomineralized biofilm formation on root canal. J Biomed Mater Res A. 2006;77:406-15.

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

Leonardo MR, Rossi MA, Silva LA, Itol Y, Bonifacio KC. EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. J Endod 2002;28:815–18.

Lima KC, Fava LR, Siqueira JF Jr. Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* biofilms to some antimicrobial medications. *J Endod* 2001;27(10):616–9.

Lin RJ, Chen CY, Chung LY, Yen CM. Larvicidal activities of ginger (*Zingiber officinale*) against *Angiostrongylus cantonensis*. *Acta Trop*. 2010; 115(1-2):69-76.

Maekawa LE. Avaliação dos extratos de própolis e de gengibre como medicação intracanal sobre microrganismos e endotoxinas em canais radiculares [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista (SP) - UNESP; 2010.

Menezes MM, Valera MC, Jorge AOC, Koga-Ito CV, Camargo CHR, Mancini MNG. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Int Endod J* 2004;37(5):311-319.

Nair PNR, Sjogren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod* 1990;16(12):580–8.

Nerwich A, Figdor D, Messer HH. pH changes in root dentin over a 4-week period following root canal dressing with calcium hydroxide. *J Endod*. 1993;19(6):302-6.

Ørstavik D, Haapasalo M. Disinfection of endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 1990;6(4):142–9.

Persoon IF, Hoogenkamp MA, Bury A, Wesselink PR, Hartog AF, Wever R, et al. Effect of vanadium chloroperoxidase on *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod*. 2012;38(1):72-4.

Prabhakar J, Senthilkumar M, Priya MS, Mahalakshmi K, Sehgal PK, Sukumaran VG. Evaluation of antimicrobial efficacy of herbal alternatives

(Triphala and green tea polyphenols), MTAD, and 5% sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilm formed on tooth substrate: an in vitro study. *J Endod.* 2010;36(1):83-6.

Ribeiro DA, Scolastici C, Lima PLA, Marques MEA, Salvadori DMF. Genotoxicity of antimicrobial endodontic compounds by single cell gel (comet) assay in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol, and Endod* 2005; 99(5):637-40.

Ricucci D, Siqueira Jr JF. Apical actinomycosis as a continuum of intraradicular and extraradicular infection: case report and critical review on its involvement with treatment failure. *J Endod.* 2008;34(9):1124-9.

Ricucci D, Siqueira Jr JF. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod* 2010;36(8):1277–88.

Ricucci D, Siqueira Jr JF. Recurrent apical periodontitis and late endodontic treatment failure related to coronal leakage: a case report. *J Endod.* 2011;37(8):1171-5.

Rolla G, Loe H, Rindom S, Chiott C. The affinity of chlorhexidine for hydroxyapatite and salivary mucins. *J Periodon Res* 1970;5(5):90–5.

Saber Sel-D, El-Hady SA. Development of an intracanal mature *Enterococcus faecalis* biofilm and its susceptibility to some antimicrobial intracanal medications; an in vitro study. *Eur J Dent.* 2012;6(1):43-50.

Sena NT, Gomes BPFA, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, et al. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J.* 2006;39(11):878-85.

Shen Y, Stojcic S, Haapasalo M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. *J Endod.* 2011;37(5):657-61.

Siqueira JF Jr., Lopes HP, de Uzeda M. Recontamination of coronally unsealed root canals medicated with camphorated paramonochlorophenol



or calcium hydroxide pastes after saliva challenge. *J Endodon* 1998;24(1):11–4.

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

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

Spangberg LSW. Intracanal medication. In: *Endodontics*. Ingle JI, Bakland L, eds. *Endodontics*. 4th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994. p. 627-40.

Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K. An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *Int Endod J* 2001;34(4):300–7.

Stanley NR, Lazazzera BA. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol Microbiol* 2004;52(4):917–24.

Svensäter G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. *Endod Topics* 2004;9(9):27–36.

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiology analysis of teeth with endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85(1):86–93.

Tronstad L, Andreasen JO, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *J Endod*. 1981; 7(1):17-21.

Tronstad L, Kreshtod D, Barnett F. Microbiological monitoring and results of treatment of extraradicular endodontic infection. *Endod Dent Traumatol* 1990;6(6):129–36.

Tronstad L, Barnett F, Cervone F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. *Endod Dent Traumatol.* 1990 Apr;6(2):73-7.

Valera MC, Silva KC, Maekawa LE, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Camargo CH, et al. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite associated with intracanal medication for *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* inoculated in root canals. *J Appl Oral Sci.* 2009 Nov-Dec;17(6):555-9.

Valera MC, Salvia AC, Maekawa LE, Camargo SE, Carvalho CA, Camargo CH, et al. Antimicrobial analysis of chlorhexidine gel and intracanal medicaments against microorganisms inoculated in root canals. *Minerva Stomatol* 2010;59(7-8):415-21.

Williamson AE, Cardon JW, Drake DR. Antimicrobial susceptibility of monoculture biofilms of a clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2009;35(1):95-7.

Zamany A, Safavi K, Spångberg LS. The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;96(5):578–81.

Zerella JA, Fouad AF, Spangberg LS. Effectiveness of a calcium hydroxide and chlorhexidine digluconate mixture as disinfectant during retreatment of failed endodontic cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;100(6):756–61.

## APÊNDICE A

Tabela 5 Resultados obtidos: valores de UFC/ml (log10) no grupo **SS**

<b>Dente</b>	<b>UFC/mL</b>	<b>Log 10</b>
1	5330000	6,73
2	7600000	6,88
3	2130000	6,33
4	4750000	6,68
5	4890000	6,69
6	1880000	6,27
7	4030000	6,61
8	4720000	6,67
9	5220000	6,72
10	4850000	6,69
11	4530000	6,66
12	2910000	6,46
<b>Média</b>	<b>4403333</b>	<b>6,61</b>

Tabela 6 Resultados obtidos: valores de UFC/ml (log10) no grupo **Ca(OH)<sub>2</sub> + SS**

<b>Dente</b>	<b>UFC/mL</b>	<b>Log 10</b>
1	140000	5,15
2	3820000	6,58
3	1180000	6,07
4	550000	5,74
5	3300000	6,52
6	790000	5,90
7	610000	5,79
8	1630000	6,21
9	2080000	6,32
10	690000	5,84
11	4320000	6,64
12	410000	5,61
<b>Média</b>	<b>1626667</b>	<b>6,03</b>

Tabela 7 Resultados obtidos: valores de UFC/mL (log10) no grupo **CHX**

<b>Dente</b>	<b>UFC/mL</b>	<b>Log 10</b>
1	70000	4,85
2	150000	5,18
3	200000	5,30
4	0	0,00
5	340000	5,53
6	80000	4,90
7	10000	4,00
8	90000	4,95
9	0	0,00
10	600000	5,78
11	80000	4,90
12	200000	5,30
<b>Média</b>	<b>151667</b>	<b>4,22</b>

Tabela 8 Resultados obtidos: valores de UFC/mL (log10) no grupo **Ca(OH)<sub>2</sub> + CHX**

<b>Dente</b>	<b>UFC/mL</b>	<b>Log 10</b>
1	2830000	6,45
2	1150000	6,06
3	2030000	6,31
4	2520000	6,40
5	6200000	6,79
6	3650000	6,56
7	5840000	6,77
8	6760000	6,83
9	7560000	6,88
10	2190000	6,34
11	2470000	6,39
12	3670000	6,56
<b>Média</b>	<b>3905833</b>	<b>6,53</b>

Tabela 9 Resultados obtidos: valores de UFC/mL (log10) no grupo **GEN**

<b>Dente</b>	<b>UFC/mL</b>	<b>Log 10</b>
1	10400000	7,02
2	3270000	6,51
3	3250000	6,51
4	3750000	6,57
5	2630000	6,42
6	3030000	6,48
7	8440000	6,93
8	4440000	6,65
9	2470000	6,39
10	2010000	6,30
11	2320000	6,37
12	3300000	6,52
<b>Média</b>	4109167	6,55

Tabela 10 Resultados obtidos: valores de UFC/mL (log10) no grupo **Ca(OH)<sub>2</sub> + GEN**

<b>Dente</b>	<b>UFC/mL</b>	<b>Log 10</b>
1	3510000	6,55
2	2080000	6,32
3	2130000	6,33
4	3360000	6,53
5	2370000	6,37
6	3120000	6,49
7	3820000	6,58
8	5400000	6,73
9	3960000	6,60
10	1440000	6,16
11	2680000	6,43
12	1360000	6,13
<b>Média</b>	2935833,33	6,43

**ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética**

  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**  
Rua Eng. Francisco José Leme, 777 - Jd. São Jhosé -  
CXP 13241-900 - F. (12) 3947-9024  
E-mail: f123@fod.usp.br / f123@fod.usp.br

---

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

**CERTIFICAMOS**, que o protocolo nº **016/2011-PH/CEP**, referente ao Projeto intitulado "Ação da medicação intracanal sobre biofilme microbiano localizado em áreas de reabsorção apical de dentes humanos extralados", sob a responsabilidade de **MARIA TEREZA PEDROSA DE ALBUQUERQUE**, 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 **JANETE DIAS ALMEIDA**

