

ADRIANA CHUNG

**DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS, QUANTIFICAÇÃO DE
ENDOTOXINAS E AÇÃO *IN VIVO* DO *Zingiber officinale* EM
DENTES COM NECROSE PULPAR E LESÃO PERIAPICAL**



2011

ADRIANA CHUNG

**DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS, QUANTIFICAÇÃO DE
ENDOTOXINAS E AÇÃO *IN VIVO* DO *Zingiber officinale* EM DENTES
COM NECROSE PULPAR E LESÃO PERIAPICAL**

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

Orientadora: Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera

São José dos Campos

2011

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

C472d Chung, Adriana.

Detecção de microrganismos, quantificação de endotoxinas e ação *in vivo* do *Zingiber officinale* em dentes com necrose pulpar e lesão periapical / Adriana Chung. - São José dos Campos: [s.n.], 2011.

156 .f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) – Faculdade de Odontologia de São Jose dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2011.

Orientador: Profa. Titular: Marcia Carneiro Valera

1. Endotoxinas. 2. Zingiber officinale. 3. Irrigantes do Canal Radicular. 4. Reação em Cadeia da Polimerase. . 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. Título

tD 24

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, 08 de Julho de 2011.

Assinatura:

E-mail: adri_chung@yahoo.com.br

BANCA EXAMINADORA

Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera (Orientadora)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP – Univ Estadual Paulista

Prof. Tit. Giulio Gavini

Faculdade de Odontologia de São Paulo

Universidade de São Paulo – USP

Prof. Dr. Cláudio Antônio Talge Carvalho

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP – Univ Estadual Paulista

São José dos Campos, 06 de julho de 2011

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais Gemma e André, que me deram a vida. O amor incondicional que vocês têm por mim, a dedicação, a paciência, a orientação. Graças a Deus, tive vocês como pais. Vocês, que fizeram tudo por mim, literalmente. Abriram mão de muita coisa, inclusive, da própria vida, para que pudéssem dar, a mim e aos meus irmãos, tudo do melhor... não digo somente em relação aos bens materiais, mas especialmente em afeto, carinho e amor. Espero poder retribuir tudo que vocês me deram, porque se hoje eu cheguei até aqui, foi porque vocês me apoiaram, incentivaram e, mais além, confiaram em mim. Este trabalho é mais de vocês do que meu. Muitos pais, hoje, não fazem questão de participar da vida dos filhos. Mas vocês, sempre ficaram comigo em todas as fases da minha vida, sempre segurando na minha mão e guiando meus passos. Hoje posso dizer que vocês são os melhores pais do mundo! Eu amo vocês...

Muito obrigada Omá e Apá!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus,

Que me deu a vida, deu-me forças quando eu fui fraca, deu-me esperança quando eu estava desesperada, deu-me sabedoria quando eu estava confusa, deu-me amigos quando eu estava sozinha, deu-me proteção para seguir meu caminho, deu-me pessoas maravilhosas para escreverem parte da minha vida.

Amou-me e continua me amando mesmo quando eu não merecia...

Ao senhor, que me fez instrumento de trabalho e pegou na minha mão, junto com Nossa Senhora, para que eu pudesse concluir mais esta etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Família,

Aos meus queridos irmãos Víctor Pedro Chung e Gabriela Mariana Chung, por estarem sempre ao meu lado, entre brigas e beijos. Pela compreensão e pelo suporte quando eu realmente precisei.

Ao meu namorado Carlos Eduardo Fernandes Fernandes, que me completa e é parte de mim, obrigada pelo carinho e pelo amor, por cuidar de mim, por se preocupar, por me respeitar, por toda a compreensão e paciência nessa fase tão importante da minha vida.

Aos meus queridos avós Tereza Lee e Isídoro Chung, pelo amor que me deram, pelos incentivos e pelos ensinamentos que só a experiência de vida e Deus podem dar.

Aos meus sogros Sra. Edna Gomes Fernandes e Sr. José Eduardo Fernandes e à minha cunhada Mariana Fernandes Hommaid por toda a compreensão, desabafos e, acima de tudo, pelo carinho.

Aos meus tios Aloísio Chung e Patrícia Kim por todo o apoio, conversas, pela torcida e pela consideração, como a de um pai.

Muito Obrigada Família Querida!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*À minha querida orientadora Professora Titular
Marcia Carneiro Valera,*

Agradeço por tudo que aprendi e pela paixão que tenho à minha profissão, em especial, à Endodontia. Se hoje cheguei até aqui foi porque a senhora despertou meu interesse na Endodontia e empurrou-me sempre adiante, muito adiante, para que eu pudesse aprender cada vez mais. Minha admiração pela senhora só aumentou desde a graduação. Cada dia que passou pude conhecer um pouco mais da senhora, que além de ser líder por natureza e super competente no que se dedica, é uma mulher maravilhosa, com o coração extremamente enorme que, posso afirmar, é como coração de mãe: onde sempre cabe mais um... que mesmo apesar de todas as dificuldades que a senhora passou, inimagináveis, a senhora consegue transparecer paz e serenidade e acima de tudo, amor ao ser humano. Deus me abençoou muito por ter colocado a senhora na minha vida. Obrigada por ter sido a orientadora que eu pedi a Ele, por ter me acolhido, por ter “puxado a minha orelha” quando precisei, por ter me orientado, não apenas profissionalmente, mas também na minha vida pessoal, mesmo nos poucos momentos que tivemos oportunidade de conversar... A senhora e seus ensinamentos sempre ficarão guardados no meu coração.

Muito obrigada Professora!

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista, na pessoa do Diretor, Prof. Dr. José Roberto Rodrigues e do Vice-Diretor Carlos Augusto Pavanelli.

À Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera, Coordenadora do curso de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora.

À Profa. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, sempre solícita e atenciosa, por ter nos recebido tão bem na Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela oportunidade e por ter nos ensinado tanto em nosso trabalho de Dissertação.

Ao Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo pela boa vontade sempre, respeito e amizade.

Ao Prof. Dr. Cláudio Antônio Talge Carvalho, pela amizade, incentivos, conversas descontraídas e pelas orientações tanto de vida quanto profissional.

Às Profas. Dr. Ana Paula Martins Gomes, Simone Helena Gonçalves de Oliveira pela convivência, preocupações e interesses sobre minha pessoa, pela amizade, pelas conversas.

À Profa. Dr. Luciane Dias de Oliveira por toda ajuda, pela boa vontade sempre mesmo sendo muito ocupada, e por todo carinho.

À Profa. Marcia Maciel Menezes Ferraz, pela orientação durante a graduação e pela agradável convivência.

À Profa. Lílian Eiko Maekawa pela amizade incondicional, pela sinceridade, pelas conversas até a madrugada, pelos vários incentivos, pelas orientações, tanto de vida, quanto profissionais. Obrigada por tudo amiga!

À Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito, sempre solícita e disposta a ajudar, pela amizade, carinho e toda atenção quando precisei.

Ao Prof. Dr. Miguel Angel Castillo Salgado pela oportunidade de eu realizar estágio docência na Disciplina de Histologia e Embriologia.

À Profa. Dr. Marianne Spalding pela amizade, carinho, oportunidade e ensinamentos durante meu primeiro ano de graduação e durante o estágio docência.

Ao Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge e à Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira pelo cuidado e atenção ao meu aprendizado.

Ao Prof. Carlos Rocha Gomes Torres pela orientação nos trabalhos.

Ao Prof. Ivan Balducci, pela paciência e colaboração nas análises estatísticas dos diversos trabalhos que realizamos.

Às amigas e companheiras de Mestrado da Disciplina de Endodontia, durante todo o curso, nas horas boas e nas horas de desespero, pela amizade, conversas e confraternizações: Aletéia Massula de Melo Fernandes, Ana Cláudia Carvalho Xavier, Claudia Villela Bin, Flávia Goulart da Rosa Cardoso, Gleyce Oliveira Silva, Mariana Diehl Figueiredo, Nadia de Souza Ferreira, Patrícia Campos Ferreira da Rosa, Raffaella Di Iorio Jeronymo, Sílvia Bicalho Rabêlo e Tatiana Rocha de Oliveira. Muito obrigada por tudo!

Ana, minha companheira e dupla mais animada durante todo o Mestrado. Claudinha e Raffa, minhas amigas pessoais,

por todo o carinho e preocupação. Glê e Tatis, pelo carinho e sorrisos. Nádia e Paty, pela conversas, risadas e preocupações. Sylvinha, pela paciência!

Em especial, não posso deixar de mencionar minhas amigas Flavinha e Mariana. Vocês foram muito especiais e não tenho palavras para agradecer todo o apoio e todos os desabafos, tanto nos momentos de alegria e, principalmente, nos momentos de tristeza. Pelas risadas, pela ajuda até a hora que precisei, mesmo durante as madrugadas. Pelas viagens a São Paulo, a Piracicaba, pelo cansaço que as fiz passar, por tudo... obrigada... Mari, minha querida "Jane", amiga sincera, sempre. Por sua dedicação surpreendente que um dia espero poder recompensá-la à altura. Você foi um anjo que caiu do céu e cuidou de mim.

Aos amigos Marcos Sérgio Endo e Frederico Canato Martinho, pela paciência em nos ensinar, pela disponibilidade de tempo para nos ajudar mesmo quando estavam cheios de compromissos, pelas conversas e bom humor, sempre, por toda a consideração. Sem vocês não teríamos conseguido concluir este trabalho.

Aos companheiros durante o curso de Mestrado: Guilherme Rodrigues Teodoro, Jônatas Rafael de Oliveira, Luciana Marcondes Sarmiento Torres, Marta Magewsky, Polyana das Graças Figueiredo Vilela, Rodrigo Simões de Oliveira e Taciana Marco Ferraz Caneppele.

À minha amiga Thaís Cachuté Paradella que contribuiu para meu crescimento durante a graduação e que, hoje, tornou-se minha amiga.

Às alunas e ex-alunas Carolina Lima de Oliveira, Carolina Veiga Baliero, Gláucia Gonçalves Faro, Manuella da Silva Oliveira, Mariana de Oliveira França, Rosemary Soares de Santana, Sarah Almeida Coelho de Oliveira, Stephanie Francine Pereira e Thaís Sayuri Motoori pelas conversas e pela convivência harmoniosa e de respeito durante os

trabalhos de Iniciação Científica, colaborando para meu amadurecimento tanto profissional como pessoal.

À secretária do Departamento de Odontologia Restauradora Rosângela da Silva de Melo, pela simpatia e sempre disposta a ajudar, mesmo quando estava muito ocupada.

Às técnicas de laboratório Fernanda Maria de Brito Cunha e Josiana Maria Alves Carneiro, pela convivência e conversas, por serem sempre atenciosas e prestativas.

Aos técnicos de laboratório Walter Cruz, pela amizade, carinho, boa vontade e consideração sempre. Sérgio Giovanny Alves e Domingos Gonçalves Pontes, pelas conversas no laboratório, pela convivência e cumplicidade, que deixavam nossos trabalhos mais rápidos e divertidos.

À dona Marinete, pela alegria diária e pelos cafezinhos da Restauradora.

À Erena Michie Hasegawa, Rosemary de Fátima Salgado e ao Bruno Shiguemitsu Marques Tanaka, da secretária da Pós-graduação, pelas informações e toda a colaboração da parte burocrática durante todo o curso de Mestrado.

À equipe da biblioteca, em especial à Silvana Alvarez, por toda a ajuda para elaboração de minha dissertação.

Ao Carlos Alberto Guedes, pelas orientações e pela paciência nos projetos e relatórios da FAPESP.

À FAPESP e à CAPES, pelo auxílio financeiro prestado durante o curso de Mestrado.

E a todos aqueles que participaram de alguma forma em minha vida, para meu crescimento pessoal e profissional durante todo o curso de Mestrado e, que colaboraram de alguma maneira, para que este trabalho fosse finalmente concluído, agradeço de coração!

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Microrganismos detectados em canais radiculares.....	20
2.2 Endotoxinas.....	28
2.3 Hipoclorito de sódio.....	35
2.4 Digluconato de clorexidina.....	39
2.5 <i>Zingiber officinale</i>	44
3 PROPOSIÇÃO	49
4 MATERIAL E MÉTODO	50
4.1 Seleção de pacientes.....	50
4.2 Seleção de dentes	51
4.3 Divisão dos grupos experimentais.....	52
4.4 Intervenção Odontológica	52
4.5 Primeira Coleta	54
4.6 Preparo Biomecânico	55
4.7 Segunda Coleta	58
4.8 Medicação Intracanal por 14 dias	58
4.9 Terceira Coleta	60
4.10 Obturação dos Canais Radiculares	60
4.11 Análise Microbiológica	62
4.11.1 Cultura dos microrganismos	62
4.11.2 Análise por PCR	65
4.11.2.1 Extração do DNA bacteriano	66

4.11.2.2 Reação de PCR	66
4.11.2.3 Eletroforese em gel de agarose.....	70
4.12 Quantificação de endotoxinas do canal radicular pelo teste cinético cromogênico (QCL) do lisado de amebócitos de <i>Limulus</i> (LAL).....	71
4.13 Análise Estatística	73
5 RESULTADOS	74
5.1 Aspectos clínicos e radiográficos.....	74
5.2 Análise microbiológica.....	78
5.2.1 Método de cultura microbiológica.....	78
5.2.2 Método molecular PCR.....	88
5.3 Quantificação de endotoxinas.....	96
6. DISCUSSÃO.....	100
6.1 Microbiológico	100
6.2 Endotoxinas.....	111
7 CONCLUSÃO.....	115
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116
APÊNDICES.....	134
ANEXO.....	155

Chung A. Detecção de microrganismos, quantificação de endotoxinas e ação *in vivo* do *Zingiber officinale* em dentes com necrose pulpar e lesão periapical [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2011

RESUMO

A proposta deste trabalho foi detectar microrganismos e avaliar *in vivo* a ação do extrato glicólico de gengibre 20% (GENG), do hipoclorito de sódio 1% (NaOCl), da clorexidina gel 2% (CLX) como soluções irrigadoras e da medicação intracanal (MIC) de hidróxido de cálcio sobre microrganismos e endotoxinas em dentes com necrose pulpar e lesão periapical. Para isso 36 pacientes portadores de dente com necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente foram submetidos ao tratamento endodôntico e divididos em 3 grupos (n=12), de acordo com a substância química auxiliar utilizada durante o preparo biomecânico: GENG; NaOCl ou CLX intercalado com solução salina fisiológica. Foram realizadas coletas do conteúdo do canal radicular com cones de papel absorvente após a abertura do dente, após a instrumentação e, após 14 dias da ação da MIC. Para todas as coletas foram realizados os seguintes testes: a) avaliação da atividade antimicrobiana pela contagem de UFC/mL e método molecular – PCR e; b) análise da quantidade de endotoxina verificada pelo lisado de amebócitos de *Limulus*. Os resultados foram submetidos à análise descritiva e estatística de *Kruskal-Wallis* e teste de *Dunn*. Os resultados mostraram presença de DNA bacteriano em todas as coletas, sendo que *Parvimonas micra* foi a espécie mais frequente. A instrumentação com as substâncias testadas reduziram significativamente microrganismos e endotoxinas dos canais radiculares. A utilização da MIC não foi capaz de potencializar os efeitos antimicrobianos nem sobre endotoxinas. Pôde-se concluir que o preparo biomecânico com GENG foi eficiente tanto em reduzir microrganismos quanto endotoxinas dos canais radiculares. A MIC de Ca(OH)_2 não foi capaz de potencializar a neutralização de endotoxinas após PBM.

Palavras-chave: Endotoxinas. *Zingiber officinale*. Irrigantes do Canal Radicular. Reação em Cadeia da Polimerase.

Chung A. *Detection of microorganisms, quantification of endotoxins and in vivo action of Zingiber officinale in teeth with necrotic pulp and periapical lesion [dissertation].* São José dos Campos: São Paulo State University, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2011

ABSTRACT

The purpose of this study was to detect microorganisms and to evaluate in vivo the action of 20% ginger glycolic extract (GENG), 1% sodium hypochlorite (NaOCl) and 2% chlorhexidine gel (CLX) as irrigating solutions and intracanal medication (ICM) of calcium hydroxide on microorganisms and endotoxins in teeth with necrotic pulp and periapical lesions. Thirty six patients with tooth with pulp necrosis and radiographically visible periapical lesion were submitted to endodontic treatment and divided into 3 groups (n = 12), according to the auxiliary chemical substance used during the biomechanical preparation: GENG, NaOCl or CHX interspersed with saline solution. Samples of the root canal were taken with paper cones immediately after exposure of the canal, immediately after instrumentation and 14 days after MIC. For all samples were performed the following tests: a) evaluation of antimicrobial activity by counting the CFU / mL and molecular method - PCR and b) quantification of endotoxins verified by the Limulus amoebocyte lysate. The results showed the presence of bacterial DNA in all samples, and Parvimonas micra was the most frequent species. The instrumentation with all substances tested reduced significantly microorganisms and endotoxins from root canals. The use of ICM was not able to potentiate the antimicrobial effects either on endotoxins. It was concluded that biomechanical preparation with glycolic extract of ginger was effective in reducing microorganisms and endotoxins from root canals with no significant differences from NaOCl or chlorhexidine. The Ca(OH)₂ ICM could not enhance the neutralization of endotoxins after biomechanical preparation.

Keywords: Endotoxin. Zingiber officinale. Root Canal Irrigants. Polimerase Chain Reaction.

1 INTRODUÇÃO

Desde a década de 80, os avanços tecnológicos na cultura e identificação microbiológica mostraram que, em canais radiculares de dentes portadores de necrose pulpar e lesão periapical crônica, predominam microrganismos anaeróbios (Sundqvist et al., 1979; Vafaie et al., 1999; Leonardo et al., 2000). Isto porque muitos fatores influenciam o crescimento e a colonização dos canais radiculares por microrganismos, como a disponibilidade de nutrientes, a tensão de oxigênio que vai diminuindo conforme o aprofundamento nos canais radiculares e as interações entre os microrganismos, proporcionando, com o passar do tempo, a seleção da microbiota no interior do sistema de canais radiculares (Seltzer, Farber, 1994).

Diversos estudos (Gomes et al., 1994; Seltzer, Farber, 1994; Siren et al., 1997; Jacinto et al., 2003; Pinheiro et al., 2003; Gomes et al., 2005; Gomes et al., 2008) observaram maior prevalência de microrganismos anaeróbios em canais com lesões endodônticas. Deste modo, o conhecimento desses microrganismos é de fundamental importância para entender o processo infeccioso bem como o sucesso do tratamento.

No entanto, espécies anaeróbias não são detectadas nos estudos de dentes com insucesso do tratamento que utilizam apenas os métodos de cultura microbiológica, sendo regularmente detectadas pelos métodos moleculares (Gomes et al., 2005). Outros estudos em microbiologia também mostraram que a microbiota de canais com polpa necrosada não é constituída apenas por espécies facilmente identificadas pela cultura de microrganismos como *Enterococcus faecalis* e *Parvimonas micra*, mas inclusive espécies dificilmente detectadas por semeadura, em

especial os fastidiosos, como *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium alocis* e *Tannerella forsythia* que podem ser facilmente detectadas pelo método molecular, estando esses microrganismos envolvidos na patogenicidade dos insucessos endodônticos, especialmente se estes desenvolverem uma relação de sinergismo (Gomes et al., 2008). Por estes microrganismos serem bastante sensíveis ao oxigênio, durante o processamento das amostras os microrganismos podem morrer, impedindo, assim, seu crescimento nas placas de cultura microbiana, apresentando resultados falso-negativos. Além disso, a quantidade encontrada nas amostras pode ser muito pequena, sendo insuficiente para promover sua detecção pelo método de cultura (Siqueira, Rôças, 2005). O método molecular da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) é capaz de detectar DNA de microrganismos presentes na amostra, mesmo em mínimas quantidades. Por este método ser mais sensível, a detecção desses microrganismos não identificados em cultura pode ser realizada, melhorando os estudos em microbiologia e, conseqüentemente, o entendimento da etiologia das lesões pulpares e periapicais, bem como a adoção de adequado protocolo para os tratamentos endodônticos.

Além disso, grande parte destes microrganismos anaeróbios são bactérias Gram-Negativas, que contém endotoxina em sua parede celular, a qual é composta de polissacarídeos, lipídeos e proteínas, podendo ser chamada também de lipopolissacarídeo (LPS). O lipídio A é a região tóxica da molécula de endotoxina, responsável por seus efeitos tóxicos. As endotoxinas têm potente ação citotóxica e são liberadas durante a multiplicação ou morte bacteriana, causando uma série de efeitos biológicos que levam a uma reação inflamatória, imunológica e reabsorção óssea periapical (Wang, Stashenko, 1993, Leonardo et al., 2004).

O preparo biomecânico tem como objetivo obter a limpeza e desinfecção do sistema de canais radiculares, entretanto, é possível que, mesmo após a remoção dos microrganismos e produtos tóxicos, endotoxinas, capazes de induzir ou manter lesões periapicais, permaneçam no sistema de canais radiculares, predispondo o caso ao insucesso (Leonardo, 2005).

Durante o preparo biomecânico, várias substâncias químicas têm sido utilizadas como soluções irrigadoras. Devido a uma série de propriedades, como capacidade de dissolver matéria orgânica, ação lubrificante e neutralização de conteúdo tóxico, o hipoclorito de sódio é atualmente a substância mais utilizada durante a instrumentação e irrigação de canais radiculares (Siqueira Jr et al., 2000; Valera et al. 2001; Estrela et al., 2003; Menezes et al., 2004; Leonardo, 2005; Tanomaru et al., 2005). Entretanto, a utilização de altas concentrações do hipoclorito de sódio pode causar irritação aos tecidos periapicais (Soares et al., 2003; Leonardo, 2005). Por este motivo, soluções alternativas têm sido propostas visando a associação de efetividade antimicrobiana e biocompatibilidade.

Outra substância que tem sido utilizada é a clorexidina 2%, principalmente em função de seus efeitos antimicrobianos e efeito residual (Ferreira et al., 2002; Menezes et al., 2004; Leonardo, 2005; Tanomaru et al., 2005; D'Arcangelo et al., 2007; Ferraz et al., 2007). Embora essas substâncias químicas (hipoclorito de sódio e clorexidina) sejam comumente utilizadas na prática endodôntica, estas não demonstraram efetividade sobre a endotoxina durante o preparo biomecânico do canal radicular (Tanomaru et al., 2003; Oliveira et al., 2005a). Valera et al. (2010) verificaram a efetividade destas substâncias sobre microrganismos, entretanto, estas não foram capazes de inativar completamente as endotoxinas.

Atualmente, verifica-se um crescente aumento nos estudos e no uso de fitoterápicos na área médica. Extratos ou chás de

diversas plantas são utilizados na medicina popular desde épocas remotas, entretanto, suas reais propriedades e aplicações estão sendo cientificamente avaliadas, havendo estudos utilizando estas plantas com efeitos comprovados cientificamente, permitindo sua aplicação na medicina. Métodos alternativos de tratamento, utilizando substâncias naturais, têm despertado um crescente interesse em outras áreas biológicas, inclusive na Odontologia (Oliveira et al., 2005; Valera et al., 2009; Chung et al., 2010; Cardoso et al., 2010; Xavier et al., 2010; Valera et al., 2010).

O *Zingiber officinale*, conhecido como gengibre, já é largamente utilizado como condimento em bebidas alcoólicas, na alimentação e, inclusive, para tratamento de artrite, reumatismo, dores musculares, dores de garganta, constipação, indigestão, vômitos, hipertensão, febre, doenças infecciosas, dentre outros (Afzal et al., 2001; Chrubasik et al., 2005; Ali et al., 2008). As principais ações farmacológicas do gengibre e seus compostos isolados incluem propriedades imuno-modulatórias, anti-tumorigênicas, anti-inflamatórias, anti-apoptóticas, anti-hiperglicêmicos, antieméticos e cicatrizantes (Afzal et al., 2001; Pereira et al., 2003; Chrubasik et al., 2005; Grégio et al., 2006; Aimbire et al., 2007; Kim et al., 2007; Ali et al., 2008; Fouda e Berika, 2009), além de ser um potente antioxidante considerado um seguro fitoterápico para ser utilizado como medicamento, com poucos e insignificantes efeitos adversos (Ali et al., 2008).

Potente ação citotóxica sobre células humanas cancerígenas e inibição de proliferação de células cancerígenas em ovário de ratos também pôde ser observada (Kim et al., 2008). Alguns autores (Grégio et al., 2006; Indu et al., 2006; Park et al., 2008) comprovam ainda, ação do extrato glicólico e alcoólico do gengibre sobre bactérias como *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* e, inclusive sobre *Candida albicans*, indicando sua ação antibacteriana e

antifúngica. Estudos *in vitro* (Cardoso et al., 2010; Chung et al., 2010; Maekawa et al., 2010) em canais radiculares mostram sua efetiva atividade antimicrobiana e na redução de endotoxina de *Escherichia coli*.

Entretanto, mesmo após a utilização de substâncias químicas auxiliares com ação antimicrobiana durante o preparo biomecânico, alguns microrganismos e endotoxinas podem permanecer no sistema de canais radiculares, túbulos dentinários e crateras de reabsorção apical (Oguntebi, 1994; Peters et al., 2001; Matsuo et al., 2003), sendo indicado o uso da medicação intracanal para complementar a ação antimicrobiana.

O hidróxido de cálcio tem sido amplamente utilizado como medicação intracanal devido às suas propriedades antimicrobianas (Siqueira Junior e Uzeda, 1996; Leonardo et al., 2000), capacidade de induzir a mineralização (Leonardo, 2005), e principalmente efetiva ação sobre LPS (Nelson Filho et al., 2002; Silva et al., 2002; Ferreira, 2003; Tanomaru et al., 2003; Leonardo et al., 2004; Oliveira et al., 2005b), por meio da hidrólise da porção lipídica da endotoxina, neutralizando seus efeitos biológicos (Safavi e Nichols, 1994). Assim, para realização do estudo *in vivo*, optou-se por utilizar a medicação intracanal com hidróxido de cálcio, gerando maior segurança clínica para realização do estudo em dentes humanos.

Uma vez que o extrato glicólico de gengibre mostrou resultados satisfatórios *in vitro* (Maekawa et al. 2009; Cardoso et al., 2010; Chung et al., 2010; Maekawa et al., 2010) e este produto já ser amplamente utilizado na medicina popular, a avaliação *in vivo* desta substância poderá mostrar resultados que comprovem seus efeitos na prática clínica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Microrganismos detectados em canais radiculares

A relação direta entre microrganismos e presença de patologias de origem endodôntica pôde ser estabelecida quando Kakehashi et al., em 1965, desenvolveram um experimento com ratos *germ-free* e convencionais. Os ratos tiveram a polpa dos primeiros molares superiores expostas à alimentação esterilizada. Após 18 dias, verificaram que no grupo convencional, os dentes apresentaram tecido pulpar totalmente necrosado, com tecido inflamatório crônico e formação de abscesso na região periapical. Já no grupo *germ-free*, foi observado apenas um mínimo infiltrado inflamatório, reparo da polpa dentária por deposição de dentina neoformada na área de exposição e ausência de formação de abscesso, concluindo que os microrganismos estão diretamente ligados à etiologia das alterações pulpares e periapicais.

Möller et al. (1981), com o objetivo de confirmar o papel exercido pelos microrganismos na etiopatogenia das lesões perirradiculares, induziram de forma asséptica e séptica, necrose em dentes de macacos após 6 e 7 meses. As análises clínica, radiográfica, microbiológica e histológica evidenciaram nos casos de polpas necrosadas e não infectadas, tecidos perirradiculares desprovidos de inflamação e indícios de reparação, enquanto nos dentes com polpa infectada, houve sempre o desenvolvimento de lesões perirradiculares.

Assim, o entendimento da relação entre microrganismos e patologias de origem endodôntica torna-se fundamental para sucesso do tratamento endodôntico. Estudos pioneiros puderam identificar tipos

morfológicos básicos de células bacterianas, tais como cocos, bacilos e espirilos (Miller, 1894).

Com o avanço da tecnologia, microrganismos de difícil cultura puderam ser identificados pelo método molecular. Diversos estudos (Siqueira Jr, Roças, 2003; Gomes et al., 2004; Siqueira Jr, Roças, 2004; Gomes et al., 2005; Martinho et al., 2010) tem identificado microbiota de canais radiculares pelo método molecular. Resultados satisfatórios obtidos por este método têm melhorado cada vez mais as terapias endodônticas, sendo possível correlacionar presença de determinados microrganismos, em especial microrganismos anaeróbios estritos Gram-Negativos (Mattison et al., 1987; Seltzer, Farber, 1994; Vafaie et al, 1999; Leonardo et al., 2000; Leonardo et al., 2004) com sinais e sintomas clínicos, além de correlacionar bactérias com presença de fístulas e reabsorções.

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), desenvolvida pelo geneticista Kary Mullis em 1993, baseia-se no processo de replicação de DNA *in vitro*. Esta técnica faz parte integrante da moderna biotecnologia molecular, tendo trazido um enorme progresso em diferentes áreas como no diagnóstico de doenças e medicina forense entre muitas outras para além da investigação em biologia.

Durante a PCR são usadas elevadas temperaturas de forma a separar as moléculas de DNA em duas cadeias simples, permitindo então a ligação de oligonucleotídeos iniciadores, conhecidos como *primers*. Altas temperaturas são utilizadas para separar as moléculas de DNA em duas cadeias simples. Esses *primers*, geralmente constituídos por 15 a 30 nucleotídeos, são obtidos por síntese química, e se ligam também em cadeia simples. Para amplificar uma determinada região são necessários dois iniciadores complementares das seqüências que flanqueiam o fragmento de DNA a amplificar, nos seus terminais 3', de modo a permitir a atuação da DNA polimerase durante a síntese da

cadeia complementar, usando como referência cada uma das duas cadeias simples constituintes do DNA a ser amplificado.

Para isso, são necessárias pequenas quantidades do DNA alvo adicionado a uma solução contendo um tampão salino, a DNA polimerase, oligonucleotídeos iniciadores, os quatro desoxinucleotídeos constituintes do DNA (dNTPs) e o cofactor Mg^{2+} . Esta mistura é submetida a vários ciclos de amplificação que consistem em desnaturar o DNA alvo pelo calor (tipicamente 1 minuto a 94-96°C) de modo a separar as duas cadeias e associar os iniciadores (*primers*) à sequência de DNA alvo por ligações de hidrogênio em cadeia simples. Para isso, a mistura de reação é aquecida (tipicamente a temperaturas entre 50 e 65°C, durante 1 minuto; a temperatura a usar depende da proporção de desoxinucleotídeos “G” e “C” da sequência a amplificar) e a extensão ocorre através da síntese complementar à cadeia de referência, catalisada pela DNA polimerase (tipicamente 1 minuto a 72°C).

O processo envolvendo estes três passos pode ser repetido várias vezes (25 a 30 ciclos) sendo possível aumentar, em cada ciclo, duas vezes a concentração de DNA pré-existente.

Microrganismos anaeróbios facultativos, tais como *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* e *Enterococcus* spp., *Staphylococcus epidermidis*, *Lactobacillus* spp., *Pseudomonas* spp. e *Candida albicans* foram frequentemente isolados de canais radiculares infectados (Seltzer e Farber, 1994; Siqueira e Uzeda, 1997; Waterman *et al.*, 1998). No estudo de Vafaie *et al.* (1999) foi confirmado que a microbiota encontrada nas lesões periapicais com envolvimento endodôntico são de natureza polimicrobiana, em especial, de espécies fastidiosas.

Gomes *et al.* (2005) realizaram um estudo a fim de verificar a presença de 4 microrganismos (*P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. intermedia*, e *P. nigrescens*) anaeróbios estritos utilizando método de cultura e molecular. Foi realizado, para cada coleta, isolamento

microbiano e testes bioquímicos, além da PCR. Todos os microrganismos avaliados foram mais frequentes em dentes com lesão primária do que em dentes com lesão secundária, sendo *P. gingivalis* o mais freqüente. O método molecular de PCR por ser mais sensível, foi capaz de detectar essas espécies de coloração escura enquanto que, pelo método de cultura, a mesma bactéria não pôde ser detectada.

Vafaie et al. (1999), identificaram microrganismos presentes no terço apical de dentes com lesão refratária e sintomatologia dolorosa que necessitavam intervenção cirúrgica pelo método molecular. Apicectomia foi realizada em condições assépticas para posterior extração de DNA. Foi utilizado o método *checkerboard* de hibridização DNA-DNA para identificação dos microrganismos e espécies do tipo actinomicetes foram verificadas em todos os espécimes. *Fusobacterium nucleatum* e *Streptococcus oralis* também foram identificados, confirmando que as infecções endodônticas são de natureza polimicrobianas e primariamente anaeróbias, estando estes microrganismos relacionados com sintomatologia dolorosa.

Noutro estudo semelhante, envolvendo coleta de material proveniente de terços apicais de raízes de dentes com necessidade de intervenção endodôntica cirúrgica, Subramanian e Mickel (2009) analisaram, também pelo método molecular, a microbiota encontrada nessas lesões. Trinta e quatro pacientes participaram desta pesquisa, onde o terço apical foi removido e a região subjacente curetada. As amostras foram armazenadas em solução salina fisiológica e DNA foi extraído. Todas as amostras foram submetidas à análise por PCR em tempo real e 16 amostras foram submetidas à clonagem e sequenciamento para identificação bacteriana. Os resultados mostraram presença de grande quantidade de bactérias de difícil cultivo em placas de agar. *Enterococcus faecalis* e *Burkholderia cepacia* foram os mais encontrados em ambas as amostras. *Campylobacter gracilis* e *Streptococcus gordonii* estavam associados aos terços apicais das raízes,

onde *Parvimonas micra*, dentre outros estavam associados aos tecidos periapicais. Concluíram neste estudo que a microbiota presente nos terços apicais e nos tecidos periapicais difere quanto às espécies, sendo que os microrganismos encontrados são de difícil crescimento em cultura microbiológica e mais frequentemente detectados por métodos moleculares.

Muitos microrganismos também foram identificados na literatura associados a sinais e sintomas clínicos. Bactérias *Bacteroides* spp. foram encontradas em casos positivos à sintomatologia, sendo capazes de desenvolver infecções transmissíveis (Sundqvist et al., 1979). No estudo de Sundqvist et al. (1979) associações bacterianas isoladas de canais necróticos sintomáticos e assintomáticos foram inoculadas em subcutâneo de porcos. Bactérias isoladas de canais com infecções purulentas foram capazes de induzir inflamação transmissível, diferindo das bactérias isoladas de dentes assintomáticos. Todas as associações bacterianas induziram inflamação aguda com acúmulo de polimorfonucleares e formação de abscessos.

Diversas bactérias anaeróbias estritas foram identificadas por Yoshida et al. (1987) verificando correlação positiva entre o crescimento de bactérias e sintomas clínicos. *Peptococcus magnus* e espécies do gênero *Bacteroides* foram encontrados nos casos de sintomatologia aguda, enquanto estreptococos orais e bactérias entéricas foram isoladas em casos clinicamente assintomáticos.

Mattison et al. (1987) realizaram um estudo com endotoxinas de *Eikenella corrodens* inoculadas em pré-molares de cães, cujos controles radiográficos e exames sanguíneos foram realizados por 12 semanas. Análise histológica mostrou severo infiltrado inflamatório e reabsorção óssea nos dentes cuja endotoxina de *Eikenella corrodens* foi inoculada e nenhum anticorpo foi detectado nos exames sanguíneos. Assim, os autores concluíram que endotoxinas de bactérias Gram-

Negativas são iniciadores e perpetuadores da inflamação e destruição óssea nas lesões endodônticas.

Seltzer e Farber (1994) realizaram revisão de literatura sobre os componentes bacterianos tais como endotoxinas e outros componentes da parede celular bacteriana no desenvolvimento das lesões periapicais, correlacionando novos achados microbiológicos com sinais e sintomas clínicos. Neste estudo explicam também a importância das novas técnicas de identificação pelo método molecular e da cultura de anaeróbios na endodontia.

Pinheiro et al. (2003) identificaram cerca de 38 espécies de microrganismos presentes em 60 canais radiculares com necessidade de retratamento endodôntico. Para a coleta das amostras, os canais foram desobturados sem irrigação. Após, as amostras foram semeadas a fim de permitir crescimento de microrganismos anaeróbios. Em seguida, foi realizado isolamento e identificação pelo método bioquímico, sendo identificados, dentre outros, *E. faecalis*, *P. micra*, *P. intermedia* e *P. nigrescens*. Observou-se neste estudo predominância de microrganismos Gram-Positivos, em especial *E. faecalis*. Além disso, microrganismos anaeróbios estritos foram frequentes nos casos de sintomatologia dolorosa.

Gomes et al. (2004) analisaram microbiologicamente canais radiculares infectados com e sem tratamento endodôntico prévio, correlacionando bactérias encontradas com os sinais e sintomas clínicos. Foram realizadas coletas de 41 dentes com necrose pulpar e 19 dentes com necessidade de retratamento endodôntico. As amostras foram semeadas e isolamento dos microrganismos e identificação microbiológica pelo método bioquímico foram realizados. Os resultados indicam que o quadro clínico apresentado pelos pacientes está relacionado a interações de várias espécies microbianas. Os microrganismos encontrados em infecções primárias diferem das infecções secundárias em quantidade e espécies, sendo que nas

infecções primárias, espécies Gram-Positivas e Gram-Negativas foram encontradas, especialmente anaeróbios. Já nas infecções secundárias espécies do tipo anaeróbias facultativas e Gram-Negativas foram mais encontradas.

Chu et al. (2005) identificaram microrganismos em dentes com infecção endodôntica primária com e sem exposição pulpar. Foram avaliados 45 canais com polpas expostas e 43 sem exposição. Dos canais com câmara exposta foi identificado um total de 211 microrganismos representados em 68,9% de anaeróbios estritos, pertencendo a 28 diferentes gêneros e 55 espécies. Em média 4,6 espécies foram isoladas por canal radicular (variando entre 1 e 10 espécies). Os microrganismos isolados mais freqüentes foram *Prevotella* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Actinomyces* spp. e *Campylobacter* spp. Nos canais sem exposição, um total de 185 microrganismos foi identificado, representados por 68,5% de microrganismos anaeróbios estritos.

Foschi et al. (2005) avaliaram a presença de bactérias seletivas em canais radiculares de dentes com periodontite apical associando estas espécies bacterianas com os sinais e sintomas clínicos. Adequada anamnese foi realizada a fim de coletar dados como dor a palpação e percussão. Foram realizadas coletas do conteúdo do canal radicular de 62 dentes com cones de papel e as amostras foram submetidas à análise por PCR. *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* foram detectadas, sendo que *T. denticola* estava associada com presença de reabsorção óssea e *E. faecalis* foi identificado em casos de insucesso do tratamento endodôntico. Isto sugere que essas espécies bacterianas têm papel importante nas patologias endodônticas.

Gomes et al. (2008) identificaram por PCR microrganismos presentes em dentes com lesão periapical de dentes tratados endodonticamente e correlacionaram a presença desses

microrganismos com sinais e sintomas. A metodologia utilizada consistiu em coletas com cones de papel dos canais acessados. Os cones foram armazenados em VMGAIII e DNA foi extraído. Após, foi realizada amplificação pelo método PCR e leitura em gel de eletroforese. Os resultados indicaram que *E. faecalis* e *Parvimonas micra* foram os microrganismos mais frequentes. *Treponema denticola* e *P. micra* estavam associados aos casos de dor a percussão, *Prevotella nigrescens* associado aos casos de dor espontânea e abscessos e *P. nigrescens* e *Porphyromonas endodontalis* a exsudatos purulentos.

Uma vez que foi estabelecida relação direta entre presença de microrganismos e lesões periapicais, questionamentos sobre contaminação de dentes hígidos traumatizados podem surgir. No estudo de MacDonald et al. (1957) foram identificadas presença de bactérias em polpas necrosadas de dentes traumatizados, sugerindo possível contaminação pela circulação sanguínea sistêmica ou via linfática e vasos sanguíneos do periodonto. Bergenholtz (1974), ao investigar ocorrência de bactérias em 84 dentes traumatizados, relatou que 64% das amostras apresentaram cultura positiva com características polimicrobianas. Destas amostras, 78% apresentaram microrganismos anaeróbios estritos, pertencentes aos gêneros *Bacteroides* (n=62), *Peptostreptococcus* (n=27), *Fusobacterium* (n=26) e *Corynebacterium* (n=45).

Sundqvist (1976) constatou microrganismos anaeróbios estritos em 90% das cepas bacterianas isoladas de 32 canais radiculares de dentes unirradiculares com coroas hígidas e polpas necrosadas em decorrência de trauma.

2.2 Endotoxinas

Visto que relação direta entre microrganismos e presença de patologias de origem endodôntica pôde ser estabelecida por Kakehashi et al. (1965) e que bactérias anaeróbias Gram-Negativas tem papel importante na etiologia das doenças pulpares e periapicais, Horiba et al. (1991) concluíram que a presença de endotoxinas em canais radiculares está diretamente relacionada a sinais e sintomas clínicos sugestivos dos problemas endodônticos. Correlação entre presença de rarefações ósseas periapicais e endotoxinas também pôde ser verificada (Dahlén et al., 1981; Horiba et al., 1991).

Endotoxinas, também conhecidas como lipopolissacarídeo (LPS), são moléculas encontradas nas paredes celulares de bactérias Gram-Negativas, as quais são secretadas em vesículas durante a fase de crescimento bacteriano ou liberadas durante a morte celular. Bactérias produzem LPS para se reproduzir, proteger de agressões externas, para servir de arcabouço e até para diminuir a permeabilidade da membrana podendo explicar a causa de maior resistência a determinados antibióticos (Rietschel et al., 1992). O LPS é formado por lipídeo A, polissacarídeo central e cadeia polissacarídea lateral O (antígeno O), sendo que o lipídeo A é a porção efetivamente tóxica da molécula de LPS, causando respostas imunológicas específicas. As endotoxinas não causam lesões celulares ou teciduais diretamente, no entanto, elas estimulam células competentes como macrófagos, neutrófilos e fibroblastos desencadeando a liberação de um grande número de mediadores químicos inflamatórios bioativos ou citocinas, causando uma série de efeitos biológicos que levam a uma reação inflamatória, imunológica e reabsorção óssea periapical (Mattison et al., 1987; Yamasaki et al., 1992; Wang e Stashenko, 1993, Leonardo et al., 2004). Esta reação ocorre devido a uma ligação entre a endotoxina e o

receptor CD-14 na superfície de monócitos e macrófagos, desencadeando liberação de citocinas, tais como interleucinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8) (Matsushita et al., 1999), Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) e metaloproteinases, que estão ligados à destruição da matriz extracelular e reabsorção óssea periapical, estimulando também terminações nervosas dos tecidos periapicais, conduzindo à dor (Seltzer e Farber, 1994, Leonardo et al., 2004). Endotoxinas também induz febre, ativa o sistema complemento da inflamação aumentando a permeabilidade vascular, a quimiotaxia para macrófagos e neutrófilos, liberando lisosimas e ativando o ciclo metabólico do ácido araquidônico, além de ser mutagênico para células de linfócitos B (Morrison e Kline, 1977).

Horiba et al., em 1992, estudaram a ativação do sistema complemento pelo LPS extraído de *P. endodontalis*, *F. nucleatum* e *Veillonella parvula*. Quantificação de C3 foi utilizada para avaliar ativação do sistema complemento pelo LPS, concluindo que a taxa de consumo do componente C3T do sistema complemento aumentou muito quando em contato com 10 μ g de LPS.

Além da reação inflamatória, o LPS adere-se de forma irreversível nos tecidos mineralizados da região apical e periapical (osso e cimento) (Schein e Schilder, 1975), agindo como um potente estimulador da reabsorção óssea.

Diversos estudos comprovaram a correlação positiva entre presença de endotoxinas e rarefações ósseas periapicais, por meio de inoculação de endotoxinas de determinadas bactérias, tais como *Salmonella minnesota* (Pitts et al., 1982) e *E. coli* (Mattison et al., 1987; Nelson Filho et al., 2002).

Dahlen et al. (1981) inocularam em 27 dentes de macacos LPS da bactéria *F. nucleatum*. Após 3 e 7 meses da inoculação de LPS, os dentes e a região óssea periapical foram analisadas radiograficamente e os canais acessados para comprovação da

esterilidade dos dentes. Reações enzimáticas histoquímicas foram observadas. Reações inflamatórias ocorreram nos tecidos periapicais de todos os dentes cujo LPS foi inoculado, com reabsorção óssea e radicular. Mesmo nos locais onde a reação inflamatória foi baixa, células mostraram atividade enzimática sugestivas de reabsorção. Os dentes do grupo controle mostraram nenhuma ou muito baixa reação enzimática.

Pitts et al. (1982) injetaram em dentes de cães endotoxina extraída de *Salmonella minnesota*. Controles radiográficos foram realizados e após 4 a 5 semanas, os cães foram sacrificados para processamento das amostras e análise histológica. Os resultados indicaram grande destruição óssea e maior resposta inflamatória em comparação com o grupo controle (sem endotoxina), sendo células polimorfonucleares mais encontradas.

Nelson Filho et al. (2002) inocularam em dentes de cães endotoxinas para avaliar radiograficamente seu efeito, associado ou não ao hidróxido de cálcio. Para isso, 3 cães foram submetidos aos 4 tratamentos, sendo cada tratamento realizado em cada hemiarco: G1-inoculação de endotoxina; G2-endotoxina + hidróxido de cálcio; G3-preenchimento com solução salina e G4-exposição do canal a cavidade bucal por 5 dias sem nenhum tratamento. Análises radiográficas mostraram presença de rarefação óssea periapical nos grupos 1 e 4. A lâmina dura permaneceu intacta nos grupos 2 e 3, indicando que o Ca(OH)_2 foi capaz de neutralizar efeitos da endotoxina.

Oliveira et al. (2005) analisaram a difusão da endotoxina até o cimento através dos túbulos dentinários. Trinta dentes extraídos foram previamente instrumentados e foi realizado vedamento do ápice. Após, as raízes foram impermeabilizadas externamente na sua porção apical e cervical com adesivo epóxi araldite e esterilizadas por radiação gama cobalto – 60. Em seguida, 15 dentes (grupo experimental) foram contaminados com endotoxina de *E. coli* e imersos em água apirogênica durante períodos variando entre 30 minutos a 72 horas. Decorridos os

períodos experimentais, alíquotas da água cujas raízes estavam imersas e adequadamente impermeabilizadas, foram expostas em cultura de células de linfócitos B para detecção de endotoxinas. O teste de ELISA detectou presença de anticorpos (IgM) após 24 horas da inoculação de endotoxinas nas raízes, indicando que a mesma foi capaz de se difundir pelos túbulos dentinários em direção ao cimento, atingindo a região externa da raiz em apenas 24 horas.

Uma vez que muitos estudos puderam comprovar a correlação entre presença de endotoxinas e atividade inflamatória nos tecidos periapicais, a terapia endodôntica deve ter como objetivo, além da limpeza e desinfecção dos canais radiculares, a neutralização dos efeitos tóxicos causados pela endotoxina (Leonardo, 2005). Assim, a fim de avaliar a efetividade de técnicas de instrumentação, soluções irrigadoras ou medicações intracanaís (MIC) sobre microrganismos e suas endotoxinas, diversos estudos utilizam métodos de quantificação de endotoxinas atualmente nas pesquisas.

Em 1956, Bang tentou descobrir o motivo da morte do caranguejo ferradura quando exposto a bactérias Gram-Negativas. Mesmo a suspensão desta bactéria sendo levada à fervura, ao ser inoculada no caranguejo, o mesmo era levado à morte. Percebeu-se que alguma toxina coagulava o sangue do caranguejo ferradura. O caranguejo em ferradura, *Limulus polyphemus*, é constituído por um lisado dos amebócitos circulantes de caranguejo em ferradura que, quando exposto a quantidades pequenas de endotoxinas, aumenta sua opacidade bem como sua viscosidade, tornando-se um gel duro (Levin & Bang, 1968). Estes autores demonstraram que a formação do coágulo era resultado de uma reação enzimática entre a endotoxina e uma proteína coagulável na circulação do amebócito *Limulus*. Assim, pelo método QCL cinético do LAL, a endotoxina da bactéria Gram-Negativa catalisa a ativação de uma pré-enzima em enzima. A enzima ativada catalisa a clivagem do substrato sintético Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNa em peptídeo (Ac-Ile-Glu-Ala-Arg) e p-

nitroanilina (pNa), de coloração amarela. A pNa transformada durante a reação é medida fotometricamente a 405 nm continuamente durante o período de incubação (37°C). A concentração de endotoxina da amostra é calculada a partir de seu tempo de reação por comparação ao tempo de reação das soluções-padrão contendo quantidades conhecidas de endotoxina.

Horiba et al. (1991) coletaram amostras de 30 dentes com periodontite apical e aplicaram o teste de detecção de endotoxinas pela formação de gel em presença de endotoxinas. Todos os dentes que apresentaram sinais e sintomas clínicos possuíam endotoxinas (n=16), sendo que apenas 4 dos 14 dentes sem sintomatologia, apresentaram endotoxinas na amostra. Também foi observado que 19/22 dentes com presença de lesão periapical e que 19/20 com presença de exsudato apresentaram endotoxinas, concluindo que a presença de endotoxinas está diretamente ligada aos sinais e sintomas clínicos, presença de rarefações ósseas periapicais e exsudato inflamatório.

Tanomaru et al. (2003) avaliaram o efeito de diferentes soluções irrigadoras e da medicação de hidróxido de cálcio sobre LPS bacteriano. Para isso, dentes de cães foram contaminados com endotoxina de *E. coli* durante 10 dias e após, os mesmos foram instrumentados e irrigados com: hipoclorito de sódio (NaOCl) 1%, 2,5% e 5%, clorexidina (CLX) 2%, solução salina, sem instrumentação (controle) e solução salina seguido de medicação intracanal (MIC) de hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂). Sessenta dias após, os animais foram sacrificados e amostras foram processadas para análise histopatológica. Todos os grupos cuja solução irrigadora foi testada apresentaram maior infiltrado inflamatório, maior espessamento do ligamento periodontal, bem como reabsorção cementária e óssea, em comparação com o grupo que recebeu MIC. Conclui-se que somente o preparo biomecânico com as soluções irrigadoras não foi capaz de neutralizar os efeitos da endotoxina, sendo importante o uso da MIC de Ca(OH)₂.

Oliveira et al. (2004) estudaram os efeitos *in vitro* do hidróxido de cálcio e da polimixina B como medicações intracanaís, sobre endotoxinas de canais radiculares. Pelo teste de lisado de amebócitos de *Limulus* foi verificada que não houve formação de gel nos grupos hidróxido de cálcio e controle (sem endotoxina). No grupo da polimixina B houve leve formação de gel, sem diferenças estatísticas do hidróxido de cálcio e controle. Além disso, a produção de anticorpo (Imunoglobulinas - IgM) por células de linfócito B não foram observadas, indicando que tanto o hidróxido de cálcio quanto a polimixina B foram capazes de alterar as propriedades do LPS, neutralizando-o.

Jacinto et al. (2005) avaliaram a possível relação entre quantidade de endotoxinas encontradas em canais radiculares com necrose pulpar e sinais e sintomas clínicos. As amostras coletadas de 50 pacientes foram semeadas em placas contendo *Fastidious Anaerobe Agar* (FAA) enriquecido com sangue desfibrinado de carneiro e contagem de UFC/mL foi obtida visualmente. Após, endotoxinas das amostras foram quantificadas pelo método cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (LAL-1000). Microrganismos estavam presentes em todas as amostras, sendo que maior quantidade foi observada nos casos sintomáticos. Em casos sintomáticos também foi verificada maior quantidade de endotoxinas, indicando correlação positiva entre quantidade de endotoxinas e presença de sinais e sintomas clínicos.

Oliveira et al. (2007) avaliaram a ação do hipoclorito de sódio em diferentes concentrações, da clorexidina, do hidróxido de cálcio e da polimixina B como soluções irrigadoras, sobre endotoxinas. Para isso, amostras foram coletadas antes e após o preparo biomecânico (PBM). As amostras foram submetidas ao teste de *Limulus* (formação de gel) e produção de anticorpos em cultura em células de linfócito B. Hidróxido de cálcio e polimixina B foram capazes de neutralizar endotoxinas e inclusive de alterar propriedades de LPS, uma vez que a produção de anticorpos, detectada pelo teste de ELISA foi insignificante.

Martinho e Gomes (2008) quantificaram endotoxinas e bactérias de canais radiculares com necrose pulpar antes e após o preparo biomecânico com NaOCl 2,5%, correlacionando os resultados com sinais e sintomas clínicos. Foram utilizados os testes de cultura em placas de Agar para contagem de UFC/mL e cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (QCL-100) para quantificação de endotoxinas. Das 24 amostras, todas apresentaram endotoxinas e crescimento microbiano em placas de cultura. Após o PBM com NaOCl 2,5% houve redução de 99,78% de UFC/mL e 59,99% de endotoxinas, evidenciando que o NaOCl 2,5% foi efetivo contra microrganismos porém pouco efetivo na neutralização das endotoxinas presentes nos canais radiculares. Associação entre níveis elevados de microrganismos/endotoxinas e sintomatologia clínica puderam ser observados.

Gomes et al. (2009) compararam a eficácia do NaOCl 2,5% e da CLX gel 2% sobre LPS bacteriano presente em infecções primárias de canais radiculares. Cinquenta e quatro pacientes foram divididos em 2 grupos, de acordo com a substância química auxiliar utilizada durante o preparo biomecânico dos canais radiculares. Amostras foram coletadas antes e após o preparo, sendo que para cada amostra, quantificação de endotoxinas foi realizada pelo método cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (LAL-1000). Quantidade mediana inicial de EU/mL obtida foi de 272 para o grupo NaOCl 2,5% e 152,46 para o grupo CLX gel 2%, sendo reduzidos após o PBM para 86 e 85, respectivamente. Embora ambas as substâncias tenham sido capazes de diminuir quantidade de endotoxinas dentro do canal radicular, o NaOCl 2,5% reduziu mais a quantidade de endotoxinas do que a CLX gel 2%. No entanto, nenhuma das substâncias foi capaz de eliminar endotoxinas de canais com infecções endodônticas primárias.

Martinho et al. (2010) investigaram microrganismos e níveis de endotoxinas encontrados em lesões endodônticas primárias, determinando sua antigenicidade contra macrófagos por meio de níveis

de IL-1 β e TNF- α , relacionando com sinais e sintomas clínicos. Foram utilizados método molecular de PCR para detecção de espécies alvos e método turbidimétrico (Pyrogent 5000 LAL) para quantificação de endotoxinas. Quantidade de IL-1 β e TNF- α em sobrenadantes de macrófagos foram medidas pelo teste de ELISA. *Prevotella nigrescens*, *P. endodontalis* e *Treponema socranskii* foram os microrganismos Gram-Negativos mais frequentes. Na presença de inflamação do trato sinusal *Filifactor alocis* foi encontrado e *Treponema denticola* estava presente em casos de rarefações ósseas periapicais maiores ou igual a 2 mm. Além disso, IL-1 β e TNF- α foram detectados em casos de alta quantidade de endotoxinas.

Diversos estudos na literatura (Schein, Schilder 1975; Dahlén et al., 1981; Pitts et al., 1982; Horiba et al., 1991; Safavi, Nichols, 1994; Tokuda et al., 2001; Ko, Lim, 2002; Pelt et al., 2002; Oliveira et al., 2005a; Oliveira et al., 2005b; Oliveira et al., 2005c; Jacinto et al., 2005; Martinho, Gomes, 2008; Valera et al., 2010) comprovam que endotoxinas são agentes patogênicos, que podem iniciar ou perpetuar processos inflamatórios. Assim, entender o papel da endotoxina nos canais radiculares é fundamental para a adoção de uma terapia endodôntica capaz de eliminar não apenas os microrganismos, mas também de neutralizar suas endotoxinas.

2.3 Hipoclorito de sódio

O hipoclorito de sódio é uma substância amplamente utilizada na prática endodôntica. Desde 1915, o hipoclorito de sódio foi utilizado por Dakin para a limpeza de feridas, mas somente em 1936, esta substância foi sugerida para uso odontológico por Walker. À partir de 1943, sua utilização no preparo biomecânico de canais radiculares em

diferentes concentrações foi difundida, sendo esta substância a mais utilizada mundialmente como substância química auxiliar durante preparo dos canais radiculares, etapa essencial para o sucesso do tratamento endodôntico, pois consiste na limpeza e desinfecção (Marchesan et al., 2003).

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é bastante utilizado na prática endodôntica (Ercan et al., 2004; Hapassalo et al., 2005; McGurkin-Smith et al., 2005; Tanomaru et al., 2006) devido as suas propriedades antimicrobianas e de dissolução de matéria orgânica, já elucidadas na literatura.

Sua atividade antimicrobiana ocorre devido à formação do ácido hipocloroso, que libera cloro nascente, o qual se liga ao grupamento amina (NH) dos aminoácidos, formando cloraminas, interferindo no metabolismo celular e inibindo a função enzimática bacteriana à partir de uma oxidação irreversível dos grupos SH (sulfidril) de enzimas bacterianas essenciais (Vianna, 2002). Diversos estudos (Ferraz et al., 2001; Gomes et al., 2001; Vianna et al., 2004; Valera et al., 2009) que analisaram a atividade antimicrobiana do NaOCl comprovaram sua efetividade.

Gomes et al. (2001) testaram várias concentrações de NaOCl e CLX gel e líquida contra *E. faecalis*. Em placas de 24 poços foram incubados 2 mL da suspensão de *E. faecalis* em 1 mL de cada substância a ser testada por diferentes períodos de tempo. Após o período determinado, 1 mL da mistura foi transferida para tubos contendo Agar BHI e neutralizadores das substâncias, que foram incubados a fim de verificar turbidez do meio. Todos os irrigantes testados foram capazes de eliminar *E. faecalis* porém em tempos diferentes, dependendo da concentração utilizada. CLX líquida e o NaOCl 5.25% foram os irrigantes mais efetivos.

Valera et al. (2009) analisaram *in vitro* a ação da irrigação com hipoclorito de sódio 1% associado a medicações intracanaís de

hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2% durante 14 dias sobre *E. faecalis* e *C. albicans*. A irrigação com hipoclorito de sódio foi capaz de reduzir significativamente quantidade de UFC/mL.

Além disso, a atividade na dissolução de matéria orgânica pelo hipoclorito de sódio também pôde ser comprovada (Naenni et al., 2004; Clarkson et al., 2006; Cobankara et al., 2010). Vianna (2002) explica que o hidróxido de sódio, formado durante a reação entre NaOCl com a molécula de água (H₂O), atua como solvente orgânico de gordura, pelo fenômeno conhecido como saponificação.

Clarkson et al. (2006) estudaram a capacidade de dissolução de polpas suínas da solução de hipoclorito de sódio em diferentes composições e concentrações. As polpas foram expostas a diferentes concentrações de hipoclorito de sódio, inclusive, hipoclorito de sódio adicionado de um surfactante. Os autores perceberam correlação positiva entre a concentração utilizada e a capacidade de dissolução da polpa, sendo que quando utilizado o hipoclorito de sódio +surfactante, melhores resultados puderam ser obtidos.

Alguns estudos relatam ainda efetiva ação sobre remoção de *smear layer* formada durante a instrumentação de canais radiculares. Estudos explicam que o NaOCl age sobre a parte mais superficial da *smear layer*, formada por parte orgânica (Berg et al., 1986; Baumgartner, Mader, 1987). Quando associado a outras substâncias quelantes, tais como EDTA ou ácido cítrico, a remoção da *smear layer* pode ser potencializada (Carvalho et al., 2008).

No estudo de Carvalho et al. (2008) foi analisado em microscopia eletrônica de varredura a remoção de *smear layer* utilizando durante a instrumentação: NaOCl 2,5% + EDTA 17%; CLX gel 2% + EDTA 17%; Canal Plus + NaOCl 2,5% e, como controle, solução salina + EDTA 17%. Observaram que a irrigação com *Canal Plus* combinado ao NaOCl e NaOCl sozinho seguido de irrigação com EDTA promoveram maior limpeza das paredes e abertura dos túbulos dentinários.

O NaOCl também possui efetiva ação detergente, surfactante e possui baixa tensão superficial, ação desodorizante, clareadora e lubrificante (Bloomfield, Miles, 1979), propriedades estas que contribuíram para que esta fosse a substância química auxiliar de escolha durante o preparo biomecânico na prática clínica.

No entanto, além do hipoclorito de sódio não ser capaz de neutralizar completamente endotoxinas presentes nos canais radiculares, como pôde ser observado em estudos anteriormente citados no item 2.2 (Oliveira et al., 2007; Martinho, Gomes, 2008; Gomes et al., 2009) esta substância não apresenta seletividade para microrganismos, podendo agredir seriamente os tecidos vivos periapicais especialmente em altas concentrações (Spångdberg et al., 1973; Pashley, 1985; Becking, 1991; Hülsman e Hahn, 2000; Ferraz et al., 2001; Tanomaru Filho et al., 2002).

Tanomaru-Filho et al. (2002) injetaram hipoclorito de sódio 0.5% e clorexidina (CLX) gel 2% na via intraperitoneal de ratos a fim de verificar a resposta inflamatória. Após tempos experimentais, os ratos foram sacrificados e o líquido da cavidade intraperitoneal foi coletado e analisado quanto a contagem das células inflamatórias e lise de proteínas. Os resultados mostraram que a CLX apresentou resultados semelhantes ao grupo controle, sendo considerada biocompatível neste estudo, enquanto o hipoclorito de sódio apresentou um aumento do número das células inflamatórias, em especial neutrófilos e células mononucleares bem como aumento na lise proteinária.

Assim, visto que a utilização do hipoclorito de sódio como solução irrigadora de canais radiculares tem suas limitações quanto à neutralização de endotoxinas e biocompatibilidade, torna-se interessante a busca por outras substâncias mais biocompatíveis.

2.4 Digluconato de clorexidina

A clorexidina foi sintetizada nos anos 40 e introduzida na área médica em 1954 como um antisséptico para ferimentos na pele (Davies et al., 1954). Ela se caracteriza por ser um detergente catiônico, da classe das bisbiguanidas, disponível nas formas de acetato, hidrocloreto e digluconato, sendo este último, o sal mais comumente empregado em fórmulas e produtos.

A clorexidina possui um amplo espectro de ação, agindo sobre bactérias Gram-Positivas, Gram-Negativas, fungos, leveduras e vírus lipofílicos (Tortora et al., 2000). Desta forma, ela foi testada primeiramente por Løe e Schiott (1970) no qual demonstraram que bochechos com solução de gluconato de clorexidina 0,2%, realizados duas vezes por dia foram eficazes em diminuir o crescimento do biofilme bacteriano e o desenvolvimento de gengivite clinicamente detectáveis por um período de 21 dias. O mecanismo de ação antibacteriano pode ser explicado pelo fato de a molécula catiônica da clorexidina ser rapidamente atraída pela carga negativa da superfície bacteriana, sendo adsorvida à membrana celular por interações eletrostáticas, provavelmente por ligações hidrofóbicas ou por pontes de hidrogênio, sendo essa adsorção concentração-dependente, causando assim, ruptura da membrana celular. Em dosagens elevadas, ela causa precipitação e coagulação das proteínas citoplasmáticas e morte bacteriana e, em doses mais baixas, a integridade da membrana celular é alterada, resultando num extravasamento dos componentes bacterianos de baixo peso molecular (Hugo e Longworth, 1964; Hjeljord et al., 1973; Rölla e Melsen, 1975). O digluconato de clorexidina tem sido proposto na terapia endodôntica devido suas propriedades antibacterianas, de biocompatibilidade e de efeito residual (Kuruvilla, Kamath, 1998; Ferreira et al., 2002; Menezes et al., 2004; Leonardo, 2005; Tanomaru et al., 2005).

Ferraz et al. (2001) avaliaram a ação antimicrobiana e de limpeza da clorexidina gel como irrigante de canais radiculares. Setenta dentes foram contaminados com *E. faecalis* e coleta inicial utilizando cone de papel foi realizada. Para avaliação antimicrobiana, os cones foram imersos em caldo BHI e a atividade foi avaliada pela turbidez do meio. Os dentes, foram então instrumentados de acordo com a substância química utilizada (CLX gel, CLX líquida ou NaOCl 5,25%), tendo como grupos controle irrigação com solução salina fisiológica estéril ou gel de natrosol. Os resultados mostraram que todas as substâncias testadas apresentaram turbidez de meio, indicando ainda presença de *E. faecalis*, sendo que a CLX gel apresentou melhores resultados. Com relação à limpeza das paredes dentinárias, também a CLX gel mostrou excelentes resultados, sendo diferente estatisticamente dos demais grupos. Concluíram assim, que a CLX gel poderia ser utilizada como irrigante dos canais radiculares.

Ferreira et al. (2002) avaliaram *in vitro*, pela técnica da diluição em caldo, a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) da solução de hidróxido de cálcio, CLX 2%, paramonoclorofenol canforado (PMCC) e detergente da mamona 10% sobre microrganismos anaeróbios (*F. nucleatum*, *P. nigrescens*, *Clostridium perfringens*, *Bacteroides fragilis*). Todas as substâncias testadas apresentaram atividade antimicrobiana, variando para as diferentes espécies bacterianas utilizadas neste estudo. O digluconato de clorexidina apresentou os melhores resultados, seguido pelo detergente da mamona, PMCC e hidróxido de cálcio.

Menezes et al. (2004) avaliaram a efetividade de irrigantes e medicações intracanaís, *in vitro*, sobre *C. albicans* e *E. faecalis*. Noventa e seis dentes humanos unirradiculares extraídos foram contaminados com *C. albicans* e *E. faecalis* e divididos em 8 grupos, de acordo com a MIC ou irrigante utilizado. Coletas com cone de papel foram realizadas antes e após o tratamento, sendo que a MIC de tricresol

formalina não foi eficaz sobre os microrganismos testados. A MIC de Ca(OH)_2 + PMCC foi a mais efetiva contra ambos microrganismos e a irrigação com solução de CLX foi mais eficiente sobre *E. faecalis* do que o NaOCl 2,5%.

Vianna et al. (2004) testaram varias concentrações de CLX gel e liquida comparando com NaOCl contra *E. faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *C. albicans*, *P. gingivalis*, *P. endodontalis* e *P. intermedia*. Em placas de 24 poços foram incubados 2 mL da suspensão de cada microrganismos em 1 mL de cada substancia a ser testada por diferentes períodos de tempo. Após o período determinado, 1 mL da mistura foi transferida para tubos contendo caldo BHI e neutralizadores das substâncias, que foram incubados por 7 dias. Após, 10 µL de cada tubo foi semeado em placas de Agar e incubados por 24 a 48h. Clorexidina gel ou liquida 2% foram capazes de eliminar *S. aureus* e *C. albicans* em 15 segundos. *E. faecalis* foi eliminado pela CLX gel 2% em 1 min. As três espécies microbianas anaeróbias foram eliminadas em 15 segundos por todas as substâncias. O tempo requerido para as concentrações de 1 e 2% da CLX serem capazes de eliminar todos os microrganismos foi igual ao requerido pelo NaOCl 5,25%.

Ferraz et al. (2007) avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana da CLX gel , liquida e do hipoclorito de sódio sobre 5 microrganismos anaeróbios facultativos e 4 estritos, pelo método de difusão em Agar. Concluíram que a CLX gel 2% apresentou halos de inibição maiores que o hipoclorito de sódio 5,25%. No entanto não houve diferenças estatísticas significantes entre as a CLX gel e a liquida, concluindo que a CLX pode ser uma excelente substância química auxiliar ao PBM.

Valera et al. (2009) analisaram *in vitro* a ação da irrigação com hipoclorito de sódio 1% associado a medicações intracanaís de hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2% durante 14 dias sobre *E. faecalis* e *C. albicans*. Todas as medicações intracanaís testadas foram bastante

eficientes em reduzir microrganismos após o PBM, sendo que a associação do Ca(OH)_2 com a CLX gel 2% apresentou melhores resultados. Assim, é possível que esta associação possa combinar a atividade antimicrobiana da CLX à potente ação mineralizadora e neutralizadora de endotoxinas do Ca(OH)_2 .

O efeito residual da clorexidina pode ser explicado devido a sua natureza dicatiônica. Uma extremidade catiônica da molécula se prende à película, que apresenta carga negativa, e a outra extremidade catiônica fica livre para interagir com bactérias que buscam colonizar o dente. Desta forma, ela exercerá uma ação bactericida inicial imediatamente após sua aplicação, combinada com uma ação bacteriostática prolongada. Essa hipótese foi testada por Bonesvoll e Gjermo em 1978.

Basrani et al. (2002) estudaram a atividade antimicrobiana residual da MIC de clorexidina em diferentes concentrações associado ou não ao hidróxido de cálcio. Dentes extraídos tiveram a coroa e ápice seccionados, cemento desgastado a fim de padronizar diâmetro da raiz em 4 mm e os canais preparados com brocas de Gates Glidden nº 3 para padronização dos condutos. Os dentes foram esterilizados e mantidos em caldo BHI para penetração no interior dos túbulos dentinários e impermeabilizados externamente. Sete dias depois, as medicações foram inseridas no canal radicular e os espécimes incubados por mais 7 dias. Após, as MIC foram removidas e alíquotas de suspensão de *E. faecalis* foram inoculadas dentro dos canais durante 21 dias. Os canais foram irrigados com 10 mL de solução salina fisiológica estéril e 2 amostras dentinárias foram coletadas: remoção da dentina com broca de Gates Glidden nº 4 e nº 5. Esta dentina removida foi então armazenada em 3 mL de caldo BHI e incubada por 72 horas. As amostras que apresentaram turbidez foram então analisadas em espectrofotometria e semeadas a fim de verificar pureza da cultura. Os dentes cuja MIC utilizada foi CLX 2% (gel ou líquida) apresentaram baixa turbidez, sendo estatisticamente

diferente dos demais grupos (CLX gel 0,2%, Ca(OH)_2 , Ca(OH)_2 + CLX gel 0,2%), indicando que a MIC de CLX 2% por 7 dias tem ação residual contra *E. faecalis*.

Por muito tempo a clorexidina foi considerada não tóxica aos tecidos, sendo biocompatível (Ferreira et al., 2002; Menezes et al., 2004; Leonardo, 2005; Tanomaru et al., 2005; D'Arcangelo et al., 2007; Ferraz et al., 2007). No entanto, estudos recentes em cultura celular ou por meio de inoculação em subcutâneo de ratos (Lessa et al., 2010; Monteiro et al., 2010) têm mostrado relação positiva entre toxicidade celular e concentração da substância.

Lessa et al. (2010) avaliaram a citotoxicidade, pelo método de cultura celular, de diferentes concentrações da solução de CLX sobre células odontoblásticas. Os resultados mostraram efeitos tóxicos dose dependentes sobre células odontoblásticas da linhagem MDPC-23. Desconsiderando os tempos de exposição das células às diferentes concentrações de CLX, todas as concentrações apresentaram forte efeito citotóxico sobre cultura de MDPC-23.

Monteiro et al. (2010) implantaram em subcutâneo de ratos, chip reabsorvível de matriz gelatinosa contendo 2,5 mg de CLX para avaliar histologicamente e histomorfometricamente a resposta do tecido conjuntivo. Decorridos os períodos experimentais, os ratos foram sacrificados para obtenção das amostras. A clorexidina provocou intenso infiltrado inflamatório, predominantemente neutrófilos. Após 3 dias da implantação, observou-se áreas crescentes de degradação, tecido de granulação e infiltrado de macrófagos que permaneceu até os 21 dias, sendo a CLX considerada não biocompatível neste estudo.

Além disso, esta substância não é capaz de dissolver matéria orgânica (Naenni et al., 2004; Okino et al., 2004). Okino et al. (2004) avaliaram a capacidade e a velocidade de dissolução de material orgânico do NaOCl, CLX gel e CLX líquida. Para isso, polpas bovinas foram pesadas e 20 mL de cada solução teste foram colocados em

contato com a polpa. A mistura foi agitada a 150 rpm até que toda a polpa fosse diluída, cronometrando-se o tempo de diluição. Verificaram que todas as soluções de NaOCl foram capazes de dissolver tecido pulpar aumentando a rapidez de dissolução à medida que aumentou-se a sua concentração, mas que a CLX, em suas duas diferentes formas, se assemelhou à água destilada, não sendo capazes de dissolver a matéria orgânica.

A utilização da clorexidina na forma gel parece “driblar” este inconveniente, uma vez que o gel natrosol (hidroxietil celulose), que possui capacidade de remoção mecânica e ação lubrificante durante a instrumentação, mantém as partículas de dentina formadas durante o preparo em suspensão, evitando a obliteração dos túbulos dentinários (Ferraz et al., 2001).

Entretanto, embora apresente ação antimicrobiana, a clorexidina apresenta pequena atividade sobre endotoxinas presentes em canais radiculares, como já foi demonstrado por alguns estudos mencionados no Item 2.2 (Tanomaru et al., 2003; Oliveira et al., 2005c; Gomes et al., 2009), tornando mais interessante a busca por substâncias alternativas para uso na prática clínica.

2.4 *Zingiber officinale*

O gengibre (*Zingiber officinale*) já é largamente utilizado como condimento em bebidas alcoólicas, na alimentação e, inclusive, na medicina popular, para tratamento de artrite, reumatismo, dores musculares, dores de garganta, constipação, indigestão, vômitos, hipertensão, febre, doenças infecciosas, dentre outros (Afzal et al., 2001; Chrubasik et al., 2005; Ali et al., 2008). As principais ações farmacológicas do gengibre e seus compostos isolados incluem

propriedades imuno-modulatórias, anti-tumorigênicas, anti-inflamatórias, anti-apoptóticas, anti-hiperglicêmicos e antieméticos (Pereira et al., 2003; Chrubasik et al., 2005; Ali et al., 2008). Outros estudos comprovam que o gengibre possui ação anti-inflamatória, antimicrobiana e cicatrizante, dentre outras (Afzal et al., 2001; Chrubasik et al., 2005; Grégio et al., 2006; Aimbire et al., 2007; Indu et al., 2006; Kim et al., 2007; Fouda, Berika, 2009).

Devido a estas propriedades, o gengibre tem ganhado considerável reputação internacional como suplemento natural no mundo inteiro, sendo que muitas pesquisas envolvendo isolamento e identificação de constituintes ativos do gengibre tem sido desenvolvidas, despertando um crescente interesse nas diferentes áreas biológicas, inclusive na Odontologia (Oliveira et al., 2005; Valera et al., 2009; Chung et al., 2010, Cardoso et al., 2010, Xavier et al., 2010, Valera et al., 2010).

O gengibre é rico em óleos voláteis, gingerol e shogaol. Analisando os componentes ativos do gengibre, Lantz et al., em 2007, ao testarem a atividade de alguns componentes do gengibre sobre mediadores químicos da inflamação, verificaram que o gingerol e o shogaol foram capazes de inibir significativamente a produção de prostagandinas E_2 induzidas pelo LPS de *E. coli*. Células do tipo U937 foram expostas ao LPS de *E. coli* na presença ou ausência de alguns compostos do gengibre. Produção de PGE_2 e TNF foi analisada pelo teste de ELISA. Os resultados mostraram que os gingeróis não apresentaram citotoxicidade e shogaóis apresentaram citotoxicidade em concentrações acima de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Alguns componentes foram capazes de inibir a produção de PGE_2 . Gingeróis foram capazes de inibir a expressão do LPS a COX-2 e estes devem atuar em diferentes sítios de receptores.

Pereira et al. (2003) avaliaram o efeito do gengibre sobre processo de cicatrização de úlceras induzidas em mucosa oral de ratos. Após 2, 7, 14 e 21 dias de aplicação tópica de gengibre na mucosa de ratos, estes foram sacrificados para processamento histopatológico da

amostra. Análise mostra que o extrato aquoso de gengibre não apresentou diferenças quanto à inflamação. No entanto, seus extratos oleorresinosos foram farmacologicamente ativos, apresentando ação anti-inflamatória mais ativa e acelerado processo de reparo.

No estudo de Kim et al. (2007), o componente [6]-gingerol do gengibre reduziu a expressão induzida pela UVB e a expressão da COX-2, podendo ser um efetivo agente terapêutico contra doenças de pele e anti-inflamatório. Além disso, compostos do gengibre demonstraram potente ação citotóxica sobre células humanas cancerígenas, inibindo também proliferação células cancerígenas em ovário de ratos (Kim et al., 2008).

Ali et al. (2007) realizaram uma revisão de literatura dos mais recentes e importantes trabalhos sobre isolamento e identificação dos constituintes do gengibre, bem como suas ações farmacológicas e o uso do gengibre contra algumas doenças. As principais ações farmacológicas e compostos já isolados incluem as imuno-modulatórias, anti-tumorigênicas, anti-inflamatórias, anti-apoptóticas, anti-eméticas, anti-hiperglicêmicas, sendo um forte anti-oxidante, prevenindo formação de radicais livres. O gengibre foi considerado um fitoterápico seguro para uso medicinal com insignificantes efeitos adversos. Esses efeitos adversos incluem azia, ser irritante gástrico quando administrado em doses maiores que 6 g e em ratas grávidas pode causar perda embrionária precoce.

Aimbire et al. (2007) estudaram o efeito do extrato hidroalcolico de gengibre sobre a hiperreatividade da traquéia e inflamação pulmonar induzida pelo LPS de *Salmonella*. Para isso inocularam em ratos, via intravenosa, quantidade conhecida de LPS e tratamento com o extrato. Os resultados mostraram que o extrato de gengibre e celecoxib (anti-inflamatório) atenuaram a hiperreatividade da traquéia e inflamação pulmonar após 90 minutos e 48h da inoculação de LPS. Ambos foram capazes de reduzir níveis de PGE₂ e tromboxana

(TXA₂), sugerindo que o extrato de gengibre exerce ação anti-inflamatória, inclusive sobre metabólitos da cicloxigenase.

Fouda e Berika (2009) demonstraram ainda, excelente atividade anti-inflamatória sobre artrite reumatóide em ratos, podendo este extrato ser uma promissora alternativa aos anti-inflamatórios não esteroidais para tratamento de pacientes com artrite reumatóide. Neste estudo, os autores utilizaram o extrato hidroalcolico de gengibre para melhorar o processo inflamatório de artrite colagenosa induzida em ratos. Os resultados mostraram que este extrato, em doses mais altas que 50 mg/Kg/dia via intraperitoneal durante 26 dias foi capaz de melhorar escores clínicos, incidência da doença, temperatura e inchaço da articulação e destruição da cartilagem, ao mesmo tempo em que reduziu níveis sorológicos de interleucinas e Fator de Necrose Tumoral, mediadores químicos ligados ao processo inflamatório

Sua atividade antimicrobiana foi comprovada por diversos autores (Grégio et al., 2006; Indu et al., 2006; Park et al., 2008), no qual efetiva ação do extrato glicólico e alcoólico do gengibre sobre bactérias como *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Porphyromonas endodontalis* e *Prevotella intermedia* foi verificada.

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

Park et al. (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana do gengibre sobre três bactérias Gram-Negativas anaeróbias, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* e *Prevotella intermedia*, causadoras da doença periodontal. Estes autores concluíram

que apenas dois componentes do gengibre ([10] e [12] Gingerol) são capazes de eliminar e inibir efetivamente o crescimento dos microrganismos testados. O gengibre também apresentou atividade antimicrobiana contra *E. coli* em um estudo realizado por Indu et al. (2006).

Aguiar et al. (2009) avaliaram *in vitro* a atividade do extrato glicólico de gengibre sobre *Candida albicans* verificando sua atividade antifúngica em diferentes concentrações, pela técnica da diluição em caldo. Os resultados mostram que o extrato glicólico de gengibre apresentou ação fungicida à partir da concentração 12,5%.

Cardoso et al. (2010) avaliaram *in vitro* a ação do extrato glicólico de gengibre como solução irrigadora e medicação intracanal sobre *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* e endotoxinas concluindo que o gengibre apresentou atividade antimicrobiana, sendo capaz de diminuir significativamente endotoxinas, mas não de neutralizá-las completamente, concordando com Maekawa et al. (2010).

No estudo de Chung et al. (2010) também foi verificado efetiva ação antimicrobiana do extrato glicólico de gengibre como medicação intracanal sobre microrganismos inoculados, *in vitro*, em dentes humanos após instrumentação com hipoclorito de sódio. Além disso, redução de endotoxinas também pôde ser observada.

3 PROPOSIÇÃO

As propostas deste estudo foram:

- a) Detectar pela reação em cadeia de polimerase – PCR (método molecular) microrganismos presentes nos canais radiculares de dentes com necrose pulpar e periodontite apical crônica;
- b) Quantificar endotoxinas presentes nos canais radiculares antes e após o tratamento;
- c) Avaliar a atividade antimicrobiana e sobre endotoxinas da solução de hipoclorito de sódio 1%, da clorexidina gel 2% e do extrato glicólico de gengibre 20%, como substâncias químicas auxiliares ao preparo biomecânico;
- d) Avaliar a ação da medicação intracanal com hidróxido de cálcio sobre a microbiota remanescente e sobre endotoxinas;
- e) Verificar a correlação entre os microrganismos presentes e quantidade de endotoxinas com os sinais e sintomas clínicos.

4 MATERIAL E MÉTODO

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Local da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, sob protocolo nº 070/2009-PH/CEP (**Anexo A**).

4.1 Seleção de pacientes

Foi realizada triagem e seleção dos pacientes por meio de anamnese, exame clínico e radiográfico. Dos 150 pacientes encaminhados para a clínica de Endodontia do departamento da Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, apenas 38 foram selecionados. Os critérios para seleção dos pacientes incluíam: ter boa saúde geral, não ter sido submetido à antibioticoterapia nos últimos 3 meses, não ter tratamento endodôntico prévio no dente interessado, dentes com necessidade de tratamento endodôntico e com necrose pulpar associado a presença de rarefação óssea periapical. Para isso, um detalhado questionário abordando histórico médico e dental foi preenchido (**Apêndice A**) e o tamanho das lesões periapicais foi medido em milímetros pelo programa *Image Tool* (UTHSCSA *Image Tool*). Dentre os pacientes selecionados, dois foram descartados. Um por ter administrado antibiótico durante o tratamento e outro pela perda do selamento provisório entre as sessões. Termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado por todos os pacientes que participaram desta pesquisa antes do início do tratamento

(**Apêndice B**), conforme as normas vigentes no referido Comitê de Ética em pesquisa.

4.2 Seleção de dentes

Foram utilizados neste estudo 36 dentes humanos unirradiculados ou birradiculados ($n=36$) dos pacientes anteriormente selecionados. Foram utilizados dentes íntegros ou selados com algum material restaurador; com ausência de bolsa periodontal com profundidade maior que 4 mm devido à possibilidade da lesão ser endo-periodontal; com ausência de tratamento endodôntico prévio; com possibilidade da realização de um adequado isolamento absoluto. Além disso, no exame clínico inicial foi realizado o teste térmico ao frio com de gás refrigerante (Endo Frost, Roeko, Langenau, Alemanha) e bolinhas de algodão e foram avaliados sinais e sintomas, tais como presença de fistula/exsudato, edema, alteração de cor, dor a percussão vertical e palpação. Foram descartados do estudo dentes em que não fosse possível o acesso a toda extensão do canal radicular (Figura 1).



Figura 1 – Radiografias iniciais de dentes selecionados para o estudo: verificam-se lesões periapicais primárias (setas).

4.3 Divisão dos grupos experimentais

Os dentes foram divididos em 3 grupos experimentais (n=12) de acordo com a substância química auxiliar utilizada durante o preparo biomecânico:

- NaOCl: Irrigação com solução de Hipoclorito de sódio 1% (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil);
- CLX: Preenchimento do canal com clorexidina gel 2% (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil) durante a instrumentação e irrigação com 5 mL de solução salina fisiológica estéril e apirrogênica (Laboratório Sanobiol, Pouso Alegre, MG, Brasil) a cada troca de lima;
- GENG: Preenchimento do canal com extrato glicólico de gengibre 20% (Apis Flora®, Ribeirão Preto, SP, Brasil) durante a instrumentação e irrigação com 5 mL de solução salina fisiológica estéril e apirrogênica a cada troca de lima.

4.4 Intervenção Odontológica

Todos os instrumentais utilizados nesta pesquisa foram submetidos à esterilização por radiação gama com cobalto 60 (dose 20 KGy por 6 horas) pela Embrarad (Empresa Brasileira de Radiação, Cotia, SP, Brasil) a fim de neutralizar endotoxinas.

Todos os passos subsequentes foram realizados de forma asséptica. Os pacientes foram anestesiados, e cada elemento dentário foi isolado individualmente com uso de grampo de isolamento (S.S.White Duflex, Artigos Dentários Ltda, Rio de Janeiro, Brasil) e lençol de borracha (Madeitex, São José dos Campos, SP, Brasil). Em seguida, o dente isolado recebeu profilaxia com pasta profilática (Vigodent S/A Indústria e Comércio, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e escova de Robinson (Microdont – Micro Usinagem de Precisão Ltda., São Paulo, SP, Brasil), sem refrigeração. O excesso de pasta profilática foi removido com irrigação com solução salina fisiológica estéril e apirogênica e foi realizado vedamento da interface coroa/lençol utilizando cimento de fosfato de zinco (S.S.White Artigos Dentários Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Após, com auxílio de *swabs* (Jiangsu Medical Materials Co. Ltd., Jiangsu, China) esterilizados, foi realizada desinfecção do campo operatório com água oxigenada 30 volumes (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil), seguido de hipoclorito de sódio 5,25% (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil) e neutralização do hipoclorito de sódio com tiosulfato de sódio 5% (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil). Em seguida, foi realizada a abertura coronária com auxílio de brocas (Microdont – Micro Usinagem de Precisão Ltda., São Paulo, SP, Brasil) acionadas em alta rotação (Kavo do Brasil Ltda, Joinville, SC, Brasil) sob refrigeração com solução salina fisiológica estéril apirogênica, com auxílio de seringas descartáveis estéreis e apirogênicas, removendo-se cáries e/ou restaurações existentes. Antes de expor a câmara pulpar, a cavidade foi novamente desinfetada com as mesmas soluções anteriormente descritas. Com uso de brocas diamantadas (Microdont – Micro Usinagem de Precisão Ltda., São Paulo, SP, Brasil) esterilizadas, foi realizada a completa remoção de teto, exposição da câmara pulpar e localização do canal radicular. Terminada a abertura coronária, foi realizada a 1ª coleta do conteúdo do canal radicular (Figura 2).

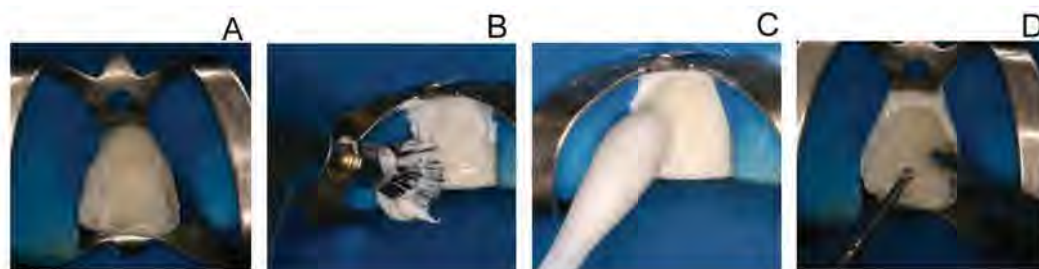


Figura 2 – Sequência da intervenção odontológica. a) isolamento absoluto; b) vedamento interface dente/lençol com cimento de fosfato de zinco e profilaxia; c) desinfecção do campo operatório; d) abertura coronária com irrigação com solução salina fisiológica estéril e apirogênica.

4.5 Primeira coleta

O canal foi inundado com solução salina fisiológica apirogênica e, em seguida, 4 cones de papel (Dentsply Maillefer Ind. E Com. Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil) estéreis e apirogênicos foram introduzidos no canal radicular (um de cada vez) até o comprimento aparente do dente. Os cones de papel permaneceram no canal radicular por 60 segundos. O primeiro cone de papel introduzido no canal radicular foi armazenado em tubo plástico para centrifuga, tipo eppendorf de 1,5 mL (Axygen INC, Union City, CA, USA), estéril e apirogênico contendo 1 mL de água apirogênica (Equipler Indústria Farmacêutica, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil) para posterior análise de endotoxinas. Os próximos 3 cones de papel foram armazenados em eppendorf esterilizado contendo 1 mL de meio de transporte pré-reduzido VMGA III - Viability Medium Goteberg Agar (Möller, 1966; Dahlén *et al.*, 1993) para posterior análise microbiológica (Figura 3).

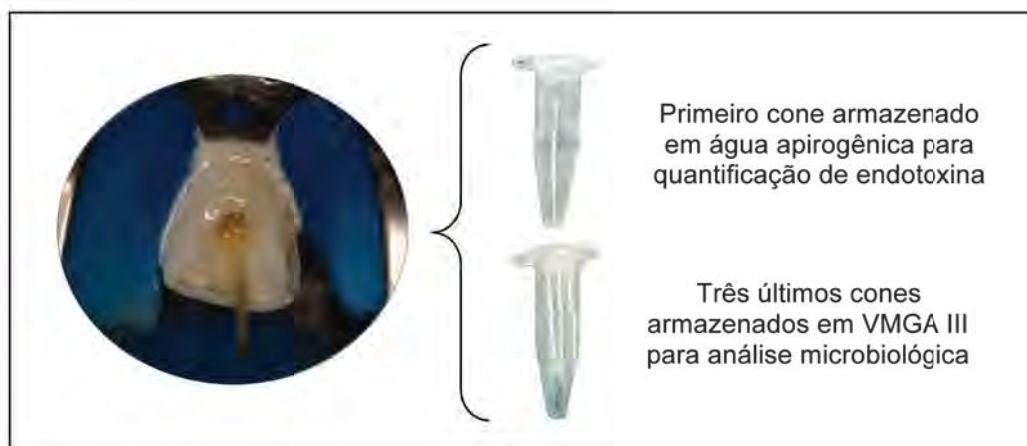


Figura 3 – Coleta do conteúdo do canal radicular. Cone no interior do canal: o 1º cone de papel removido armazenado em 1 mL de água apirogênica e os 3 últimos cones de papel armazenados em 1 mL de VMGA III.

4.6 Preparo biomecânico

Após a primeira coleta, foi realizada neutralização do conteúdo séptico do canal radicular e posterior preparo biomecânico com as respectivas soluções irrigadoras (Figura 4):

- NaOCl: Irrigação com 5 mL de solução de hipoclorito de sódio 1% a cada troca de lima;
- CLX: Preenchimento do canal com gel de clorexidina 2% com auxílio de seringas descartáveis e irrigação com 5 mL de solução salina fisiológica a cada troca de lima;
- GENG: Preenchimento do canal com extrato glicólico de gengibre com auxílio de seringas descartáveis e irrigação com 5 mL de solução salina fisiológica a cada troca de lima.

Os terços cervical e médio dos canais radiculares foram preparados utilizando a técnica coroa-ápice com uso de instrumentos

oscilatórios (Endo-Eze – Ultradent Endodontics – USA). As limas do sistema Endo-Eze foram adaptadas ao contra-ângulo Endo-Eze, em um micro-motor (Kavo do Brasil Ltda, Joinville, SC, Brasil), e o preparo foi realizado com movimentos de rotação alternada de 30 graus para cada lado. Sempre foi utilizado um instrumento manual, lima Kerr 15 (Dentsply/Maillefer Instruments SA, Ballaigues, Switzerland) entre cada lima do sistema oscilatório.

Assim, tendo como referência a radiografia para diagnóstico, foi determinado o comprimento provisório de trabalho ou pré-odontométrico (CPO = comprimento aparente radiográfico subtraído em 3 mm). Com uma lima tipo Kerr nº 10 (Dentsply/Maillefer Instruments SA, Ballaigues, Switzerland) foi feita a exploração inicial para localizar a luz do canal e, em seguida, foi utilizado o instrumento 13/060 do sistema Endo-Eze, com objetivo de remover interferências cervicais, usando os mesmos princípios do *“crown down pressureless technique”*, sempre tendo como medida limitadora o CPO. Em seguida, foi utilizado instrumento manual (lima K 15) para verificar a manutenção da luz do canal.

Na seqüência, foi utilizado o instrumento oscilatório 13/045, sem pressão apical, somente com o objetivo de continuar removendo interferências, variando a conicidade do canal e progredindo em direção apical, sempre mantendo como medida limitadora o CPO. Este passo foi seguido da lima manual K 15 (Dentsply/Maillefer Instruments SA, Ballaigues, Switzerland), instrumento oscilatório 13/035, lima manual K 15 e instrumento oscilatório 10/025, até atingir o CPO (Figura 4).

Ao atingir o CPO, foi colocado um instrumento manual para realização da odontometria. Após a obtenção do comprimento do dente, foi realizado desbridamento foraminais (no comprimento real do dente) e preparo apical (0,5 a 1 mm aquém do ápice radiográfico) com a

utilização de 4 limas manuais tipo Kerr (*Dentsply/Maillefer Instruments SA, Ballaigues, Switzerland*) (Figura 4).

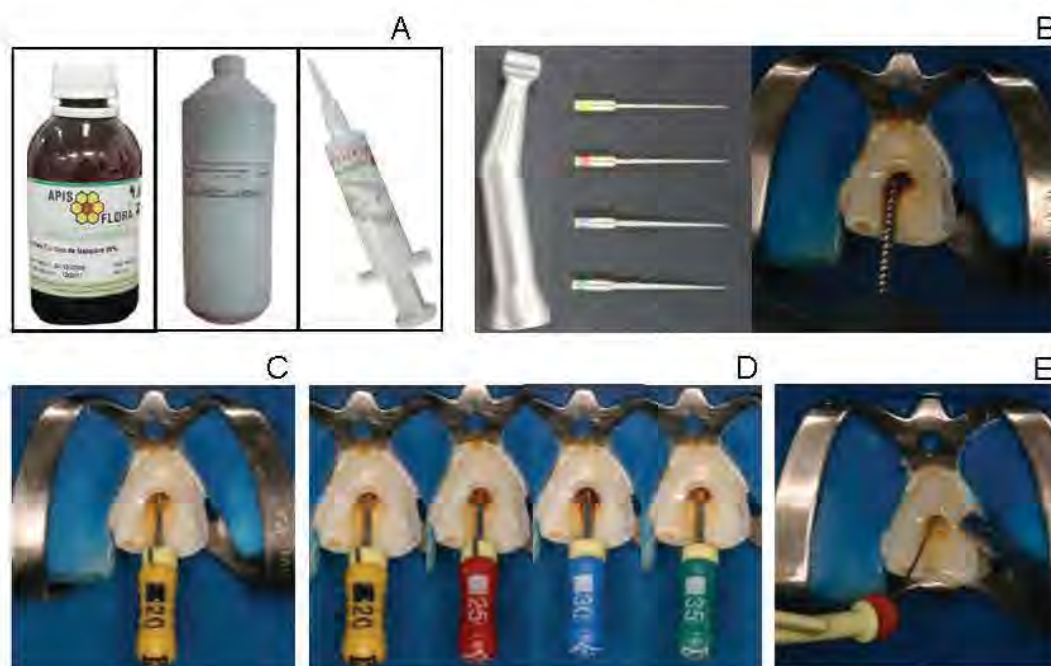


Figura 4 – Preparo biomecânico e colocação da medicação intracanal. a) substâncias químicas auxiliares ao preparo biomecânico; b) preparo cervical e médio com limas oscilatórias do sistema Endo-Eze; c) odontometria (neste caso com lima Kerr nº20); d) confecção do batente apical; e) irrigação com solução salina fisiológica estéril e aprotínica para remoção da substância química auxiliar.

Ao final do preparo biomecânico, para neutralização da solução de NaOCl, os dentes foram irrigados com 5 mL tiosulfato de sódio 5% (Möller, 1966). Para neutralização do gel de clorexidina 2%, os dentes foram irrigados com solução de *tween* 80 0,5% + lecitina de soja 0,07% (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil). Uma vez que na literatura ainda não existe relato de substância capaz de neutralizar o extrato glicólico de gengibre, a mesma não foi realizada. Após, todos os grupos (NaOCl; CLX; GENG) receberam irrigação final com 10 mL de solução salina fisiológica estéril e aprotínica e, em seguida, a 2ª Coleta foi realizada.

4.7 Segunda coleta

A 2ª coleta foi realizada de forma semelhante à 1ª coleta anteriormente descrita, tanto para análise em PCR quanto para cultura de microrganismos e quantificação de endotoxinas.

4.8 Medicação intracanal por 14 dias

Após a segunda coleta, os canais foram preenchidos com solução de EDTA 17% (Inodon, Porto Alegre, RS, Brasil) durante 3 minutos e lavados com 10 mL de solução salina fisiológica para posterior colocação da medicação intracanal utilizando hidróxido de cálcio Pró Análise (P.A.) (Asfer Indústria Química Ltda, São Caetano do Sul, SP, Brasil) associado ao propilenoglicol (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil) como veículo. A medicação foi introduzida nos canais radiculares com auxílio de limas e lentulo (Dentsply/Maillefer Instruments SA, Ballaigues, Switzerland) até completo preenchimento do canal. Após, rolha de hidróxido de cálcio foi colocada na região cervical do dente e, posteriormente, o dente foi selado com cimento de ionômero de vidro restaurador (S.S.White Artigos Dentários Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) por 14 dias (Figura 5).

A Figura 6 ilustra esquema da 1ª sessão do tratamento endodôntico o qual o paciente foi submetido.

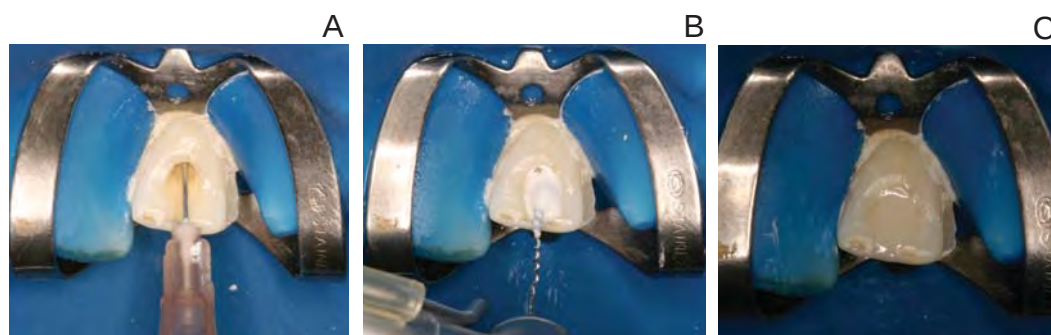


Figura 5 – Colocação da medicação intracanal. a) preenchimento do canal com EDTA 17%; b) medicação intracanal sendo introduzida com lentulo; c) selamento coronário com CIV.

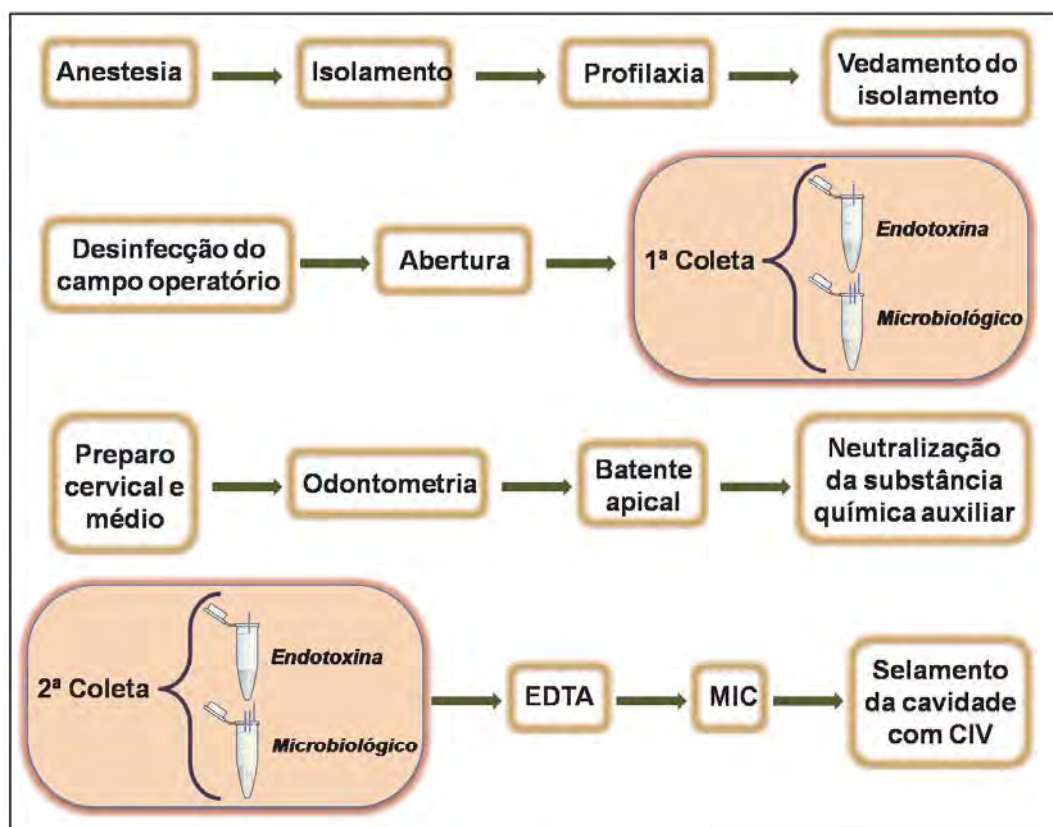


Figura 6 – Esquema da 1ª sessão de atendimento clínico.

4.9 Terceira coleta

Após 14 dias da data de colocação da medicação intracanal, o paciente foi novamente submetido à anestesia, isolamento e antisepsia do campo operatório (tomando todos os cuidados de forma semelhante à primeira sessão de atendimento), abertura coronária, remoção da medicação intracanal com LK #30 (Dentsply/Maillefer Instruments SA, Ballaigues, Switzerland) e irrigação com 10 mL de solução salina fisiológica. Em seguida, foi realizada a 3ª coleta de forma semelhante às coletas anteriormente descritas.

4.10 Obturação dos canais radiculares

Terminada a 3ª coleta, os dentes foram preenchidos com EDTA 17% por 3 minutos e irrigados com 10 mL de solução salina fisiológica estéril e apirogênica. Em seguida, os dentes foram obturados com cones de guta-percha (Dentsply Maillefer Ind. Com. Ltda. Petrópolis, RJ, Brasil) e cimento obturador AH *Plus* (Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz). Os dentes foram radiografados para comprovação de adequado preenchimento em extensão e lateralidade da obturação do canal radicular e, depois, restaurados (Figura 7).

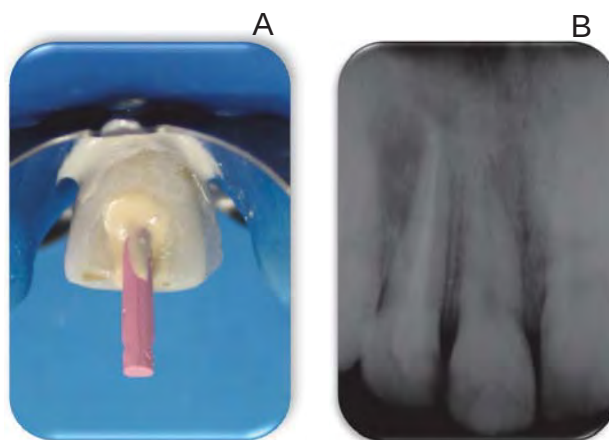


Figura 7 – Obturação do canal radicular. a) obturação com cone de guta percha e cimento AH Plus; b) radiografia comprovando adequado preenchimento do canal radicular.

A Figura 8 ilustra esquema da 2ª sessão do tratamento endodôntico o qual o paciente foi submetido.

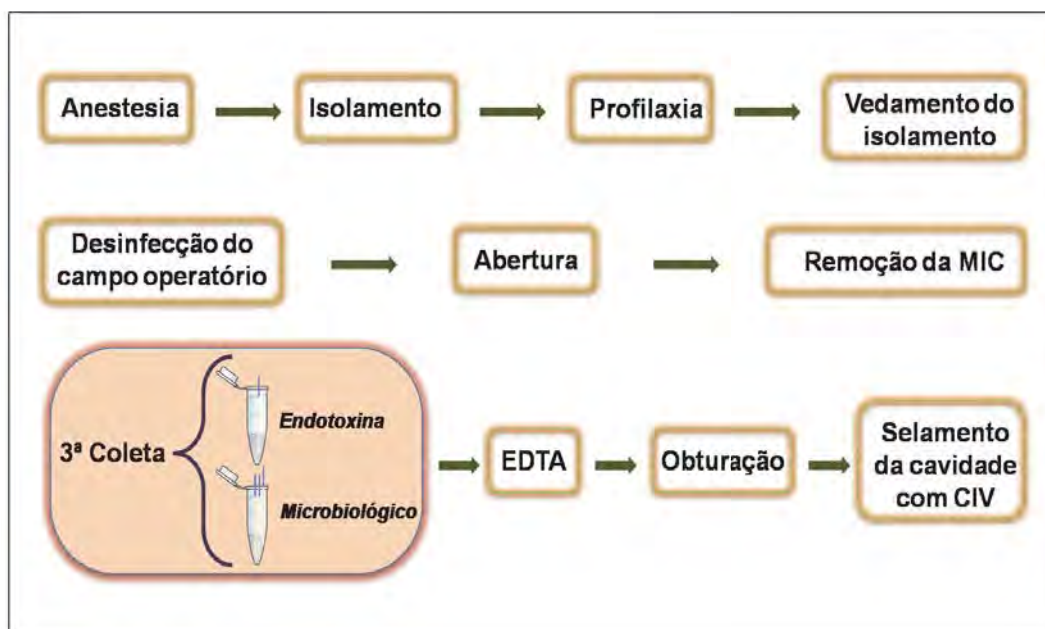


Figura 8 – Esquema da 2ª sessão do atendimento clínico.

4.11 Análise microbiológica

4.11.1 Cultura dos microrganismos

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

O eppendorf contendo os 3 cones de papel (amostra matriz) armazenados em 1 mL de meio de transporte pré-reduzido VMGA III foi agitado até a dessorção do conteúdo para facilitar a dispersão dos microrganismos. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas até 10000 vezes (Figura 9).

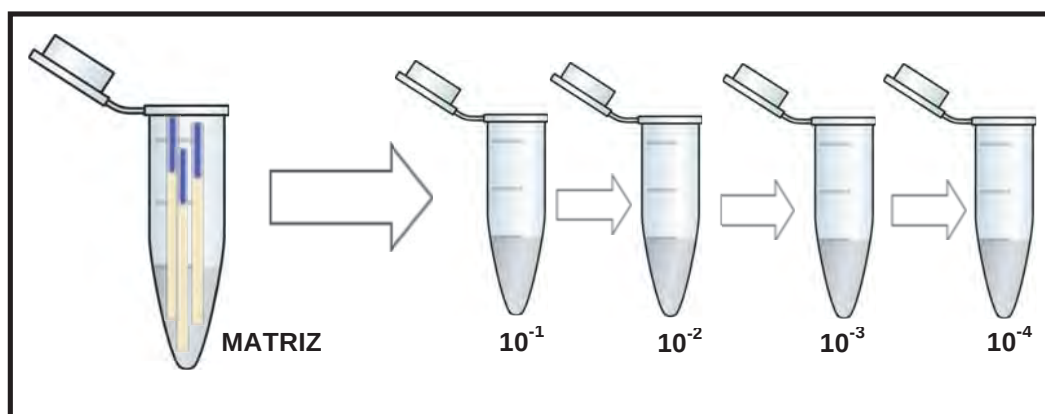


Figura 9 – Diluições seriadas a partir da amostra matriz.

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

- *Fastidious Anaerobe Agar* (FAA – Acumedia Manufacturers, Inc. Lansing, MI), acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado

(Microlab – Comércio e Serviços de Produtos para Laboratório, Campinas, SP, Brasil) suplementados por 600 µL de Hemina 1 mg/L (*Hemin Bovine Minimum* 80% – SIGMA H5533) e 600 µL de Menadiona 1 mg/L (*Vitamin K3; 2-Methyl-1,4-naphthoquinone* – SIGMA M5625). Essas placas foram incubadas a 37°C em jarras de anaerobiose (Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos LTDA., São Paulo, SP, Brasil) em atmosfera de 10% de H₂, 10% de CO₂, 80% de N₂ por 14 dias, para permitir a detecção de microrganismos anaeróbios (Figura 10).

- *Brain Heart Infusion* (BHI – Agar Infuso Cérebro Coração) (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mubai, Índia) acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado incubados a 37°C por 48 horas para permitir o crescimento de microrganismos anaeróbios facultativos e/ou aeróbios (Figura 10).

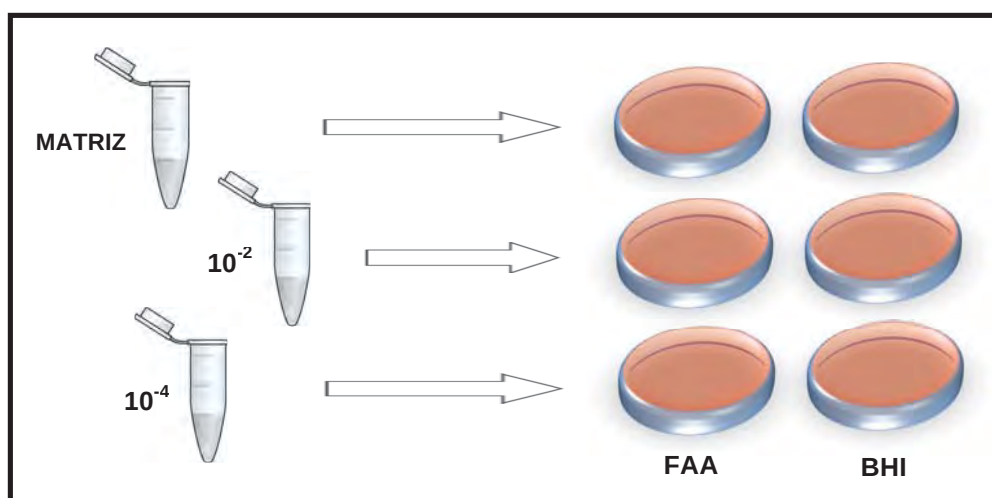


Figura 10 – Semeadura da amostra matriz e diluições no FAA.

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

- *Ágar Dextrose “Sabouraud”* (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mubai, Índia) acrescido de 0,1% de cloranfenicol - para permitir o crescimento de leveduras;
- *Ágar Enterococcosel* (Becton Dickinson and Company, Sparks, USA) - seletivo para detecção de espécies de enterococos;
- *Ágar Mitis Salivarius* (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mubai, Índia) - como meio seletivo de estreptococos;
- *Ágar Mac Conkey* (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mubai, Índia) - seletivo para detecção de espécies de enterobactérias (Figura 11).

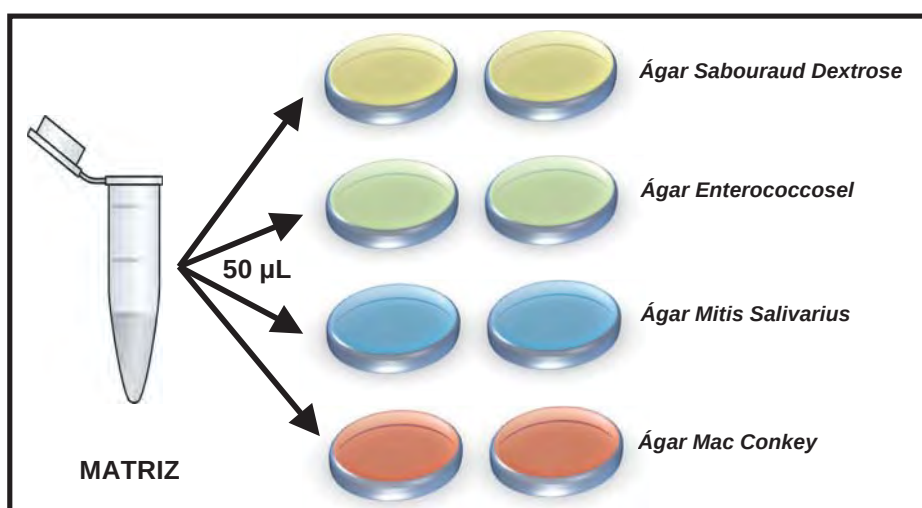


Figura 11 – Inoculação da amostra matriz nos meios seletivos.

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

4.11.2 Análise por PCR

Após a semeadura dos microrganismos (Item 4.11.1), os eppendorfs contendo os 3 cones de papel (amostras matrizes) armazenados em 1 mL de meio de transporte pré-reduzido VMGA III foram congeladas a -70°C, mantidas e transportadas em gelo seco até sua utilização. A realização desta parte experimental do trabalho foi realizada em parceria com o Laboratório da Endodontia da Universidade de Campinas de Piracicaba – UNICAMP.

Para detecção das espécies alvos pelo método PCR, DNA foi primeiramente extraído e foram empregados *primers* espécie-específicos, direcionados à região do gene 16S rRNA no DNA bacteriano. As sequências dos oligonucleotídeos foram obtidas a partir de referências na literatura.

Espécies de *Enterococcus faecalis*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Treponema denticola*, *Filifactor alocis*, e *Tanerella forsythia*, foram identificadas por uma segunda amplificação com *primers* espécie-específicos nas coletas dos canais radiculares.

4.11.2.1 Extração do DNA bacteriano

A extração do DNA bacteriano foi realizada com o QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Chatsworth, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante (**Apêndice C**) (Figura 12).



Figura 12 – Kit de extração de DNA “QIamp DNA Kit” (Qiagen, Chatsworth, CA, USA).

4.11.2.2 Reação de PCR

Inicialmente foi realizada PCR com *primer* universal para comprovação de presença de DNA bacteriano na amostra e somente depois com *primers* espécie-específicos.

A reação de PCR foi processada na quantidade total de 25 μ L de uma mistura de reagentes Master Mix contendo as quantidades

especificadas na Tabela 1 para 1,5 µL do DNA extraído da amostra (23,5 µL de reagentes + 1,5 µL de DNA extraído = 25 µL) (Quadro 1) (Figura 13).

Quadro 1 – Proporções de reagentes para 1,5 µL de DNA extraído

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

Os reagentes foram misturados em tubo de plástico tipo Eppendorf de 1,5 mL. A *Taq DNA Polimerase* utilizada foi a *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) que não se degrada com o aumento gradativo da temperatura, podendo ser acrescentada diretamente na mistura (MIX) da reação evitando a necessidade de pré-aquecimento.

A determinação da temperatura de anelamento ideal foi feita através de reações de PCR contendo *primers* espécie-específicos (Quadro 2) realizadas em um aparelho termociclador convencional e submetidas a vários gradientes de temperatura (Gene Pro - Thermal Cycler, BIOER Technology Hangzhou, China) utilizando amostras ATCCs correspondentes e baseadas na literatura de suporte (Figura 13). Além das amostras foi utilizado controle negativo com água extra pura (Invitrogen® - Life Technology do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) (Apêndice D).

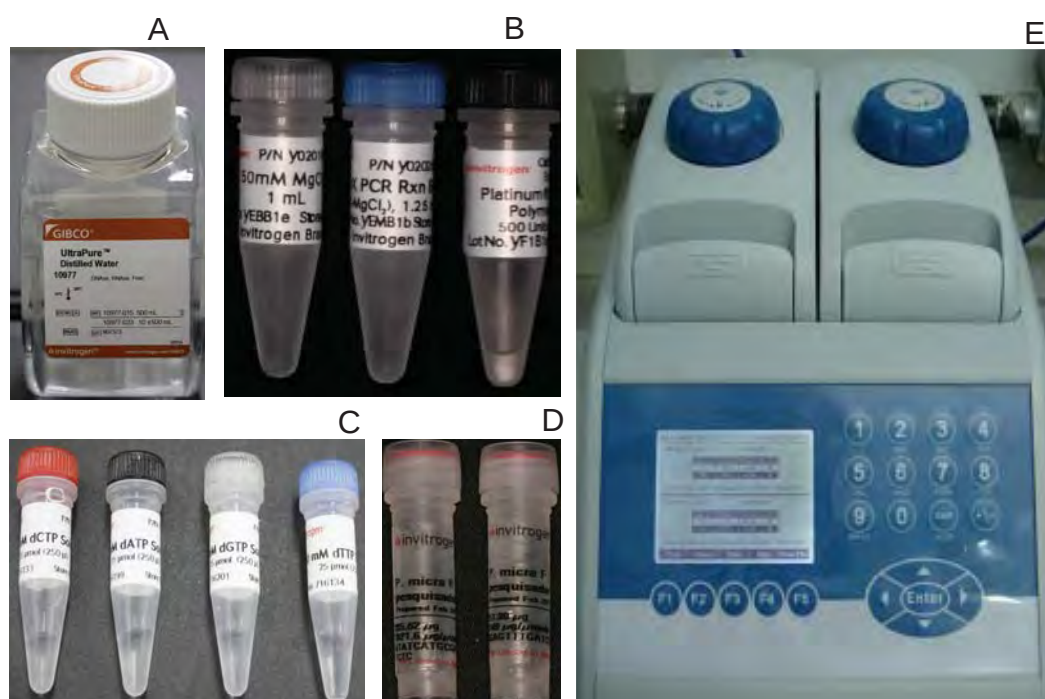


Figura 13 – Reagentes e equipamento necessários para reação de PCR. a) água destilada extra pura; b) conjunto *Taq Platinum* formado por solução tampão (*Buffer*), cloreto de magnésio (MgCl₂) e *Taq DNA Polimerase*; c) dNTPs; d) *primers*; e) termociladora.

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

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

4.11.2.3. Eletroforese em gel de agarose

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

Foi incluído em cada gel um padrão de peso molecular de 100 bp (pares de base) (DNA ladder, Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil). As condições para a eletroforese foram 80 volts, durante 40 minutos. Após o término deste período, as bandas foram observadas com auxílio de um transiluminador sob luz ultravioleta. A documentação fotográfica dos géis foi obtida com o sistema *Image Master* – VDS (Pharmacia Biotech, Cambridge, England) e a captura das imagens foram realizadas pelo programa LISCAP Image Capture Software (Figura 14), fornecido pelo mesmo fabricante. Reações positivas foram determinadas através da presença de bandas que apresentavam o comprimento apropriado, de acordo com o Quadro 2 (**Apendice E**).

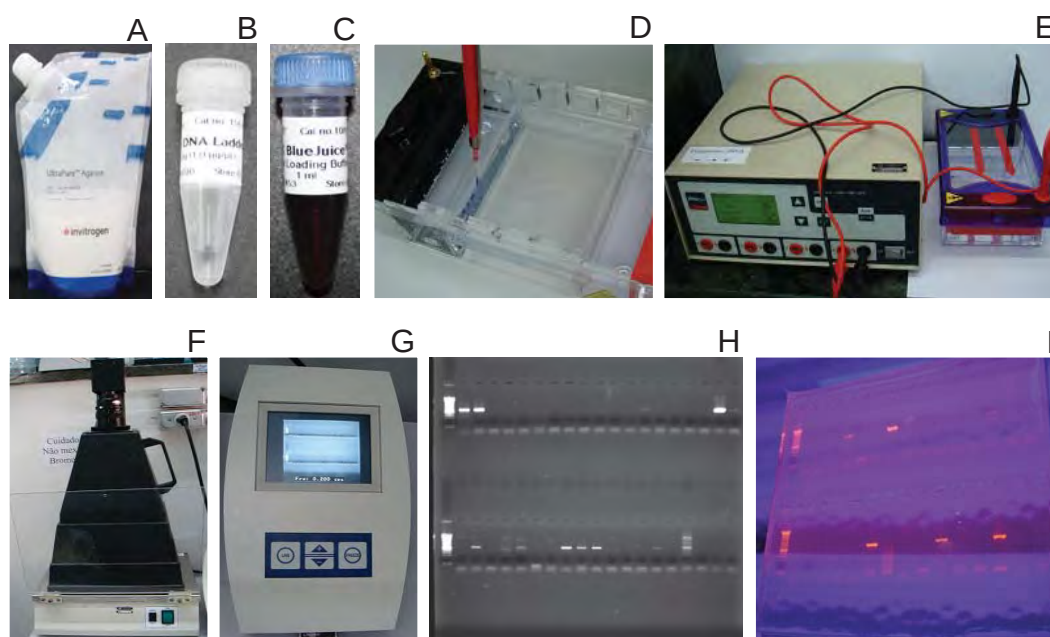


Figura 14 – Eletroforese em gel de agarose. a) pó do de agarose; b) *Ladder*; c) *Blue juice*; d) inoculação das amostras no gel de agarose; e) fonte acoplada à cuba de eletroforese; f) fotocomentador sobre transiluminador; g) fotodocumentador; h) imagem obtida pelo fotodocumentador; i) visualização das bandas referentes aos produtos de amplificação em gel de agarose sobre luz ultravioleta.

4.12 Quantificação de endotoxinas do canal radicular pelo teste cinético cromogênico (QCL) do lisado de amebócitos de *Limulus* (LAL)

Para verificar a neutralização da endotoxina foi utilizado o teste cinético quantitativo do lisado de amebócitos de *Limulus* (análise quantitativa) (Lonza, Walkersville, MD, EUA) e o conjunto *Limulus Amebocyte Lisate* Kinetic – QCL[®] Bulk Kit 50-650H (Lonza, Walkersville, MD, EUA). Este teste foi realizado em quadruplicata para todas as coletas do conteúdo do canal radicular.

Nos dias do teste (imediatamente após abertura do elemento dentário, imediatamente após instrumentação e imediatamente

após a remoção da medicação intracanal), as amostras coletadas do canal radicular foram submetidas à análise quantitativa de LPS pelo método cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (cinético QCL - LAL). Inicialmente foram realizadas diluições da endotoxina padrão de *Escherichia coli* em diferentes concentrações que iriam representar os padrões de comparação das amostras (curva-padrão) (**Apêndice F**). Para cada amostra, foi realizado um controle positivo (amostra do conteúdo do canal radicular adicionada de uma quantidade conhecida de endotoxina).

Em uma placa apirogênica de 96 poços, foram adicionados 100 µL de água apirogênica (branco da reação), os padrões de endotoxina, as amostras coletadas do canal radicular e os controles positivos. A placa foi incubada no leitor cinético QCL a $37\pm1^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos, o qual estava acoplado a um microcomputador com *software Wink QCL* específico para gerenciamento, execução e emissão de relatórios. Após, foram adicionados em cada poço da placa 100 µL do reagente cinético cromogênico do LAL, com uma micropipeta multicanal e ponteiras apirogênicas (Figura 15). Após o início do ensaio cinético, o *software* da leitora de microplacas monitorava, de forma contínua durante todo o ensaio, a absorbância a 405 nm em cada poço da microplaca. O leitor determinou o tempo necessário para aumentar a absorbância de cada poço a 0.200 unidades de absorbância, que foi o denominado tempo de reação. O *software WinkQCL* automaticamente calculou uma correlação linear log/log do tempo de reação de cada padrão com a concentração de endotoxina correspondente. Os parâmetros da curva-padrão foram impressos no relatório de impressão (**Apêndice G**).

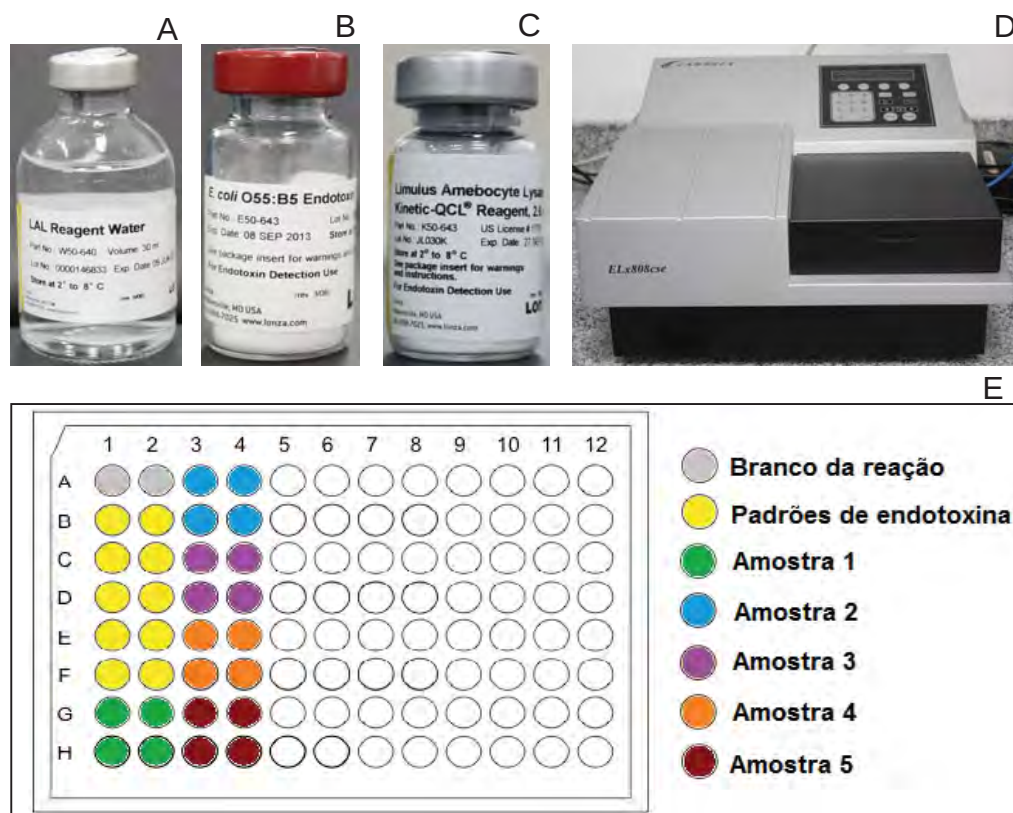


Figura 15 – Quantificação de endotoxinas. a) água apirogênica; b) endotoxina padrão de *E. coli*; c) reagente cinético cromogênico do LAL; d) leitor cinético QCL; e) esquema de montagem da placa de 96 poços.

4.13. Análise estatística

Para os dados obtidos pela análise por PCR e a correlação entre sinais e sintomas com a presença de microrganismos foi realizada análise descritiva. Os resultados de contagem de UFC/mL e teste cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (análise quantitativa) foram submetidos à análise estatística de *Kruskal Wallis* e teste de *Dunn*, com significância de 5%. Obtidos em cada coleta foram submetidos O teste do q-quadrado de *Pearson* foi utilizado para correlacionar quantidade de endotoxinas e tamanho das lesões periapicais.

5 RESULTADOS

5.1 Aspectos clínicos e radiográficos

Foram atendidos neste estudo 36 indivíduos que possuíam dentes com necrose pulpar e rarefação óssea periapical visível radiograficamente. Os pacientes tinham idade entre 13-69 anos, sendo a idade média de 40,6 anos. Vinte e três pacientes eram do sexo feminino e treze do sexo masculino.

Durante a anamnese, 6/36 relataram dor em algum momento previamente ao início do tratamento endodôntico. Clinicamente, foi observado que apenas 7/36 pacientes apresentavam dor à percussão vertical, 6/36 pacientes possuíam dor à palpação na região periapical, 2/36 pacientes com presença de fístula na região do elemento e apenas 1/36 paciente apresentou exsudação. Trinta e dois dos 36 dentes encontravam-se selados com deficiência na restauração, 2/36 dentes estavam íntegros e apenas 1/36 dente encontrava-se adequadamente restaurado. O tamanho das lesões periapicais variaram entre 1 e 10 mm de diâmetro. As características clínicas e radiográficas podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Características clínicas e radiográficas dos 36 pacientes submetidos ao tratamento endodôntico

(continua)

Grupo	Paciente	Idade	Gênero	Dente	Dor		Percussão	Palpação	Prévia*	Fístula	Exsudato	Condição do dente	Lesão periapical (mm)
Extrato glicólico de gengibre 20%	5	49	F	22	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Restauração deficiente	5
	6	36	F	33	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Restauração deficiente	1
	11	39	F	35	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	SIM	Restauração deficiente	4
	12	37	M	23	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Restauração deficiente	5
	13	39	F	14	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Restauração deficiente	5
	14	27	F	24	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Restauração deficiente	1
	30	58	F	31	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Restauração deficiente	8
	33	43	F	24	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Restauração deficiente	3
	34	40	F	15	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Restauração deficiente	5
	35	53	F	45	SIM	SIM	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	Restauração deficiente	5
	42	58	M	33	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Restauração deficiente	4
	45	33	F	21	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Restauração adequada	7

Tabela 1 – Características clínicas e radiográficas dos 36 pacientes submetidos ao tratamento endodôntico

(continuação)

Grupo	Paciente	Idade	Gênero	Dente	Dor		Fístula	Exsudato	Condição do dente	Lesão periapical (mm)
					Percussão	Palpação				
Hipoclorito de sódio 1%	15	61	M	22	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Restauração deficiente	4
	16	44	F	25	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Restauração deficiente	2
	17	22	F	11	SIM	SIM	NÃO	NÃO	Restauração deficiente	1
	18	32	F	11	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Dente íntegro	7
	19	47	M	11	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Restauração deficiente	4
	20	29	F	24	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Restauração deficiente	4
	28	36	M	33	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Restauração deficiente	2
	29	44	M	12	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Restauração deficiente	5
	48	14	M	21	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Restauração deficiente	3
	49	35	M	25	SIM	SIM	NÃO	NÃO	Restauração deficiente	8
	50	66	F	45	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Restauração deficiente	2
	51	25	M	21	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Restauração deficiente	4

Tabela 1 – Características clínicas e radiográficas dos 36 pacientes submetidos ao tratamento endodôntico

(conclusão)											
Grupo	Paciente	Idade	Gênero	Dente	Dor		Prévia*	Fístula	Exsudato	Condição do dente	Lesão periapical (mm)
					Percussão	Palpação					
Cloroxidina gel 2%	7	32	F	21	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	Dente íntegro	2
	8	40	M	25	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Restauração deficiente	5
	9	13	M	44	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	Restauração deficiente	8
	24	69	F	31	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Restauração deficiente	3
	25	37	F	24	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	Restauração deficiente	4
	26	50	F	44	SIM	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	Restauração deficiente	5
	27	40	F	43	NÃO	SIM	SIM	NÃO	NÃO	Restauração deficiente	4
	43	26	F	22	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	Restauração deficiente	8
	44	44	M	12	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Restauração deficiente	10
	46	44	F	24	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Restauração deficiente	2
	47	35	M	24	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Restauração deficiente	2
	52	66	F	44	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Restauração deficiente	3

* dor relatada previamente ao início do tratamento endodôntico.

5.2 Análise microbiológica

5.2.1 Método de cultura microbiológica

Para todas as coletas (após a abertura, após o preparo biomecânico e após a medicação intracanal) foi realizada a semeadura das amostras em placas contendo meios de cultura. A quantidade de microrganismos em UFC/mL obtidos nas 1^a, 2^a e 3^a coletas estão expressos na Tabela 2, podendo-se verificar prevalência de microrganismos na coleta inicial, mostrando uma redução nas etapas subseqüentes. Microrganismos anaeróbios estritos e/ou facultativos, leveduras, microrganismos sugestivos de estreptococos, enterococos e enterobactérias puderam ser encontrados (Figura 16). Considerando a contagem de UFC/mL em cada meio, a Tabela 3 mostra que houve predomínio de microrganismos anaeróbios nos dentes com infecção primária.

Após o preparo biomecânico (2^a coleta), observou-se ausência de crescimento microbiano em 9 casos (25%), três em cada grupo (Tabela 2).

Na segunda sessão, 14 dias após a colocação da medicação intracanal de hidróxido de cálcio, houve um crescimento microbiano em 18/36 dentes (50%). Destes, quatro (4/18) foram casos que na 2^a coleta não havia sido detectado UFC/mL em cultura microbiológica.

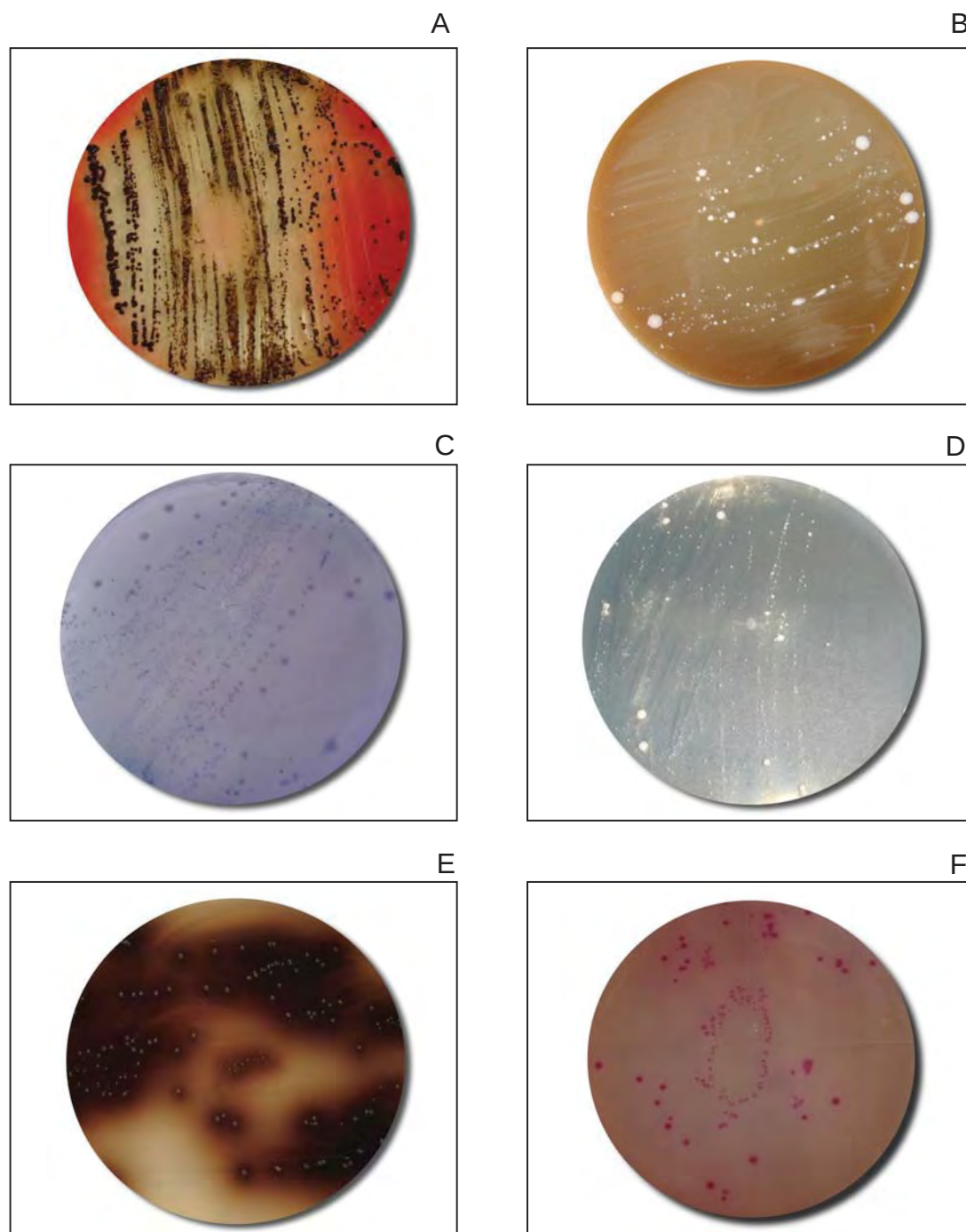


Figura 16 – Crescimento microbiológico em placas de Agar. a) microrganismos anaeróbios; b) microrganismos anaeróbios estritos e/ou facultativos e aeróbios; c), microrganismos sugestivo de estreptococos; d) leveduras; e) microrganismos sugestivo de enterococos; f) microrganismos sugestivo de enterobactérias.

Tabela 2 – Quantidade de microrganismos em UFC/mL obtidos nas 1^a, 2^a e 3^a coletas nos diferentes grupos experimentais

		Microrganismos												(continua)					
Grupos	Pacientes	Anaeróbios			Aeróbios e/ou anaeróbios facultativos			Estreptococos*			Leveduras			Enterococos**			Enterobactérias***		
		1 ^a C	2 ^a C	3 ^a C	1 ^a C	2 ^a C	3 ^a C	1 ^a C	2 ^a C	3 ^a C	1 ^a C	2 ^a C	3 ^a C	1 ^a C	2 ^a C	3 ^a C			
Extrato Glicólico de Gengibre 20%	5	48000000	1000	0	1000000000	74000	0	1280	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	6	6000	0	20	0	0	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	11	560000	120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	12	800000	0	0	2000	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	13	50000	20	2600000	50000	60	80000	4180	0	1600	0	0	1280	0	440	1560	0		
	14	2480	0	220	2000	0	520	60	0	120	0	0	0	0	40	0	0		
	30	47200000	14000	260	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	33	2000	1600000	3800000	0	0	360	0	0	160	0	0	0	0	0	0	0		
	34	134400000	140	6000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	35	83200000	20	1520	86000	0	0	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	45	5580	0	0	1620	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Média	26185505	134608,3	534001,7	83345140	6175	6743,3	476,7	0	156,7	0	0	356,7	0	40	130	0	0	

Tabela 2 – Quantidade de microrganismos em UFC/mL obtidos nas 1^a, 2^a e 3^a coletas nos diferentes grupos experimentais

(continuação)

Grupos	Pacientes	Microrganismos																	
		Anaeróbios			Aeróbios e/ou anaeróbios facultativos			Streptococos*			Leveduras			Enterococos**			Enterobactérias***		
		1ªC	2ªC	3ªC	1ªC	2ªC	3ªC	1ªC	2ªC	3ªC	1ªC	2ªC	3ªC	1ªC	2ªC	3ªC	1ªC	2ªC	3ªC
Hipoclorito de sódio 1%	15	5400000	200000	220	220	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	16	2000	0	460	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	17	14000	40	0	2960	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	18	320	20	2880	200	0	500	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	19	57600000	400000	340	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20	28000000	2000	720	80000	40	0	80	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	28	8000	20	0	500	0	180	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	29	10400000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	49	16200000	0	0	608000	0	0	16800	0	0	16800	0	0	8000	0	0	0	0	0
	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
51	0	20	0	4960	180	0	8000	0	0	5640	0	0	1700	0	0	0	0	0	
	Média	9802027	50175	385	58071,7	18,3	56,66667	2073,3	0	3,3	1870	0	0	808,3	0	0	0	0	0

Tabela 2 – Quantidade de microrganismos em UFC/mL obtidos nas 1^a, 2^a e 3^a coletas nos diferentes grupos experimentais

Grupos	Pacientes	Microrganismos																		(conclusão)
		Anaeróbios			Aeróbios e/ou anaeróbios facultativos			Estreptococos*			Leveduras			Enterococos**			Enterobactérias***			
		1 ^a C	2 ^a C	3 ^a C	1 ^a C	2 ^a C	3 ^a C	1 ^a C	2 ^a C	3 ^a C	1 ^a C	2 ^a C	3 ^a C	1 ^a C	2 ^a C	3 ^a C	1 ^a C	2 ^a C	3 ^a C	
Clorexidina gel 2%	7	0	20	0	2000	0	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	3600000	4200000	500	0	0	400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	9	6200000	80	100	114000	0	60	460	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
	24	800	80	220	240	0	0	140	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	25	420	0	240	40	0	160	0	0	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	26	660	40	34000	0	0	60	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0
	27	42000	40	380	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	46	1600000	0	0	32000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	47	8000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	52	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Média		954323,3	350021,7	2953,3	12356,7	0	60	50	0	5	0	0	0	8,3	0	0	0	0	0	1,7

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

Tabela 3 – Frequencia (em porcentagem) dos tipos de microrganismos encontrados na coleta inicial de cada amostra (n=36)

Paciente	Anaeróbios	Aeróbios e/ou anaeróbios facultativos	Estreptococos*	Leveduras	Enterococos**	Enterobactérias***
5	4.6	95.4	0.0	0.0	0.0	0.0
6	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
11	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
12	99.8	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0
13	46.7	46.7	3.9	0.0	1.2	1.5
14	54.6	44.1	1.3	0.0	0.0	0.0
30	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
33	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
34	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
35	99.9	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
42	NC****	NC****	NC****	NC****	NC****	NC****
45	77.5	22.5	0.0	0.0	0.0	0.0
15	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
16	99.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0
17	82.5	17.5	0.0	0.0	0.0	0.0
18	61.5	38.5	0.0	0.0	0.0	0.0
19	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
20	99.7	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0
28	94.1	5.9	0.0	0.0	0.0	0.0
29	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
48	NC****	NC****	NC****	NC****	NC****	NC****
49	96.1	3.6	0.1	0.1	0.0	0.0
50	NC****	NC****	NC****	NC****	NC****	NC****
51	0.0	24.4	39.4	27.8	8.4	0.0
7	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
8	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
9	98.2	1.8	0.0	0.0	0.0	0.0
24	67.8	20.3	11.9	0.0	0.0	0.0
25	91.3	8.7	0.0	0.0	0.0	0.0
26	86.8	0.0	0.0	0.0	13.2	0.0
27	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
43	NC****	NC****	NC****	NC****	NC****	NC****
44	NC****	NC****	NC****	NC****	NC****	NC****
46	98.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0
47	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
52	NC****	NC****	NC****	NC****	NC****	NC****
Média	81,94	14,43	1,89	0,93	0,760	0,05

* Sugestivo de Estreptococos ** Sugestivo de Enterococos; *** Sugestivo de Enterobactérias;**** Não calculável.

De acordo com a contagem de UFC/mL em cada meio seletivo, foi obtida análise descritiva (média, desvio padrão e mediana) dos percentuais de redução referentes à 1ª x 2ª coleta, 1ª x 3ª coleta e 2ª x 3ª coleta, considerando o número total de microrganismos independente do meio (Tabela 4) e o número de microrganismos em cada meio de cultura (Tabela 5).

Tabela 4 – Percentuais de redução de microrganismos (média, desvio padrão e mediana em porcentagem referente à diminuição de UFC/mL) obtidos nas 2ª e 3ª coletas de cada grupo experimental (Valores negativos indicam aumento do número de microrganismos)

Coletas	Extrato Glicólico de Gengibre 20%				Hipoclorito de sódio 1%				Clorexidina gel 2%			
	N	Média	DP*	Mediana	N	Média	DP*	Mediana	N	Média	DP*	Mediana
1ª x 2ª	25	-3100	16000	100	24	99,38	1,579	100	16	91,7	29,03	100
1ª x 3ª	25	-7727	37967	100	24	48,6	187,8	100	16	-252	1284	100
2ª x 3ª	10	-1314446	4106060	-20	9	-1504	4799	100	6	-14292	34593	-100

* Desvio-padrão.

Tabela 5 – Percentuais de redução de microrganismos (média, desvio padrão, mediana em porcentagem referente à diminuição de UFC/mL) obtidos entre a 1ª e 2ª coleta, 1ª e 3ª coleta e 2ª e 3ª coleta nos diferentes meios seletivos, de cada grupo experimental

Grupos	Microorganismos	1ª x 2ª			1ª x 3ª			2ª x 3ª					
		N	Média	DP*	Mediana	N	Média	DP*	Mediana	N	Média	DP*	Mediana
Extrato glicólico de gengibre 20%	Anaeróbios	11	-71,73	24121	100	11	-17646	57151	100	7	-1858755	4912775	-138
	Aeróbios e/ou anaeróbios facultativos	7	99,696	0,749	100	7	73,4	59,6	100	3	-44344	76980	100
	Leveduras	0	NC**	NC**	NC**	0	NC**	NC**	NC**	0	NC**	NC**	NC**
	Estreptococos***	4	100	0	100	4	40,4	95,3	80,9	0	NC**	NC**	NC**
	Enterococos****	2	100	0	100	2	82,8	24,3	82,8	0	NC**	NC**	NC**
Hipoclorito de sódio 1%	Enterobactérias*****	1	100	NC**	100	1	100	NC**	100	0	NC**	NC**	NC**
	Anaeróbios e/ou facultativos	9	98,757	2,222	99,750	9	-2,6	299,1	100	7	-1962	5440	100
	Aeróbios e/ou anaeróbios facultativos	8	99,54	1,281	100	8	64,3	87,5	100	2	100	0	100
	Leveduras	2	100	0	100	2	100	0	100	0	NC**	NC**	NC**
	Estreptococos***	3	100	0	100	3	91,67	14,43	100	0	NC**	NC**	NC**
Clorexidina gel 2%	Enterococos****	2	100	0	100	2	100	0	100	0	NC**	NC**	NC**
	Enterobactérias*****	0	NC**	NC**	NC**	0	NC**	NC**	NC**	0	NC**	NC**	NC**
	Anaeróbios e/ou facultativos	8	83,4	40,6	100	8	-555	1817	100	6	-14292	34593	-100
	Aeróbios e/ou anaeróbios facultativos	5	100	0	100	5	19,6	178,7	99,9	0	NC**	NC**	NC**
	Leveduras	0	NC**	NC**	NC**	0	NC**	NC**	NC**	0	NC**	NC**	NC**
Clorexidina gel 2%	Estreptococos***	2	100	0	100	2	100	0	100	0	NC**	NC**	NC**
	Enterococos****	1	100	NC**	100	1	100	NC**	100	0	NC**	NC**	NC**
	Enterobactérias*****	0	NC**	NC**	NC**	0	NC**	NC**	NC**	0	NC**	NC**	NC**

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

Analisando a Tabela 4 verificou-se que houve redução de microrganismos após o uso das soluções irrigadoras quando comparado com a quantidade inicial obtida na 1ª coleta. A medicação intracanal no período de 14 dias não foi capaz de eliminar os microrganismos verificando-se aumento de UFC/mL nos grupos irrigados com extrato glicólico de gengibre 20% e clorexidina gel 2%, indicando que após o uso da MIC, microrganismos permaneceram no canal radicular (14/36) ou os canais foram recolonizados (4/18).

A Tabela 5 mostra que todas as substâncias químicas auxiliares testadas foram eficientes sobre microrganismos anaeróbios estritos e/ou facultativos, leveduras e microrganismos sugestivos de estreptococos, enterococos e enterobactérias. Uma vez que após o preparo biomecânico (2ª coleta) alguns espécimes apresentaram ausência de UFC/mL, o percentual de redução da 2ª x 3ª coleta não pôde ser calculado. Além disso, quando o percentual de redução foi calculado para apenas 1 espécime, estatisticamente não existe desvio padrão.

Analisando os percentuais de redução (Tabela 4), os resultados indicam que a irrigação durante o preparo biomecânico com hipoclorito de sódio 1% apresentou os melhores resultados numéricos, com valor de redução média de 99,38%, seguido da irrigação com clorexidina gel 2% (redução média de 91,7%) e, por último, apresentando piores resultados numéricos de redução média, o grupo irrigado com extrato glicólico de gengibre 20% (redução média de -3100). Entretanto, no grupo irrigado com extrato glicólico de gengibre 20%, houve 1 espécime (dente 33 – 8º espécime do grupo) com valor de UFC/mL discrepante, comprovado pelo valor do desvio padrão que foi de 16000. A estatística obtida neste grupo apresentou média de redução a um valor negativo (que indica aumento da quantidade de UFC/mL após o PBM com extrato glicólico de gengibre 20%), podendo ter acarretado num resultado que não é real. Desta forma, a Tabela 6 mostra a análise descritiva dos percentuais de redução das diferentes coletas do grupo GENG tirando

este espécime discrepante, podendo ser observado redução média de UFC/mL de -3100 para 99,91. Além disso, analisando a Tabela 2 (médias de UFC/mL), o número de UCF/mL encontrado na 1ª coleta de microrganismos anaeróbios (FAA) e aeróbios e/ou anaeróbios facultativos (BHI enriquecido com sangue de carneiro) foi a mais elevada quando comparado aos demais grupos, mostrando que havia muito mais microrganismos nesse grupo antes do tratamento do que nos demais grupos.

Ao comparar cada percentual de redução nos diferentes grupos experimentais (Tabela 7) verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa, isto é, que o preparo biomecânico, independente da substância química auxiliar utilizada, bem como a MIC, foram capazes de reduzir microrganismos sem diferenças entre si.

Em todos os grupos a utilização da MIC não interferiu nos resultados de redução microbiológica. No entanto, após a utilização da MIC utilizada no grupo irrigado com extrato glicólico de gengibre 20% verificou-se aumento significativo da quantidade de microrganismos quando comparado à redução obtida logo após o preparo biomecânico (Tabela 8).

Tabela 6 – Percentuais de redução de microrganismos (média, desvio padrão e mediana em porcentagem referente à diminuição de UFC/mL) obtidos nas 2ª e 3ª coletas do grupo irrigado com extrato glicólico de gengibre 20% sem a amostra discrepante

Coletas	Extrato Glicólico de Gengibre 20%			
	N	Média	DP*	Mediana
1ª x 2ª	24	99,91	0,407	100
1ª x 3ª	24	-136	1059	100
2ª x 3ª	9	-1460480	4327502	98

* Desvio-padrão.

Tabela 7 – Grupos homogêneos e valores de “p” comparando os diferentes grupos experimentais em cada percentual de redução de microrganismos (letras diferentes = diferença estatisticamente significativa)

Grupos	Coletas		
	1 ^a x 2 ^a	1 ^a x 3 ^a	2 ^a x 3 ^a
Extrato glicólico de gengibre 20%	A	A	A
Hipoclorito de sódio 1%	A	A	A
Clorexidina gel 2%	A	A	A
Valor de “p”	0,9943	0,3312	0,2718

Tabela 8 – Grupos homogêneos e valores de “p” comparando os diferentes percentuais de redução de microrganismos dentro do mesmo grupo experimental (letras diferentes = diferença estatisticamente significativa)

Coletas	Grupos		
	Extrato glicólico de gengibre 20%	Hipoclorito de sódio 1%	Clorexidina gel 2%
1 ^a x 2 ^a	A	A	A
1 ^a x 3 ^a	AB	A	A
2 ^a x 3 ^a	B	A	A
Valor de “p”	0,0052	0,7182	0,0659

5.2.2 Método molecular PCR

Todas as amostras (n=108), dos 36 canais radiculares de dentes com necrose pulpar e lesão periapical apresentaram DNA bacteriano quando foi empregado o *primer universal* direcionado ao gene 16S rRNA. Todos os microrganismos investigados neste estudo foram encontrados em pelo menos um momento das coletas (1^a, 2^a e/ou 3^a

coletas) (Figura 17).

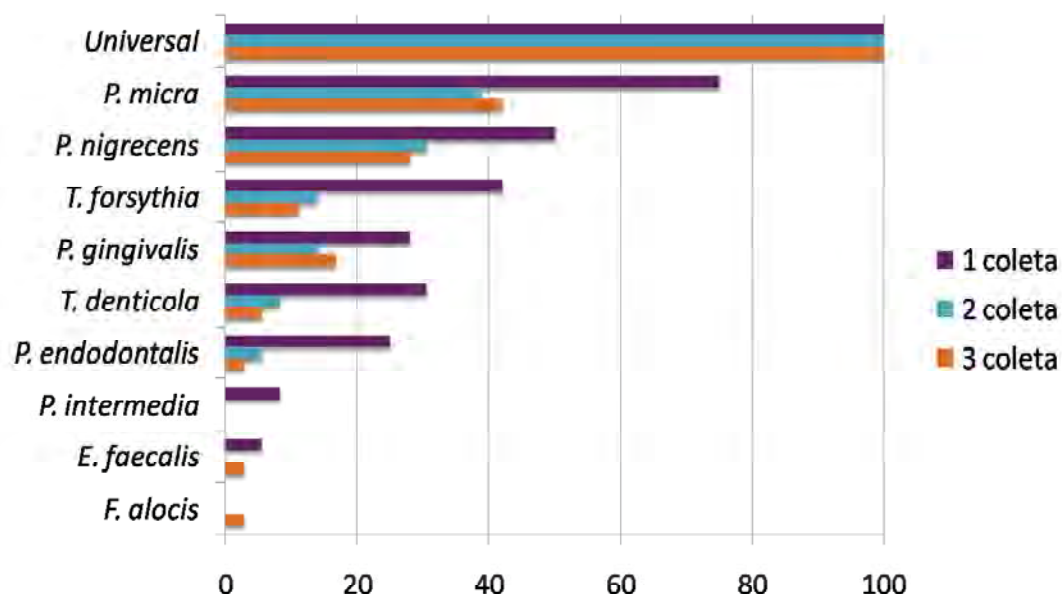


Figura 17 – Porcentagem de microrganismos detectados relacionando cada espécie com o número de canais analisados (n=36) distribuídos na 1ª coleta (realizada após a abertura coronária), 2ª coleta (após o PBM) e 3ª coleta (após 14 dias da ação da MIC).

A frequência de microrganismos detectados através do método molecular de PCR nas diferentes coletas realizadas de 36 canais radiculares de dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical, totalizando 108 amostras (36 multiplicado por 3), está elucidada na Tabela 9.

Na coleta inicial 8 dos 9 microrganismos investigados foram detectados pelo método molecular de PCR, sendo que apenas microrganismos da espécie *Filifactor alocis* não foram detectados. *Parvimonas micra* (27/36), *Prevotella nigrescens* (18/36) e *Tanerella forsythia* (15/36) foram as espécies mais frequentemente encontradas. *Prevotella intermedia* e *Enterococcus faecalis* foram detectados em apenas 3/36 e 2/36 casos, respectivamente.

Após o PBM, independentemente do tipo de solução irrigadora utilizada, apenas 6 das 8 espécies encontradas na 1ª coleta

puderam ser detectadas. *Prevotella intermedia* e *Enterococcus faecalis* foram as espécies não detectadas na 2ª coleta .

Após a remoção da medicação intracanal de hidróxido de cálcio (3ª coleta), foram detectadas 8 espécies bacterianas, predominando *Parvimonas micra* (15/36) e *Prevotella nigrescens* (10/36). Espécie de *Filifactor alocis*, que não havia sido detectada em nenhuma das coletas até o momento, pôde ser detectada na 3ª coleta em 1 das 36 amostras. A relação dos microrganismos encontrados nas amostras pode ser observada na Tabela 9.

Tabela 9 – Quantidade de microrganismos detectados através do método molecular de PCR nas diferentes coletas realizadas de 36 canais radiculares de dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical

Microrganismos	1ª Coleta	2ª Coleta	3ª Coleta	Total
<i>Parvimonas micra</i>	27	14	15	56
<i>Prevotella nigrescens</i>	18	11	10	39
<i>Tanerella forsythia</i>	15	5	4	24
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	10	5	6	21
<i>Treponema denticola</i>	11	3	2	16
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	9	2	1	12
<i>Prevotella intermedia</i>	3	0	0	3
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	0	1	3
<i>Filifactor alocis</i>	0	0	1	1
Total	95	40	40	175

A Tabela 10 apresenta as espécies bacterianas investigadas e detectadas pelo método de PCR, em cada coleta de cada canal radicular (n=36). Nesta Tabela também pode ser observada a relação entre os microrganismos detectados e crescimento de microrganismos anaeróbios pelo método de cultura microbiológica.

Tabela 10 – Relação entre microrganismos detectados pelo método de PCR e CFU/mL de anaeróbios (meio *Fastidious Anaerobe Agar*) de cada dente deste estudo

(continua)

Grupos	Pacientes	Coletas					
		1ª Coleta		2ª Coleta		3ª Coleta	
		PCR	UFC	PCR	UFC	PCR	UFC
Extrato glicólico de gengibre 20%	5	<i>P. micra</i> <i>T. forsythia</i>	+	<i>T. forsythia</i>	+	<i>T. forsythia</i>	
	6	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. nigrescens</i>	+	Não detectado		Não detectado	+
	11	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. nigrescens</i> <i>P. gingivalis</i> <i>T. denticola</i>	+	<i>P. micra</i> <i>P. nigrescens</i> <i>P. gingivalis</i>	+	<i>P. micra</i> <i>P. nigrescens</i> <i>P. gingivalis</i>	
	12	<i>P. micra</i>	+	Não detectado		Não detectado	
	13	Não detectado	+	Não detectado	+	Não detectado	+
	14	<i>P. nigrescens</i>	+	<i>P. nigrescens</i>		Não detectado	+
	30	<i>P. micra</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i>	+	<i>P. micra</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i>	+	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. nigrescens</i>	+
	33	<i>P. micra</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. denticola</i>	+	<i>P. micra</i> <i>P. gingivalis</i>	+	<i>P. gingivalis</i> <i>P. nigrescens</i>	+
	34	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. nigrescens</i> <i>P. gingivalis</i> <i>T. denticola</i> <i>E. faecalis</i>	+	<i>P. micra</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. nigrescens</i>	+	Não detectado	+
	35	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i>	+	Não detectado	+	<i>P. nigrescens</i>	+
	42	<i>P. micra</i>		<i>P. micra</i> <i>P. nigrescens</i>		Não detectado	
	45	<i>P. micra</i> <i>P. gingivalis</i> <i>T. forsythia</i>	+	<i>P. gingivalis</i> <i>T. forsythia</i>		<i>T. forsythia</i>	

Tabela 10 – Relação entre microrganismos detectados pelo método de PCR e CFU/mL de anaeróbios (meio *Fastidious Anaerobe Agar*) de cada dente deste estudo

(continuação)

Grupos	Pacientes	Coletas					
		1ª Coleta		2ª Coleta		3ª Coleta	
		PCR	UFC	PCR	UFC	PCR	UFC
Hipoclorito de sódio 1%	15	<i>P. micra</i> <i>P. gingivalis</i> <i>T. denticola</i>	+	<i>P. micra</i> <i>T. denticola</i>	+	<i>P. micra</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. nigrescens</i>	+
	16	<i>P. micra</i> <i>P. nigrescens</i>	+	<i>P. nigrescens</i>		<i>P. micra</i>	+
	17	<i>P. micra</i> <i>E. faecalis</i>	+	Não detectado	+	<i>E. faecalis</i>	
	18	<i>P. gingivalis</i>	+	<i>P. nigrescens</i>	+	Não detectado	+
	19	<i>P. micra</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. nigrescens</i>	+	Não detectado	+	<i>P. nigrescens</i>	+
	20	<i>T. denticola</i> <i>T. forsythia</i>	+	<i>T. forsythia</i>	+	<i>P. gingivalis</i>	+
	28	<i>P. nigrescens</i>	+	Não detectado	+	Não detectado	
	29	<i>T. denticola</i> <i>T. forsythia</i>	+	Não detectado		<i>P. nigrescens</i>	
	48	<i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i>		Não detectado		Não detectado	
	49	<i>P. micra</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i>	+	<i>P. nigrescens</i>		<i>P. micra</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i>	
	50	<i>P. nigrescens</i>		<i>P. nigrescens</i>		<i>P. gingivalis</i> <i>P. nigrescens</i>	
	51	<i>P. micra</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i>		<i>P. micra</i> <i>P. nigrescens</i>	+	<i>P. micra</i> <i>P. gingivalis</i> <i>T. forsythia</i>	

Tabela 10 – Relação entre microrganismos detectados pelo método de PCR e CFU/mL de anaeróbios (meio *Fastidious Anaerobe Agar*) de cada dente deste estudo

(conclusão)

Grupos	Pacientes	Coletas					
		1ª Coleta		2ª Coleta		3ª Coleta	
		PCR	UFC	PCR	UFC	PCR	UFC
Clorexidina gel 2%	7	<i>P. micra</i>	+	Não detectado	+	<i>P. micra</i>	+
	8	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. intermedia</i>	+	<i>P. micra</i>	+	Não detectado	+
	9	<i>P. micra</i> <i>T. forsythia</i> <i>T. denticola</i>	+	<i>P. micra</i>	+	<i>P. micra</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. denticola</i>	+
	24	Não detectado	+	Não detectado	+	Não detectado	+
	25	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. intermedia</i> <i>T. forsythia</i> <i>T. denticola</i>	+	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i> <i>T. denticola</i>		<i>P. micra</i>	+
	26	<i>P. micra</i> <i>P. intermedia</i>	+	<i>P. micra</i>	+	<i>P. micra</i>	+
	27	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i> <i>T. denticola</i>	+	<i>T. denticola</i>	+	<i>P. micra</i>	+
	43	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i> <i>T. denticola</i> <i>F. alocis</i>		Não detectado		<i>P. micra</i>	
	44	<i>P. micra</i> <i>P. gingivalis</i> <i>T. forsythia</i>		<i>P. micra</i>		<i>T. denticola</i>	
	46	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i> <i>T. denticola</i>	+	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. nigrescens</i>		<i>P. micra</i>	
	47	<i>P. micra</i> <i>P. nigrescens</i>	+	Não detectado		<i>P. micra</i>	
	52	<i>P. micra</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i>		<i>P. micra</i> <i>T. forsythia</i>		<i>P. micra</i>	

+ Cultura microbiológica positiva em ágar FAA.

Nas coletas iniciais de todos os grupos houve maior quantidade de espécies detectadas em comparação com as demais (2ª e 3ª) coletas. Após o PBM com extrato glicólico de gengibre 20%, 3 de 7 espécies encontradas na 1ª coleta não foram detectadas, sendo estas *P. endodontalis*, *T. denticola* e *E. faecalis*. No entanto, *P. endodontalis* pôde ser encontrado após o uso da MIC. No grupo irrigado com hipoclorito de sódio 1%, logo após o PBM, 2 das 6 espécies encontradas na 1ª coleta não foram detectadas, sendo estas *E. faecalis* e *P. gingivalis*, embora tenham sido detectadas na 3ª coleta. Também no grupo cuja substância química auxiliar utilizada foi a clorexidina gel 2%, 2 espécies anteriormente encontradas não foram detectadas (2/7 espécies), sendo estas *T. denticola* e *P. intermedia*. *T. denticola* ainda pôde ser encontrada após o uso da MIC.

Parvimonas micra foi a espécie bacteriana mais frequentemente encontrada, estando presente em mais de 50% do total de amostras (n=108), incluindo todas as coletas.

A Tabela 11 apresenta a relação entre os pacientes que apresentaram sintomatologia dolorosa antes do tratamento endodôntico e os microrganismos detectados por PCR na primeira coleta.

Tabela 11 – Dados clínicos, radiográficos e detecção de microrganismos de pacientes que apresentaram sinal ou sintoma em algum momento prévio ao tratamento endodôntico (n=10)

Paciente	Dente	Dor à Percussão	Dor à Palpação	Dor prévia	Fístula	Exsudato	Tamanho da lesão	PCR
11	35	SIM	NÃO	NÃO	SIM	SIM	4 mm	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. nigrescens</i> <i>P. gingivalis</i> <i>T. denticola</i>
35	45	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	5 mm	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i>
17	11	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	1 mm	<i>P. micra</i> <i>E. faecalis</i>
49	25	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	8 mm	<i>P. micra</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i>
7	21	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	2 mm	<i>P. micra</i>
9	44	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	8 mm	<i>P. micra</i> <i>T. forsythia</i> <i>T. denticola</i>
25	24	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	4 mm	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. intermedia</i> <i>T. forsythia</i> <i>T. denticola</i>
26	44	SIM	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	5 mm	<i>P. micra</i> <i>P. intermedia</i>
27	43	NÃO	SIM	SIM	NÃO	NÃO	4 mm	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i> <i>T. denticola</i>
43	22	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	8 mm	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i> <i>T. denticola</i> <i>F. alocis</i>

5.3 Quantificação de endotoxinas

Os valores de endotoxinas em EU/mL obtidos em cada amostra dos grupos experimentais encontram-se na Tabela 12. Percentuais de redução das 2ª e 3ª coletas em relação à 1ª coleta e da 3ª coleta em relação à 2ª coleta podem ser observados na Tabela 13.

Analisando os resultados, pode-se observar que houve diminuição da endotoxina após o PBM (2ª coleta) e após a MIC (3ª coleta) em todos os grupos quando comparado a coleta inicial (1ª coleta).

Comparando-se os percentuais de redução obtidos em cada grupo experimental, nota-se que não houve diferenças estatísticas significantes quanto às reduções (Tabela 14) nem quanto aos grupos (Tabela 15). No entanto, pode ser observado que, imediatamente após a instrumentação com extrato glicólico de gengibre 20%, a redução de EU/mL foi maior quando comparado aos demais grupos (Tabela 13). A utilização da MIC foi capaz de diminuir quantidade de endotoxinas de canais radiculares com necrose pulpar e lesão periapical, mas a máxima redução alcançada foi de 87% (Tabela 13).

A quantidade de endotoxinas encontrada em cada amostra foi correlacionada com o tamanho da lesão periapical ($\leq 3\text{mm}$ – escore 1; de 4 a 6,9mm – escore 2; $\geq 7\text{mm}$ – escore 3) obtido pelo programa *Image Tool*. A Tabela 14 evidencia esses valores. O coeficiente de *Pearson* obtido foi de 0,3725, indicando que existe moderada correlação entre o diâmetro das lesões e a quantidade de endotoxinas.

Tabela 12 – Quantidade de EU/mL encontrados nas 1ª, 2ª e 3ª coletas em cada grupo experimental

Extrato glicólico de gengibre 20%				Hipoclorito de sódio 1%				Clorexidina gel 2%			
Paciente	1ª C	2ª C	3ª C	Paciente	1ª C	2ª C	3ª C	Paciente	1ª C	2ª C	3ª C
5	19.4	9.19	0.22	15	394	5.61	36.5	7	14.5	14.8	11.1
6	91.1	26.9	5.4	16	127	23.4	14.7	8	4.43	11.9	1.92
11	35.9	2.68	2.94	17	3.62	1.79	2.08	9	83.1	22	5.2
12	0.517	10.1	5.89	18	2.49	8.02	1.28	24	0.847	0.971	12.6
13	14.7	0.45	48.8	19	102	6.32	0.834	25	3.29	17.4	13.8
14	26	4.64	24.5	20	6.66	19.1	6.26	26	29.1	90.3	5.52
30	353	14.1	413	28	154	16.8	4.76	27	85.4	19.2	15.1
33	2.43	0.987	33.8	29	24	1.53	33.3	43	146	20.1	0
34	50.6	1.3	13	48	6.51	14.5	5.01	44	14.3	9.61	2
35	527	12.4	18	49	710	12.3	0	46	198	34.4	0
42	235	13.7	0	50	5.47	29.1	2.34	47	14.7	19.4	11.8
45	2.71	104	1.39	51	249	19	0.979	52	66.7	54.4	5.8
Média	113.2	16.7	47.2	Média	148.7	13.1	9.0	Média	55.0	26.2	7.0
Mediana	30.95	9.64	9.44	Mediana	63	13.4	3.55	Mediana	21.9	19.3	5.66

Tabela 13 – Percentuais de redução de endotoxinas (média, desvio padrão, mediana em porcentagem referente à diminuição de EU/mL) obtidos nas 2^a e 3^a coletas

Coletas	Extrato Glicólico de Gengibre 20%				Hipoclorito de sódio 1%				Clorexidina gel 2%			
	N	Média	DP*	Mediana	N	Média	DP*	Mediana	N	Média	DP*	Mediana
1 ^a x 2 ^a	12	-396	1191	87	12	-22,1	176,5	85,3	12	-40,4	155,3	8,2
1 ^a x 3 ^a	12	-164	480	62	12	59,5	45	72,8	12	-81	428	82
2 ^a x 3 ^a	12	-1489	3147	-27	12	-162	629	69	12	-39	366	78

* Desvio padrão.

Tabela 14 – Grupos homogêneos e valores de “p” comparando os diferentes percentuais de redução de endotoxinas dentro do mesmo grupo experimental (letras diferentes = diferença estatisticamente significativa)

Coletas	Grupos		
	Extrato glicólico de gengibre 20%	Hipoclorito de sódio 1%	Clorexidina gel 2%
1 ^a x 2 ^a	A	A	A
1 ^a x 3 ^a	A	A	A
2 ^a x 3 ^a	A	A	A
Valor de “p”	0,0807	0,7343	0,0890

Tabela 15 – Grupos homogêneos e valores de “p” comparando os diferentes grupos experimentais em cada percentual de redução de endotoxinas (letras diferentes = diferença estatisticamente significativa)

Grupos	Coletas		
	1 ^a x 2 ^a	1 ^a x 3 ^a	2 ^a x 3 ^a
Extrato glicólico de gengibre 20%	A	A	A
Hipoclorito de sódio 1%	A	A	A
Clorexidina gel 2%	A	A	A
Valor de “p”	0,1347	0,7621	0,3220

Tabela 16 – Valores de endotoxinas obtidos na coleta inicial em EU/mL e tamanho da lesão, em milímetros, de cada dente

Pacientes	Endotoxinas (EU/mL)	Diâmetro da lesão (mm)	Escore
5	19.4	5	2
6	91.1	1	1
11	35.9	4	2
12	0.517	5	2
13	14.7	5	2
14	26	1	1
30	353	8	3
33	2.43	3	1
34	50.6	5	2
35	527	5	2
42	235	4	2
45	2.71	7	2
15	394	4	2
16	127	2	1
17	3.62	1	1
18	2.49	7	2
19	102	4	2
20	6.66	4	2
28	154	2	1
29	24	5	2
48	6.51	3	1
49	710	8	3
50	5.47	2	1
51	249	4	2
7	14.5	2	1
8	4.43	5	2
9	83.1	8	3
24	0.847	3	1
25	3.29	4	2
26	29.1	5	2
27	85.4	4	2
43	146	8	3
44	14.3	10	3
46	198	2	1
47	14.7	2	1
52	66.7	3	1

6 DISCUSSÃO

6.1 Microbiológico

Foi realizado neste estudo semeadura de todas as amostras em placas contendo meio de cultura para verificação da viabilidade dos microrganismos presentes nos canais radiculares. Cada meio de cultura foi utilizado para favorecer crescimento de determinados tipos de microrganismos. Os resultados mostram que houve crescimento de microrganismos em todos os meios utilizados em pelo menos algum momento do tratamento endodôntico, sugerindo que microrganismos anaeróbios, anaeróbios facultativos, leveduras, microrganismos sugestivos de estreptococos, enterococos e enterobactérias estão presentes em canais radiculares com infecção endodôntica, concordando com estudos anteriores (Gomes et al., 1994; Siren et al., 1997; Jacinto et al., 2003; Pinheiro et al., 2003; Gomes et al., 2005; Gomes et al., 2008; Martinho et al., 2010; Rôças, Siqueira Jr., 2010; Endo 2011). Analisando a contagem de UFC/mL em cada meio, maior prevalência de microrganismos anaeróbios pôde ser observada (Tabela 3). Se considerarmos como 100% a contagem de UFC/mL nos meios FAA (*Fastidious Anaerobe Agar* – meio utilizado para seleção de microrganismos anaeróbios) e BHI enriquecido com sangue de carneiro (*Brain Heart Infusion Agar* – Meio utilizado para seleção de microrganismos anaeróbios facultativos e/ou aeróbios), os microrganismos anaeróbios (meio FAA) representaram 85,02% da microbiota de canais com infecção primária e lesão periapical visível radiograficamente. Esta proporção condiz com os achados de Fabricius et

al. (1982), que verificaram predomínio de anaeróbios em infecções primárias. Fatores como a disponibilidade de nutrientes, a baixa tensão de oxigênio e as interações entre os microrganismos favorecem a seleção de microrganismos anaeróbios para que estes colonizem o interior do sistema de canais radiculares (Sundqvist, 1992; Seltzer, Farber, 1994). Yamasaki et al (1992) verificaram, com o passar do tempo, aumento gradual de microrganismos anaeróbios estritos em canais com exposição pulpar sendo que, em apenas um dia de exposição à cavidade oral, estes microrganismos representavam 10% da microbiota, chegando a 48% em 14 dias de infecção e, destes, microrganismos anaeróbios Gram-Negativos foram os mais predominantes. Os trabalhos anteriores concordam com os resultados de nosso estudo, pois verificamos que nos canais radiculares com necrose pulpar e lesão periapical existe predomínio de microrganismos anaeróbios, concordando também com outros estudos (Gomes et al., 1994; Seltzer, Farber, 1994; Siren et al., 1997; Jacinto et al., 2003; Pinheiro et al., 2003; Gomes et al., 2005; Gomes et al., 2008).

Nas primeiras coletas, onde DNA bacteriano foi detectado por PCR, houve crescimento microbiológico pelo método de cultura indicando grande probabilidade de estes microrganismos detectados estarem e viáveis naquele momento. Dos 36 dentes com necrose pulpar e lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico, seis (Pacientes 42, 48, 50, 43, 44 e 52) não apresentaram crescimento de microrganismos em nenhuma coleta, mas apresentaram-se positivos à presença de DNA bacteriano. Este resultado positivo ao método molecular e negativo ao método de cultura também foi encontrado por Sundqvist et al. (1998) e Pinheiro et al. (2003), onde não houve crescimento microbiano na coleta inicial de alguns espécimes. Existem microrganismos que são de difícil crescimento em placas de Agar e a técnica molecular, por ser mais sensível, pode detectar DNA bacteriano, mesmo em quantidades mínimas (Jacinto et al., 2003; Gomes et al., 1994;

Gomes et al., 2005). Além disso, as bactérias anaeróbias, por serem fastidiosas e oxigênio sensitivos, são mais sensíveis à manipulação podendo ter morrido durante o processamento da amostra, explicando, assim, o resultado obtido.

Dessas mesmas 36 amostras, em duas não foi detectado DNA bacteriano por PCR, mas pôde ser observado UFC/mL (Pacientes 13 e 24). Este resultado positivo ao método de cultura e negativo ao método molecular indica que microrganismos presentes nestes canais podem diferir daqueles investigados por PCR (*Parvimonas micra*, *Prevotella nigrescens*, *Tanarella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, *Enterococcus faecalis* e *Filifactor alocis*). Se tivéssemos utilizado maior número de *primers*, possivelmente teríamos resultados positivos para bactérias no PCR. Uma vez que não foram realizados isolamento nem identificação de microrganismos por método bioquímico, não foi possível identificar quais foram esses microrganismos encontrados nessas duas amostras.

Todos os microrganismos investigados neste estudo, exceto *F. alocis*, foram detectados por PCR na 1ª coleta. Microrganismos investigados neste estudo abrangem sete espécies Gram-Negativas (*P. nigrescens*, *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *P. endodontalis*, *P. intermedia*, *F. alocis*) e duas Gram-Positivas (*P. micra* e *E. faecalis*), sendo todos anaeróbios estritos, exceto *E. faecalis*, que é anaeróbio facultativo. Diversos estudos (Gomes et al., 1994; Siren et al., 1997; Jacinto et al., 2003; Pinheiro et al., 2003; Gomes et al., 2005; Gomes et al., 2008; Martinho et al., 2010; Rôças, Siqueira Jr., 2010; Endo, 2011) isolaram de canais radiculares estas espécies bacterianas. O presente estudo concorda com esses achados, sendo que *P. micra* e *P. nigrescens* foram as espécies mais frequentes na coleta inicial.

Dentre as bactérias investigadas, *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. intermedia* e *P. nigrescens*, que são bacilos anaeróbios

estritos, Gram-Negativos e produtores de pigmento negro, foram associados às infecções endodônticas, em especial as primárias (Gomes et al., 2005). Dentre os fatores de virulência desses microrganismos, valem ressaltar as cápsulas, componentes da membrana dessas bactérias e o LPS.

Embora no estudo de Siqueira e Rôças (2003) não ter sido encontrada correlação entre a presença de *P. micra* e sintomatologia, em nosso estudo, nos casos positivos à sintomatologia dolorosa (10/36), todos apresentavam DNA de *P. micra* nas amostras, que também foi verificado por outros autores (Pinheiro et al., 2003; Gomes et al., 2008). *Parvimonas micra* é uma bactéria anaeróbia estrita, Gram-Positiva. Por ser um coco Gram-Positivo e estar associado a casos sintomáticos, sua parede celular formada por peptideoglicana e ácido lipoteicóico, podem estar relacionados à resposta inflamatória (Gomes et al., 1994), explicando parte de sua virulência. O ácido lipoteicóico auxilia a ligação das bactérias às células eucarióticas, inclusive linfócitos, estimulando a reabsorção óssea (Paradella et al., 2007). Pinheiro et al. (2003) afirmam ainda que bactérias Gram-Positivas são mais resistentes ao PBM ou à MIC, sendo detectadas principalmente nos casos de insucesso de tratamento endodôntico. Sundqvist et al. (1979) associaram a presença de *P. micra* à infecções purulentas. Neste estudo, embora apenas 2/36 casos apresentassem fístula, em ambas foram detectados DNA desta espécie bacteriana. *Treponema denticola*, *P. endodontalis* e *P. gingivalis* também foram encontradas nestes casos de fístula (Tabela 9).

Treponema denticola, espiroqueta Gram-Negativa de alta motilidade e proteolítica foi também associada a abscessos por Seltzer e Farber (1994). Sua associação à sintomatologia dolorosa e tamanho de lesões periapicais visíveis radiograficamente foi reportada também por outros autores (Foschi et al., 2005; Gomes et al., 2008; Martinho et al., 2010). *P. endodontalis* foi associado neste estudo com presença de fístula, concordando com achados de Gomes et al. (2008). Embora este

microrganismo seja considerado de baixa virulência, quando associado a outras espécies bacterianas pode perpetuar infecções endodônticas. No estudo de Martinho et al. (2010), esta bactéria foi encontrada associada a *T. denticola* exercendo correlação positiva com tamanhos de lesões periapicais. *P. endodontalis* é um bastonete anaeróbico estrito, Gram-Negativo e produtor de pigmento negro. Seu fator de virulência envolve o encapsulamento da célula bacteriana, que dificulta a fagocitose, podendo induzir a formação de abscessos (Winkelhoff, et al., 1992). Além disso, outros fatores patogênicos tais como a produção de ácido succinato e hemina provoca aumento da virulência desta espécie e inibe migração de neutrófilos (Seltzer, Farber, 1994; Winkelhoff, et al., 1992). *Porphyromonas gingivalis* é um bastonete anaeróbico estrito, sem capacidade de motilidade, Gram-Negativo, produtor de pigmento negro, semelhante a *P. endodontalis*, explicado anteriormente, com fatores de virulência semelhantes. Esta bactéria é capaz de alterar a forma de neutrófilos, tornando-os menos polarizados. Desta maneira, alteram a motilidade dos neutrófilos por causarem modificações celulares esqueléticas, inibindo a fagocitose (Seltzer, Farber, 1994). No estudo de Gomes et al. (2005), *P. gingivalis* também estava associado à sintomatologia clínica.

Nas coletas iniciais, espécies de *T. forsythia* e *E. faecalis* também foram detectados em 15/36 e 2/36 casos respectivamente. *T. forsythia*, que também foi detectado em casos de necrose pulpar por estudos anteriormente citados, é um bastonete fusiforme, anaeróbico estrito e Gram-Negativo. É uma bactéria proteolítica relacionada à inflamação pela produção de citocinas (Sharma et al., 2000). *E. faecalis*, que foi detectado na 1ª coleta em apenas duas amostras, estando de acordo com estudos prévios que relacionam este microrganismo principalmente a infecções endodônticas persistentes (Pinheiro et al., 2003; Paradella et al., 2007; Gomes et al., 2008; Subramaniam, Mickel, 2009).

Após o PBM e após a MIC verificou-se que ocorreu uma redução da quantidade de microrganismos. Ao comparar os percentuais de redução nos diferentes grupos experimentais (Tabela 5) não houve diferença estatisticamente significativa, isto é, o preparo biomecânico, independente da substância química auxiliar utilizada, bem como a MIC, foram capazes de reduzir significativamente microrganismos sem diferenças entre os grupos. Diversos estudos (Kuruvilla, Kamath, 1998; Gomes et al., 2001; Ferraz et al., 2001; Ferreira et al., 2002; Menezes et al., 2004; Vianna et al., 2004; Ferraz et al., 2007; Valera et al., 2009) já comprovaram a eficiência da instrumentação com hipoclorito de sódio ou clorexidina gel 2% sobre microrganismos. Na Tabela 4 verifica-se que, sobre anaeróbios estritos, o hipoclorito de sódio 1% (NaOCl) foi a solução mais efetiva e a clorexidina gel 2% (CLX) a que apresentou menos efetividade. Sobre microrganismos aeróbios e/ou anaeróbios facultativos, a CLX foi 100% efetiva, seguido do extrato glicólico de gengibre 20% (GENG). Entretanto, ao avaliarmos a 1ª e a 2ª coleta (tirando os extremos), os grupos instrumentados com GENG e CLX reduziram 100% dos microrganismos. Considerando o tratamento como um todo, ou seja, a quantidade de microrganismos antes do tratamento (1ª coleta) e antes da obturação (3ª coleta), verificou-se numericamente os melhores resultados nos dentes irrigados com NaOCl (Tabela 4), embora sem diferenças estatísticas significantes. Entretanto, se tirarmos o valor discrepante do grupo GENG, este grupo foi mais efetivo (99,9% de redução de UFC/mL) (Tabela 6) e a CLX apresentando ação antimicrobiana intermediária. O hipoclorito de sódio, ao entrar em contato com matéria orgânica, ou seja, com a célula bacteriana, acarreta na formação do ácido hipocloroso, que libera cloro nascente, o qual se liga ao grupamento amina (NH) dos aminoácidos, formando cloraminas, interferindo no metabolismo celular e inibindo a função enzimática bacteriana à partir de uma oxidação irreversível dos grupos SH (sulfidril) de enzimas bacterianas essenciais (Vianna, 2002). No entanto, por esta

solução ser tóxica aos tecidos periapicais em altas concentrações (Spångdberg et al., 1973; Pashley, 1985; Becking, 1991; Hülsmann e Hahn, 2000; Ferraz et al., 2001; Tanomaru Filho et al., 2002), seu uso pode ser limitado.

O mecanismo de ação antibacteriano da clorexidina pode ser explicado pelo fato de a molécula catiônica da clorexidina ser rapidamente atraída pela carga negativa da superfície bacteriana, sendo adsorvida à membrana celular por interações eletrostáticas, provavelmente por ligações hidrofóbicas ou por pontes de hidrogênio, causando assim, ruptura da membrana celular. Em dosagens elevadas, ela causa precipitação e coagulação das proteínas citoplasmáticas e morte bacteriana e, em doses mais baixas, a integridade da membrana celular é alterada, resultando num extravasamento dos componentes bacterianos de baixo peso molecular (Hugo, Longworth, 1964; Hjeltjord et al., 1973; Rölla, Melsen, 1975). No entanto, estudos recentes em cultura celular ou por meio de inoculação em subcutâneo de ratos (Lessa et al., 2010; Monteiro et al., 2010) têm mostrado relação positiva entre toxicidade celular e concentração da substância.

O extrato glicólico de gengibre já foi utilizado na odontologia em estudos *in vitro*, porém não como substância química auxiliar ao preparo biomecânico em pacientes. Estudos realizados por nossa equipe (Oliveira et al., 2005; Valera et al., 2009; Chung et al., 2010, Cardoso et al., 2010, Maekawa, 2010, Valera et al., 2010) obtiveram resultados interessantes e promissores deste extrato sobre microrganismos em estudos *in vitro*. Nossa pesquisa pôde comprovar que, *in vivo*, o mesmo também poderá ser utilizado já que os resultados foram semelhantes às substâncias já consagradas na literatura (hipoclorito de sódio e clorexidina). Sua efetiva ação sobre microrganismos ainda não foi bem elucidada na literatura. Estudos indicam que os óleos voláteis, gingerol e shogaol, parecem ser os responsáveis pela ação benéfica deste rizoma (Lantz et al., 2007). Park et

al. (2008) sugerem que [10] e [12] Gingerol, componentes isolados do gengibre, foram efetivos sobre *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* e *Prevotella intermedia*. Embora o mecanismo de ação sobre microrganismos não tenha sido esclarecido na literatura, estudos mostram efetiva ação antimicrobiana deste extrato sobre microrganismos (Grégio et al., 2006; Indu et al., 2006; Park et al., 2008). No presente estudo, todas as substâncias químicas auxiliares ao PBM (2ª coleta) foram capazes de reduzir significativamente quantidade de UFC/mL. Deve-se ressaltar que três dentes de cada grupo (NaOCl; CLX; GENG) não apresentaram microrganismos na 2ª coleta, após o PBM. Um espécime do grupo GENG, dois no grupo NaOCl e três no grupo GENG não apresentaram cultura positiva em nenhum momento, nem na coleta inicial.

Estudos mostram, inclusive, que o gengibre é biocompatível, sendo utilizado até na alimentação (Afzal et al., 2001; Chrubasik et al., 2005; Grégio et al., 2006; Aimbire et al., 2007; Indu et al., 2006; Kim et al., 2007; Fouda, Berika, 2009).

Na 2ª coleta (após PBM), houve redução de UFC/mL independentemente da substância química utilizada. Em duas amostras após o PBM com extrato glicólico de gengibre, em três amostras após PBM com NaOCl 1% e em duas amostras após PBM com CLX gel 2% não houve detecção pelo método molecular mas houve crescimento pelo método de cultura indicando que os microrganismos ainda presentes nesses canais, mesmo após o PBM diferem daqueles investigados por PCR e que os microrganismos previamente detectados na 1ª coleta foram possivelmente eliminados. A Tabela 8 correlaciona os resultados obtidos por PCR e por cultura microbiológica.

Nas 2^{as} e 3^{as} coletas, a detecção de DNA bacteriano não indica viabilidade dos microrganismos, pois o método molecular de PCR se baseia na presença do gene 16S rRNA (Siqueira, Rôças, 2005), podendo o microrganismo estar viável ou morto. Espécies detectadas na

coleta inicial que não foram detectadas na 2ª coleta sugerem que o PBM foi eficiente sobre esses microrganismos, sendo capaz de eliminá-las, pelo menos da luz do canal. Após o PBM com extrato glicólico de gengibre 20%, 3 de 7 espécies encontradas na 1ª coleta não foram detectadas, sendo estas *P. endodontalis*, *T. denticola* e *E. faecalis*. No grupo irrigado com NaOCl 1%, 2/6 espécies foram eliminadas, sendo estas *E. faecalis* e *P. gingivalis*. Também no grupo cuja substância química auxiliar utilizada foi a clorexidina gel 2%, *T. denticola* e *P. intermedia* foram as 2/7 espécies não detectadas. Estes resultados estão de acordo com estudos de Rôças e Siqueira Jr (2010 e 2011), que verificaram eliminação desses microrganismos após PBM com NaOCl 2,5% e CLX 0.2%.

Considerando a eficiência do tratamento endodôntico, tanto o PBM quanto a MIC mostraram resultados satisfatórios referente à diminuição de UFC/mL. No entanto, ao avaliar a ação da MIC, esta não foi capaz de reduzir significativamente quantidade de microrganismos em comparação ao PBM. Além disso, em alguns espécimes, pôde ser observado aumento de UFC/mL após a remoção da MIC, sendo este aumento observado em cinco casos no grupo CLX, em quatro casos no grupo NaOCl e em quatro casos no grupo GENG. Ao analisar os resultados de percentual de redução média entre a 2ª e 3ª coleta (ação da MIC), o grupo irrigado com extrato glicólico de gengibre apresentou os piores resultados verificando-se aumento significativo da quantidade de microrganismos quando comparado à redução obtida logo após o preparo biomecânico (Tabela 6). Duas amostras de cada grupo (Extrato glicólico de gengibre 20%; NaOCl 1%, Clorexidina gel 2%) apresentaram crescimento microbiano pelo método de cultura onde, logo após o PBM, os microrganismos haviam sido eliminados (Pacientes 6, 14, 16, 28, 7, 25). Isto indica que alguns microrganismos permaneceram viáveis dentro dos túbulos dentinários durante todo o tratamento reforçando a idéia de

que microrganismos permaneceram viáveis no sistema de canais radiculares e são de difícil eliminação.

Metade dessas seis amostras mostrou-se positiva também para *P. micra* no método molecular, indicando que este microrganismo possivelmente manteve-se viável mesmo após a utilização da MIC.

Após a remoção da medicação intracanal de hidróxido de cálcio (3ª coleta), foram detectadas 8 espécies bacterianas, predominando *Parvimonas micra* (15/36) e *Prevotella nigrescens* (10/36). Espécie de *Filifactor alocis*, que não havia sido detectada em nenhuma das coletas até o momento, pôde ser detectada na 3ª coleta em 1 das 36 amostras. Em 18/36 amostras houve crescimento microbiano e em 25/36 amostras houve detecção de DNA bacteriano na 3ª coleta (Tabela 8).

DNA de *P. endodontalis* que foi eliminado após o PBM com extrato glicólico de gengibre pôde ser encontrado após o uso da MIC. O mesmo foi observado para *E. faecalis* e *P. gingivalis* no grupo irrigado com NaOCl 1% e *T. denticola* no grupo irrigado com clorexidina gel 2%. Não se pode afirmar que os microrganismos detectados por PCR são os mesmos encontrados em cultura ou, ainda, afirmar se os mesmos se encontravam viáveis. No entanto, a probabilidade dos microrganismos anaeróbios estritos existe, uma vez que houve crescimento microbiano em 4/6 das respectivas amostras. Crescimento em cultura de microrganismos sugestivos de enterococos não foi observado na amostra onde *E. faecalis* foi detectado, sendo possível que este não estivesse viável.

Filifactor alocis, foi detectado somente na 3ª coleta de uma única amostra. Este resultado discorda de outros estudos (Gomes et al., 2008; Rôças, Siqueira Jr., 2010) cuja prevalência deste microrganismo foi maior. No estudo de Siqueira Jr. e Roças (2003), *F. alocis* foi encontrado em maior frequência, sendo detectado em até 57,1% de canais de dentes sintomáticos e em 30% dos casos assintomáticos. Esta

espécie foi associada à inflamação do trato sinusal por Martinho et al. (2010). Entretanto, em nosso estudo nada se pôde afirmar já que a amostra foi mínima e nenhum paciente apresentava este tipo de sintomatologia. Caso esses microrganismos ainda estivessem viáveis após a utilização da MIC, não se deve descartar a possibilidade de recontaminação do elemento dentário via coronária, o que já foi elucidado por trabalhos anteriores (Paradella et al., 2007; Gomes et al., 2008).

De acordo com resultados obtidos, pode-se afirmar que a utilização da MIC não interferiu significativamente na quantidade de UFC/mL, indicando que talvez o hidróxido de cálcio sozinho possa não ser a melhor MIC a ser utilizada. Jenkins (1978) relata que a difusão dos íons com carga negativa, como a hidroxila (OH^-), pode ser inibida pela capacidade tampão, pela adsorção e pela carga da dentina. A capacidade tampão ocorre quando doadores de prótons de camada hidratada da hidroxiapatita (ex. H_2PO_4^- , H_2CO_3 , HCO_3^-) fornecem prótons adicionais com o objetivo de manter o pH da dentina inalterado. Uma vez que esses íons hidroxila, além de serem responsáveis pelo aumento do pH são também oxidantes sobre microrganismos (Siqueira, Lopes, 1999), ao serem inibidos, a eficácia antimicrobiana do $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pode ter sido parcialmente diminuída, explicando a persistência de microrganismos mesmo após o uso da MIC em nosso estudo. Tronstad et al. (1981) observou também que o pH na dentina próximo a superfície radicular externa após preenchimento do canal com a MIC chega a 7,4 – 9,6. Quando este curativo é removido, o pH varia entre 6 a 7,4. Estes valores de pH na superfície externa e a diminuição do pH após a remoção da MIC de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ reforça o efeito tampão da dentina. Assim, a associação do $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a outro medicamento, e não ao propilenoglicol como foi utilizado em nosso estudo, pode ser uma escolha mais adequada como MIC nos casos de necrose pulpar associado a lesão periapical visível radiograficamente.

6.2 Endotoxinas

Quantificação de endotoxinas de cada amostra foi realizada pelo teste o teste cinético quantitativo do lisado de amebócitos de *Limulus* (análise quantitativa) (Lonza, Walkersville, MD, EUA) e o conjunto *Limulus Amebocyte Lisate* Kinetic – QCL[®] Bulk Kit 50-650H (Lonza, Walkersville, MD, EUA). Todas as amostras apresentavam endotoxinas na coleta inicial. Os resultados obtidos quanto à redução de endotoxinas durante a terapia endodôntica foram bastante satisfatórios, pois houve diminuição da endotoxina após o PBM (2^a coleta) e após a MIC (3^a coleta) em todos os grupos quando comparado a coleta inicial (1^a coleta). Dentre as substâncias químicas auxiliares utilizadas neste estudo, a instrumentação com o GENG apresentou os melhores resultados de redução de endotoxinas, seguido do NaOCl 1% e da CLX. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores (Tanomaru et al., 2003; Oliveira et al., 2005; Oliveira et al., 2007; Martinho, Gomes, 2008; Gomes et al. (2009) Valera et al., 2009; Chung et al., 2010, Cardoso et al., 2010, Maekawa, 2010, Valera et al., 2010) que comprovaram redução dos níveis de endotoxina após preparo biomecânico com hipoclorito de sódio 1%, clorexidina gel 2% ou extrato glicólico de gengibre 20%. No entanto, endotoxinas ainda permaneceram nos canais radiculares, não sendo neutralizadas completamente. O mesmo também foi verificado neste estudo, onde endotoxinas ainda foram detectadas.

A MIC de hidróxido de cálcio, bastante conhecida na literatura por ser capaz de neutralizar endotoxinas, leva à dissociação dos íons hidroxila do hidróxido de cálcio, aumentando o pH do meio suficientemente para eliminar bactérias. A estabilidade dos íons hidroxila pode se manter por longo período de tempo. A neutralização do lipídio A,

parte tóxica da endotoxina, foi obtida por substâncias alcalis, que removem ésteres de ácidos graxos, alterando sua conformação química da macromolécula de LPS (Safavi e Nichols, 1993). A utilização desta MIC foi capaz de diminuir quantidade de endotoxinas de canais radiculares com necrose pulpar e lesão periapical, apresentando melhores resultados nos grupos irrigados com hipoclorito de sódio 1% e clorexidina gel 2%, mas sua utilização neste estudo não interferiu estatisticamente nos resultados. No grupo irrigado com extrato glicólico de gengibre 20%, a MIC (2ª x 3ª coleta) chegou até a aumentar níveis de endotoxinas encontrados embora sem diferenças estatisticamente significantes (Tabelas 11 e 12). No entanto, deve-se considerar que os níveis de endotoxina no grupo GENG antes do tratamento foram em média maiores do que os demais grupos.

Ao analisarmos a eficiência da medicação de hidróxido de cálcio sobre UFC/mL, percebeu-se que esta não apresentou resultados significantes. Como foi explicado no item anterior, a capacidade tampão da dentina pode ter diminuído a ação desta medicação sobre os microrganismos que permaneceram viáveis, explicando a presença de endotoxinas nos canais radiculares na 3ª coleta. Além disso, é possível que o tempo de permanência da medicação no canal radicular pode ter sido insuficiente para a completa neutralização da quantidade de endotoxinas presentes no canal radicular. Uma vez que o tempo pode ter sido insuficiente, é possível que a detecção de endotoxinas após a remoção da MIC (3ª coleta) ocorreu por estas permanecerem aderidas às paredes dentinárias, já que o LPS tem essa capacidade de adesão irreversível às paredes dentinárias.

Correlação moderada entre níveis de endotoxinas e tamanho das lesões periapicais visíveis radiograficamente foi observada quando o teste de correlação de *Pearson* ($p=0,3725$) foi aplicado. Isto indica que quantidade de EU/mL está diretamente ligada ao tamanho das lesões periapicais visíveis radiograficamente e, portanto, às reabsorções

ósseas. As endotoxinas não causam diretamente lesões celulares ou teciduais, no entanto, elas estimulam células competentes como macrófagos, neutrófilos e fibroblastos desencadeando a liberação de um grande número de mediadores químicos inflamatórios bioativos ou citocinas, causando uma série de efeitos biológicos que levam a uma reação inflamatória, imunológica e reabsorção óssea periapical (Mattison et al., 1987; Yamasaki et al., 1992; Wang, Stashenko, 1993, Leonardo et al., 2004). Esta reação ocorre devido a uma ligação entre a endotoxina e o receptor CD-14 na superfície de monócitos e macrófagos, desencadeando liberação de citocinas, tais como interleucinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8) (Matsushita et al., 1999), Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) e metaloproteinases, que estão ligados à destruição da matriz extracelular e reabsorção óssea periapical, estimulando também terminações nervosas dos tecidos periapicais, conduzindo à dor (Seltzer, Farber, 1994, Leonardo et al., 2004). Estudos prévios comprovaram o papel das interleucinas e do Fator de Necrose Tumoral nas destruições ósseas (Wang, Stashenko, 1993; Martinho et al. 2010; Carvalho, 2010). Endotoxinas também induz febre, ativa o sistema complemento da inflamação aumentando a permeabilidade vascular, a quimiotaxia para macrófagos e neutrófilos, liberando lisosimas e ativando o ciclo metabólico do ácido araquidônico, além de ser mutagênico para células de linfócitos B (Morrison, Kline, 1977). Assim, quanto maior níveis de endotoxinas presentes nas infecções endodônticas, maior a inflamação desencadeada devido à ativação de maior quantidade de células e, conseqüentemente, desencadeando maior quantidade de mediadores químicos estimuladores de reabsorção óssea. Isso explica a correlação moderada positiva entre rarefações ósseas periapicais e presença de endotoxinas encontrada neste estudo. Wang e Stashenko (1993) ainda verificaram que a similaridade das citocinas presentes em lesões agudas e crônicas sugerem diferenças nos mediadores químicos da inflamação predominantemente quantitativos a qualitativas na progressão da lesão.

Diversos estudos (Dahlen et al.,1981; Horiba et al., 1991; Nelson–Filho et al., 2002; Pitts et al., 1982; Wang, Stashenko, 1993) comprovaram a correlação entre quantidade de endotoxinas e tamanho de lesões periapicais. Em todos os experimentos que inocularam endotoxinas em canais radiculares de animais, verificou-se presença de rarefações ósseas periapicais. Concordando com o presente estudo, esses autores verificaram também que quanto maior os níveis de endotoxina, maior o tamanho da lesão periapical.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, neste estudo pode-se concluir que:

- a) A técnica de PCR espécie-específico detectou DNA bacteriano em todas as coletas, sendo detectados *Parvimonas micra*, *Prevotella nigrescens*, *Tanerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, *Enterococcus faecalis* e *Filifactor alocis*;
- b) Elevados níveis de endotoxinas foram encontrados nos canais radiculares antes do tratamento e estes níveis foram menores após os tratamentos, mas não foram neutralizadas completamente;
- c) Extrato glicólico de gengibre 20%, hipoclorito de sódio 1% e clorexidina gel 2% foram capazes de reduzir significativamente microrganismos dos canais radiculares.
- d) A utilização da medicação de hidróxido de cálcio não interferiu significativamente nos resultados, tanto microbiológico como sobre endotoxinas;
- e) Houve correlação positiva entre quantidade de endotoxinas e o tamanho das lesões periapicais.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

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

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, Universidade Estadual Paulista – UNESP ; 2009.

Aimbire F, Penna SC, Rodrigues M, Rodrigues KC, Lopes-Martins RAB, Sertie JAA. Effect of hydroalcoholic extract of *Zingiber officinalis* rhizomes on LPS-induced rat airway hyperreactivity and lung inflammation. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2007;77:129–38.

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

Bang FB. A bacterial disease of *Limulus polyphemus*. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 1956 May;98(5):325-51.

* 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

Basrani B, Santos M, 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.

Baumgartner JC, Mader CL. A scanning electron microscopic evaluation of four root canal irrigation regimens. *J Endod.* 1987;13(4):147-57.

Becking AG. Complications in the use of sodium hypochlorite during endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991; 71(3):192-6.

Berg JD, Roberts PV, Matin A. Effect of chlorine dioxide on selected membrane functions of *Escherichia coli*. *J Appl Bacteriol.* 1986;60(3):213-20.

Bergenholtz G. Microorganisms from necrotic pulp of traumatized teeth. *Odontologisk Revy.* 1974;25(4):347-58.

Bloomfield SF, Miles GA. The antibacterial properties of sodium dichloroisocyanurate and sodium hypochlorite formulations. *Journal of Applied Bacteriology* 1979;46(1):65-73.

Bonesvoll P, Gjermo P. A comparison between chlorhexidine and some quaternary ammonium compounds with regard to retention, salivary concentration and plaque-inhibiting effect in the human mouth after mouth rinses. *Arch Oral Biol.* 1978;23(4):289-94.

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.

Carvalho AS, Camargo CH, Valera MC, Camargo SE, Mancini MN. Smear layer removal by auxiliary chemical substances in biomechanical preparation: a scanning electron microscope study. *J Endod.* 2008 Nov;34(11):1396-400.

Carvalho AS. Estudo *in vivo* da ação do tratamento endodôntico sobre endotoxinas bacterianas em canais radiculares com polpa necrosada e avaliação dos efeitos citotóxicos [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2010.

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

Chu FSC, Tsang P, Chow TW, Samaranayake LP. Identifications of cultivable microorganisms from primary endodontic infections with exposed and unexposed pulp space. *J Endod*. 2005;31(6):424-9.

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.

Clarkson RM, Moule AJ, Podlich H, Kellaway R, Macfarlane R, Lewis D, Rowell J. Dissolution of porcine incisor pulps in sodium hypochlorite solutions of varying compositions and concentrations. *Aust Dent J*. 2006 Sep;51(3):245-51.

Cobankara FK, Ozkan HB, Terlemez A. Comparison of organic tissue dissolution capacities of sodium hypochlorite and chlorine dioxide. *J Endod*. 2010 Feb;36(2):272-4.

Conrads G, Soffner J, Pelz K, Mutters R. Taxonomic update and clinical significance of species within the genus *Peptostreptococcus*. *Clin Infect Dis*. 1997 Sep;25 Suppl 2:S94-7.

Dahlén G, Magnusson BC, Möller A. Histological and histochemical study of the influence of lipopolysaccharide extracted from *Fusobacterium nucleatum* on the periapical tissues in the monkey *Macaca fascicularis*. *Arch Oral Biol*. 1981;26(7):591-8.

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

D'Arcangelo C, Di Nardo Di Maio F, Stracci N, Spoto G, Malagnino VA, Caputi S. Pulp-dissolving ability of several endodontic irrigants: a spectrophotometric evaluation. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2007;20(2):381-6.

Davies GE, Francis J, Martin AR, Rose FL, Swain G. 1:6-Di-4'-chlorophenyldiguanidohexane (hibitane); laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. *Br J Pharmacol Chemother*. 1954;9(2):192-6.

Emilson CG. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. *Scand J Dent Res*. 1977 May;85(4):255-65.

Endo MS. Identificação de microrganismos e quantificação de endotoxinas em canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical [dissertação]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas – UNICAMP, 2010.

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

Estrela C, Ribeiro RG, Estrela CR, Pécora JD, Sousa-Neto MD. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorexidine tested by different methods. *Braz Dent J*. 2003;14(1):58-62.

Fabricius L, Dahlén G, Öhman AE, Möller AJR. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. Scand J Dent Res. 1982;90(2):134-44.

Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* assessment of the antimicrobial action and mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. J endod. 2001; 27(7): 452-5.

Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Comparative study of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine gel, chlorhexidine solution and sodium hypochlorite as endodontic irrigants. Braz Dent J. 2007;18(4):294-298.

Ferreira CM, Da Silva Rosa OP, Torres SA, Ferreira FB, Bernardinelli N. Activity of endodontic antibacterial agents against selected anaerobic bacteria. Braz Dent J. 2002;13(2):118-22

Ferreira FBA. Avaliação antimicrobiana do tratamento endodôntico em dentes de cães submetidos à contaminação oral e à aplicação de endotoxina bacteriana [Tese] Bauru: Universidade de São Paulo; 2003.

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

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

Gomes B.P.F.A., Ferraz C.C.R., Vianna M.E., Berber, V.B., Teixeira F.B., Souza Filho F.J. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. Int. Endod. J. 2001;34(6):424-8.

Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. Oral Microbiol Immunol 2005;20(4):211–5.

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

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

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

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.

Hjeljord LG, Rolla G, Bonesvoll P. Chlorhexidine-protein interactions. J Periodontal Res Suppl. 1973;12:11–6.

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

Horiba N, Maekawa Y, Yamauchi Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Complement activation by lipopolysaccharides purified from Gram-negative bacteria isolated from infected root canal. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1992 Nov;74(5):492–5.

Hugo WB, Longworth AR. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. J Pharm Pharmacol. 1964;16:655-62.

Hülsmann M, Hahn W. Complications during root canal irrigation: literature review and case reports. Int Endod J. 2000; 33(3):186-93.

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

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

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

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.

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.

Kim JS, Lee SI, Park HW, Yang JH, Shin TY, Kim YC et al. Cytotoxic components from the dried rhizomes of *Zingiber officinale* Roscoe. Arch Pharm Res. 2008;31(4):15-8.

Ko HJ, Lim SS. Production of macrophage inflammatory protein (MIP) - 1 and MIP-1 β by human polymorphonuclear neutrophils stimulated with *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide. J Endod. 2002;28(11):754-7.

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

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

Leonardo MR, Silva LAB, Leonardo RT. Tratamento de canal radicular em sessão única: crença vs. Ciência. In: Feller C, Gorab R. Atualização na Clínica Odontológica. São Paulo: Artes Médicas, 2000.p.29-57.

Leonardo MR. Endodontia: tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos. São Paulo: Artes Médicas, 2005.

Leonardo, MR; Silva, RAB; Assed, S; Nelson Filho, P. Importance of bacterial endotoxin (LPS) in Endodontics. J Appl Oral Sci. 2004;12(2):93-8

Lessa FC, Aranha AM, Nogueira I, Giro EM, Hebling J, Costa CA. Toxicity of chlorhexidine on odontoblast-like cells. J Appl Oral Sci. 2010 Feb;18(1):50-8.

Levin J, Bang FB. Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb Diath Haemorrh. 1968;Mar;19(1):186-97.

Löe H, Schiott CR. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. J Periodontal Res. 1970;5(2):79-83.

MacDonald JB, Hare GC, Wood AWS. The bacteriological status of the pulp chambers in intact teeth found to be non-vital following trauma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1957;10(3):318-22.

Maekawa LE, Oliveira LD, Carvalho CAT, Camargo CHR, Valera MC, Kogalito CY et al. Avaliação dos extratos de própolis e de gengibre sobre *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* em canais radiculares [resumo PNd 047]. 26 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica. Águas de Lindóia. *Braz Oral Res.* 2009;23(1):256.

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 "Julio de Mesquita Filho"; 2010.

Marchesan MA, Aruda MP, Silva Sousa YTC, Saquy PC, Pecora JD, Sousa Neto MD. Morphometrical analysis of cleaning capacity using nickel-titanium rotary instrumentation associated with irrigating solutions in mesio-distal flattened root canals. *J Appl Oral Sci.* 2003;11(1):55-9.

Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, Cirelli JA, Gomes BP. Antigenic activity of bacterial endodontic contents from primary root canal infection with periapical lesions against macrophage in the release of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha. *J Endod.* 2010 Sep;36(9):1467-74.

Martinho FC, Gomes BPFA. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2,5% sodium hypochlorite. *J Endod.* 2008 Mar;34(3):268-72.

Matsuo T, Shirakami T, Ozaki K, Nakanishi T, Yumoto H, Ebisu S. An immunohistological study of the localization of bacteria invading root pulpar walls of teeth with periapical lesions. *J Endod.* 2003;29(3):194-200.

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

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

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

Menezes MM, Valera MC, Jorge AOC, Koga-ito CY, Camargo CHR, Mancini MN. *In vitro* evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Int Endod J.* 2004;37(5):311-9.

Miller WD. An introduction to the study of the bacteria pathology of the dental pulp. *Dent Cosmos.* 1894;36:505-28.

Möller AJL, Fabricius L, Dahlén G, Öhman AE, Heyden G. Influence on Periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in mokeys. *Scand J Dent Research.* 1981;89(6):475-484.

Möller AJR. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Odontol Tidskr.* 1966; 74:1–380.

Monteiro ASF, Macedo LGS, Macedo NL, Feitosa FA, Toyoshima T. Biocompatibility of a chlorhexidine local delivery system in a subcutaneous mouse model. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011;16(2):278-84.

Morrison DC, Kline LF. Activation of the classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharides (LPS). *J Immunol.* 1977 Jan;118(1):362-8.

Naenni N, Thomaz K, Zehnder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potencial endodontic irrigants. J Endod. 2004;30(11):785-7.

Nelson-Filho P, Leonardo MR, Silva LA, Assed S. Radiografic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. J Endod. 2002;28(10):694-6.

Oguntebi BR. Dentine tubule infection and endodontic therapy implications. Int Endod J. 1994;27(4):218-22.

Okino LA, Siqueira EL, Santos M, Bombana AC, Figueiredo JAP. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. Int Endod J 2004;37(1):38-41.

Oliveira LD, Carvalho CA, Valera MC, Koga-ito CY, Jorge, AO. Diffusion ability of endotoxin through dentinal tubules. Braz Oral Res, 2005c;19(1):5-10.

Oliveira LD, Carvalho CAT, Valera MC, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Efetividade *in vitro* de diferentes agentes irrigantes na neutralização de endotoxinas em canais radiculares. Pesq Odontol Bras.2005a;19(supl):166.

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

Oliveira LD, Leão MV, Carvalho CAT, Camargo CHR, Valera MC; Jorge AOC et al. *In vitro* effects of calcium hydroxide and polymix B on endotoxins in root canals. J Dent. 2005b;33(2):107-14.

Paradella TC, Koga-Ito CY, Jorge AOC. *Enterococcus faecalis*: clinical and microbiological considerations. Rev Odontol UNESP. 2007;36(2):163-68.

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

Pashley EL. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. *J Endod*. 1985;11(12):525-8.

Pelt P, Zimmermann B, Ulbrich N, Bernimoulin JP. Effects of lipopolysaccharide extracted from *Prevotella intermedia* on bone formation and on the release of osteolytic mediators by fetal mouse osteoblasts *in vitro*. *Arch Oral Biol*. 2002; 47(12):859-66.

Pereira ACP, Grégio AMT, Barbosa APM, Marques FR, Lima AAS, Ribas MO. Estudo do efeito do gengibre no processo de cicatrização de úlceras na mucosa bucal de ratos [resumo 1b166]. *Pesqui odontol Bras*. 2003;17 (Supl.2):76.

Peters LB, Wesselink PR, Buijjs JF, Van Winkelhoff. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. *J Endod*. 2001;27(2):76-81.

Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J*. 2003;36(1):1–11.

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

Rietschel ET, Brader H, Lindner B, Zharinger U. Molecular biochemistry of lipopolysaccharides. In: _____. *Bacterial endotoxic lipopolysaccharides*. Morrison DC, Ryan JL, editors. Boca Raton: CRC Press;1992.p. 3-42.

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

Rôças IN, Siqueira Jr JF. Identification of bacteria enduring endodontic treatment procedures by a combined reverse transcriptase - polymerase chain reaction and reverse-capture checkerboard approach. J Endod. 2010; 36(1):45-51

Rölla G, Melsen B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. J Dent Res. 1975;54(Spec No B):B57-62.

Safavi KE, Nichols FC. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. J Endod. 1994;20(3):127-9.

Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. J Endod. 1975 Jan;1(1):19-21.

Sedgley CM, Molander A, Flannagan SE, Nagel AC, Appelbe OK, Clewell DB et al. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp. Oral Microbiol Immunol. 2005 Feb;20(1):10-9.

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

Sharma A. Virulence mechanisms of *Tannerella forsythia*. Periodontol 2000. 2010 Oct;54(1):106-16.

Silva L, Nelson Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin *in vivo*. J Endod. 2002;28(2):94-8.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1—current molecular technologies for microbiological diagnosis. J Endod. 2005;31(6):411–23.

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

Siqueira Jr JF, Rôças IN, Andrade AF, de Uzeda M. *Peptostreptococcus micros* in primary endodontic infections as detected by 16S rDNA-based polymerase chain reaction. *J Endod*. 2003 Feb;29(2):111-3.

Siqueira Junior JF, Rôças IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2,5% and 5,25% sodium hypochlorite. *J Endod* 2000;26(6):331-4.

Siqueira Junior JF, Rôças IN. A 16S rDNA-based nested PCR protocol to detect *Campylobacter gracilis* in oral infections. *Pesqui Odontol Bras*. 2003 Apr-Jun;17(2):142-6.

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

Siqueira Junior JF, Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod*. 1996 Dec;22(12):674-6.

Siqueira Junior JF., Uzeda M. Intracanal medication evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *J Endod*. 1997;23(3):167-9.

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

Slots J, Ashimoto A, Flynn MJ, Li G, Chen C. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis*. 1995 Jun;20 Suppl 2:S304-7.

Soares JÁ, Leonardo MR, Silva LAB, Tanomaru Filho M, Ito IY. Ação anti-séptica e reparadora da associação hidróxido de cálcio e clorexidina em dentes de cães com lesões periapicais. *Pesq Odontol Bras*. 2003;17(Suppl.1):104.

Spångberg L, Engström B, Langeland K. Biologic effects of dental materials. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics *in vitro*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1973;36(6):856-71.

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

Sundqvist G, Eckerbom ML, Larsson AP, Sjögren UT. Capacity of anaerobic bacteria from necrotic dental pulps to induce purulent infections. *Infect Immun*. 1979;25(2):685-93.

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Endod*. 1998;85(1):86-93.

Sundqvist G. Bacteriologic studies of necrotic dental pulps. *Odontological [Dissertation n° 7]*. Sweden: University of Umea; 1976.

Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Silva LAB, Aníbal FF, Faccioli LH. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions. *Int Endod J*. 2002 Sep;35(9):735-9.

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

Tanomaru JM, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LA. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endodon J*. 2003;36(11):733-9.

Tanomaru-Filho M, Poliseli-Neto A, Leonardo MR, Silva LA, Tanomaru JM, Ito IY. Methods of experimental induction of periapical inflammation. Microbiological and radiographic evaluation. *Int Endod J*. 2005 Jul;38(7):477-82.

Tokuda M, Sakuta T, Fushuku A, Torii M, Nagaoka, S. Regulation of interleukin-6 expression in human dental pulp cell cultures stimulated with *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide. *J Endod*. 2001;27(4): 273-7.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Controle do crescimento microbiano. In: _____. *Microbiologia*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed; 2000. p.181-206.

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.

Vafaie NM, Dobeck JM, Warbington ML, Dibart S, Harris M, Skobe Z. DNA analyses of bacteria in symptomatic endodontically treated teeth [abstract OR 32] *J Endod*. 1999;25(4):290.

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

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):55-9.

Valera MC, Rego JM, Jorge AOC. Effect of sodium hypochlorite and five intracanal medications on *Candida albicans* in root canals. J Endod. 2001;27(6):401-8.

Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004;97(1):79-84.

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

Vianna ME. Atividade antimicrobiana de alguns medicamentos utilizados como irrigantes e medicações intracanaís. Piracicaba:[s.n.]; 2002.

Wang CY, Stashenko P. The role of interleukin-1alpha in the pathogenesis of periapical bone destruction in a rat model system. Oral Microbiol Immunol 1993;8(1):50-6.

Waterman PA Jr., Torabinejad M, McMillan PJ, Kettering JD. Development of periradicular lesions in immunosuppressed rats. J Endod. 1998;85(6):720-25.

Winkelhoff AJ, Steenbergen TJ, de Graaff J. Porphyromonas (Bacteroides) endodontalis: its role in endodontal infections. J Endod. 1992 Sep;18(9):431-4.

Xavier ACC, Benatti J, Cardoso FGR, Maekawa LE, Valera MC, Oliveira LD et al. Ação do extrato de gengibre como irrigante associado ao extrato de própolis como medicação intracanal sobre microrganismos e sua endotoxina [resumo PNe 042]. 27 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica 2010. Águas de Lindóia. Braz Oral Res; 2010;24(1):326.

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

Yoshida M, Fukushima H, Yamamoto K, Ogawa K, Sagawa H. Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canal of teeth with periapical pathosis. J Endod. 1987; 13(1): 24-28.

APÊNDICE A – Ficha de anamnese**Nome:** _____**Endereço:** _____**Tel:** _____**Dente:** _____**Data:**/...../.....**HISTÓRIA MÉDICA**

Estado de saúde geral:				
Medicamento em uso:				
☐ Diabete	☐ Hepatite	☐ Coração	☐ Pressão:	☐ Sinusite
☐ Rim	☐ Alergia	☐ Úlceras	☐ Alcoolismo	☐ Fígado
☐ Doença mental		☐ Doenças sangue		☐ Outras
Problemas com anestesia:				
Outros:				

HISTÓRIA CLÍNICA

Queixa principal:				
TIPO DE DOR:	☐ Provocada	☐ Espontânea	☐ Intermitente	☐ Contínua
	☐ Localizada	☐ Difusa		
Tomou analgésico ou outro medicamento?				
A dor cessa com analgésico?				
Dói a quanto tempo?				

EXAME CLÍNICO LOCAL

☐ Dente cariado	☐ Dente restaurado	☐ Edema	☐ Alteração de cor	☐ Mobilidade
☐ Fístula	☐ Extrusão	☐ Oclusão	☐ Probl. Periodontal	

TESTES

☐ Frio	☐ Calor	☐ Choque térmico	☐ Percussão
Outros:			

EXAME RADIOGRÁFICO

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

TRATAMENTO RADICAL

Medida aparente do dente no RX inicial:				
Ponto de Referencia	Comprimento real do instrumento ao ser retirado do canal:	Diferença entre ponta do instrumento ao ápice radicular:	Comprimento Real do canal (a+b) (I.A.F.):	Comprimento de Trabalho

Diâmetro do I.A.F. (n° do instrumento):
Diâmetro do I.A.I. (n° do instrumento):
Diâmetro cirúrgico do canal:
Escalonamento até:
Irrigação:
Curativo de demora:
Obturação (técnica e material):
Selamento:

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

CONTROLES RADIOGRÁFICOS

Data	Observações
1º	
2º	

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Caro(a) Senhor(a),

Eu, Adriana Chung, portadora do CPF 345.138.08-86, aluna de mestrado da Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, estabelecido à Avenida Eng. Francisco José Longo, 777, na cidade de São José dos Campos-SP, telefone para contato (12) 3947 9048, sob a orientação da Professora Adjunto Marcia Carneiro Valera portadora do CPF 039.137.548-22, Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, estabelecido à Avenida Eng. Francisco José Longo, 777, na cidade de São José dos Campos-SP, telefone para contato (12) 3947 9048, sou responsável pela pesquisa cujo título é **“Identificação de microrganismos, quantificação de endotoxina e avaliação *in vivo* do extrato glicólico de gengibre em dentes com necrose pulpar e lesão periapical”**.

Os objetivos deste estudo serão a) avaliar a eficácia de substâncias químicas auxiliares (extrato glicólico de gengibre, solução de hipoclorito de sódio 1% e clorexidina gel) e medicação intracanal (hidróxido de cálcio) utilizadas durante o tratamento endodôntico (de canal) sobre microrganismos, por meio de identificação de microrganismos presentes nos canais radiculares de dentes com necrose pulpar e periodontite apical crônica, ou seja, dentes com lesão visível radiograficamente, pelo método molecular (Reação em Cadeia de Polimerase – PCR); b) quantificar endotoxinas presentes nestes canais radiculares; c) avaliar a atividade antimicrobiana e sobreendotoxinas da solução de hipoclorito de sódio 1%, da clorexidina gel 2% e do extrato glicólico de gengibre; d) verificar a correlação entre os microrganismos presentes, bem como a quantidade de endotoxinas com os sinais e sintomas apresentados pelos pacientes.

Se houver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética (CEP) da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, situada na Av. Engº Francisco José Longo, 777 – CEP 12245000, em São José dos Campos-SP, fone 012-3947-9076, e-mail janete@fosjc.unesp.br e comunique-se com a Coordenadora Profa.Dra. JANETE DIAS ALMEIDA. Informo que será garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e assim deixar de participar do estudo. Também não haverá custo nem pagamento pela Colaboração.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Acredito ter sido esclarecido(a) a respeito das informações que leram para mim, descrevendo o estudo a ser realizado e concordo em receber atendimento em consultório odontológico. Declaro conhecer os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes, referente à Pesquisa intitulada **“Identificação de microrganismos, quantificação de endotoxina e avaliação *in vivo* do extrato glicólico de gengibre em dentes com necrose pulpar e lesão periapical”** e que minha participação não implicará em nenhuma despesa ou pagamento.

NOME/RESPONSÁVEL _____

RG _____

CPF _____

Endereço: _____

Assinatura Responsável

Assinatura Pesquisador

APÊNDICE C – Extração do DNA bacteriano

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

1. Identificar eppendorfs de 1,5 mL de acordo com os grupos e coletas (Figura 18).

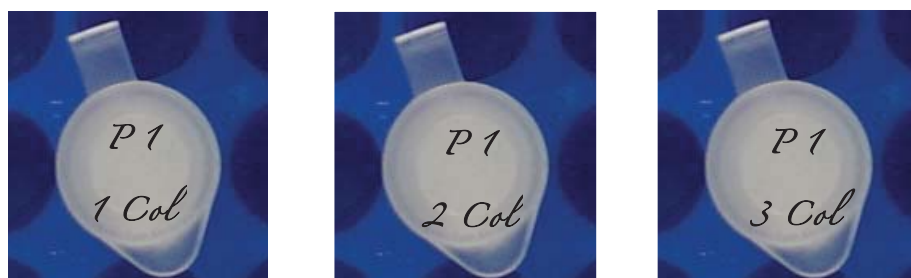


Figura 18 – Identificação dos eppendorfs.

2. Agitar a amostra armazenada em VMGA III e alíquotar 300 μ L para o eppendorf previamente identificado.
3. Centrifugar a 8000 rpm por 5 minutos (Figura 19).



Figura 19 – Posicionamento dos eppendorfs de 1,5 mL na centrífuga.

4. Remover sobrenadante, com bastante cuidado para não aspirar o *pelet* (Figura 20).

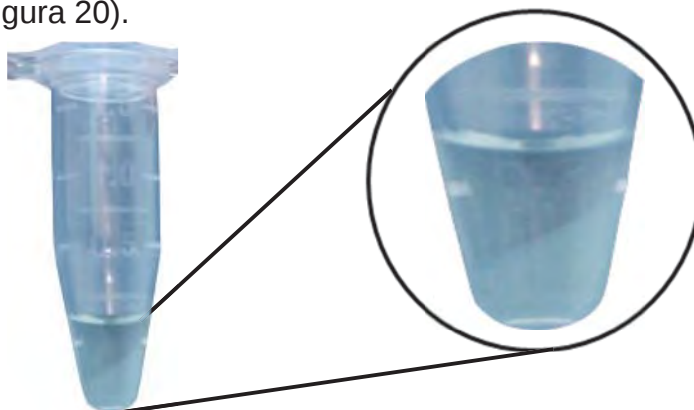


Figura 20 – Formação do *Pelet*.

5. Adicionar 180 μ L de Buffer ATL (1) e 20 μ L de proteinase K (2).
6. Incubar a 56°C por 30 minutos (banho seco) (Figura 21).



Figura 21 – Incubação em banho seco.

7. Adicionar 200 μ L de AL (3) (Agitar levemente antes)
8. Agitar levemente e incubar a 70° por 10 minutos em banho maria (Figura 22).

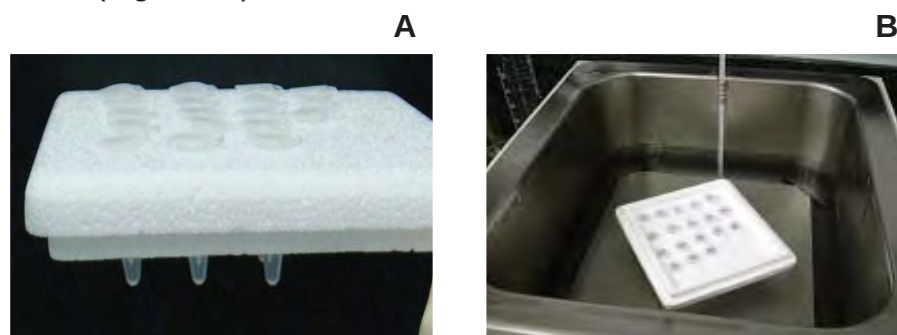


Figura 22 – Incubação dos eppendorfs: a) posicionamento dos eppendorfs em suporte; b) incubação em banho maria.

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



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

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

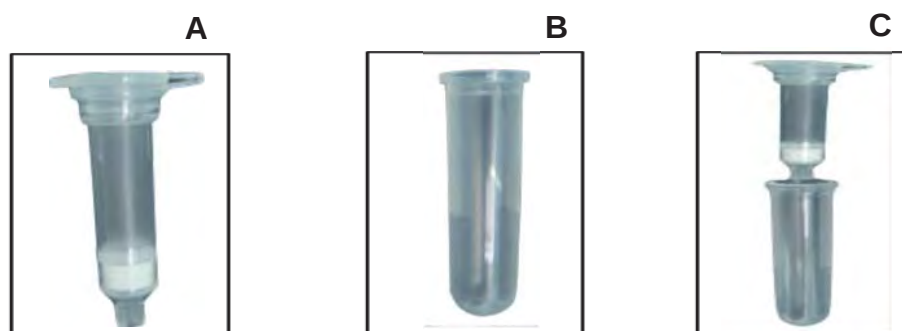


Figura 17 – Esquema de filtros: a) Filtro; b) Tubo vazio; c) Filtro com tubo vazio.

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

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

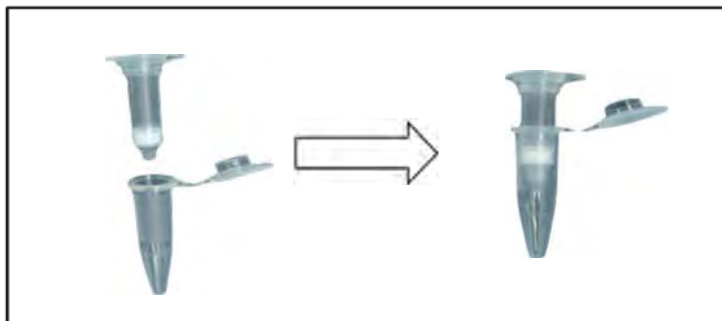


Figura 18 – Transferência do filtro para eppendorf 1,5 mL.

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

20. Aguardar 3 minutos.

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



Figura 19 – Posicionamento dos eppendorfs com filtro dentro.

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

APÊNDICE D – Protocolo das técnicas moleculares de PCR

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



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

2. Identificar na tampa os eppendorfs para PCR.
3. Pipetar 1,5 µL da amostra do DNA extraído para os eppendorfs de PCR previamente identificados.
4. Preparar o Master Mix em eppendorf de 1,5mL. O preparo do MIX dependerá da quantidade de reações que será realizada. Cada eppendorf para PCR equivale a 01 reação (Quadro 1).

Quadro 1 – Proporções dos reagentes no Master Mix.

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

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



Figura 22 – Amostras posicionadas na termocicladora.

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

APÊNDICE E – Eletroforese em gel de agarose

1. Montar a fôrma do gel encaixando as tiras de borracha para vedar bem as extremidades e não vazar gel.
2. Preparar em becker de vidro o gel de agarose na seguinte proporção: 0,9 g de agarose (1%) (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) para 90 mL de Tris-borato EDTA (TBE) (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) diluído.
 - Diluição do TBE: 900 mL de água destilada para 100 mL de TBE puro.
3. Aquecer em microondas por aproximadamente 1 minuto. A mistura deverá estar bem homogênea e transparente.
4. Transferir o conteúdo do becker de vidro (não contaminado com brometo) para o becker de plástico (contaminado com brometo).
5. Acrescentar 2 μ L de brometo de etídio no gel.
6. Verter o gel na fôrma previamente preparada. Em seguida, encaixar os pentes (Figura 23).



Figura 23 – Colocação dos pentes no gel.

7. Esperar o gel endurecer.

8. Pipetar 2 μ L de corante azul (*Blue juice*, Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) nas amostras, de tal modo que as ponteiros permaneçam dentro do Eppendorf (Figura 24).



Figura 24 – Inoculando 2 μ L de corante azul na amostra.

9. Quando o gel endurecer, remover cuidadosamente as tiras de borracha e os pentes (Figura 25)

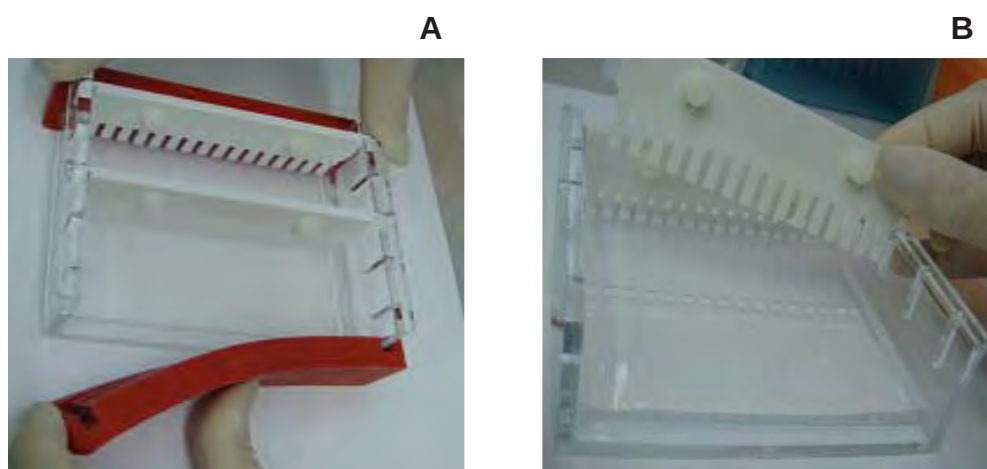


Figura 25 – Remoção dos acessórios para preparo do gel: a) remoção das tiras de borracha; b) remoção dos pentes.

10. Encaixar o gel na cuba de eletroforese preenchida com solução tampão (TBE diluído) (Figura 26).



Figura 26 – Encaixe do gel na cuba de eletroforese. Certificar-se de que o gel está colocado na direção certa, ou seja, do Negativo para o Positivo.

11. Misturar o corante com a amostra de DNA fazendo fluxo / refluxo.
12. O primeiro poço de cada pente do gel deve ser preenchido com *LADDER* (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) diluído e o segundo poço com a ATCC do microrganismo.
- Diluição do *LADDER*: 2 μ L para 15 μ L de água extra pura.
13. Colocar a primeira amostra no terceiro poço do gel e assim sucessivamente (Figura 27).

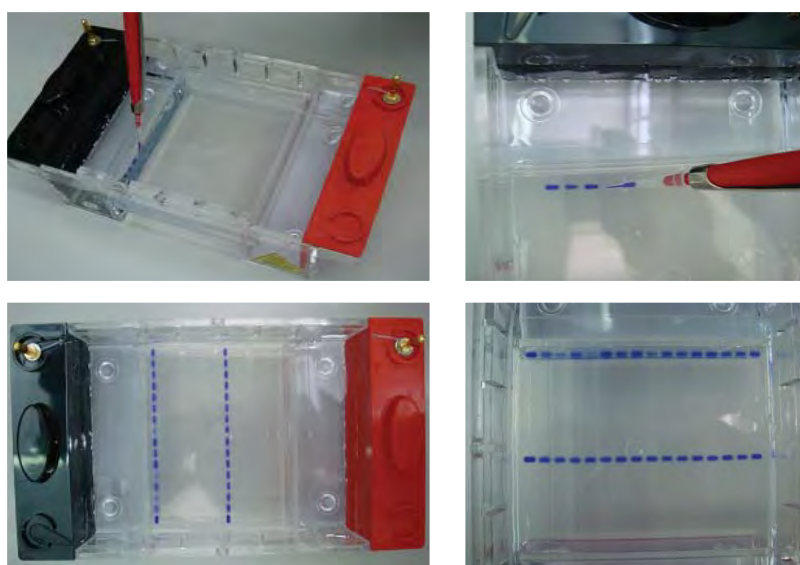


Figura 27 – Preenchimento do gel de agarose com *ladder* diluído, ATCC e amostras.

14. Pipetar 4 μL do *LADDER* diluído e misturar com a bolinha de *blue juice*
15. Fechar a cuba de eletroforese.
16. Rosquear os fios, e ligar a fonte (o ciclo demora em torno de 35 minutos) (Figura 28).



Figura 28 – Fonte ligada à cuba de eletroforese.

17. Decorridos os 35 minutos, remover o gel da plataforma.
18. Posicionar o gel sobre o transiluminador.
19. Posicionar o fotodocumentador sobre o transiluminador e ligar os equipamentos (Figura 29).

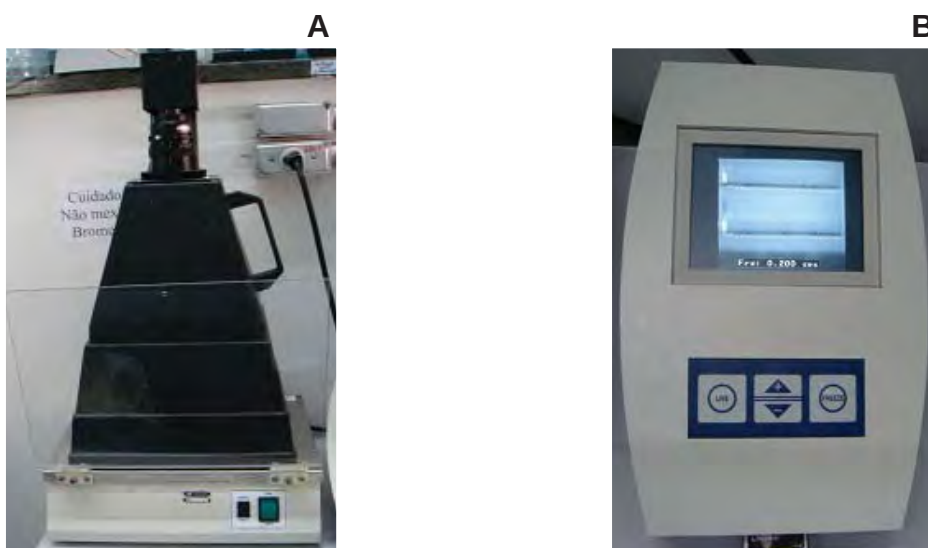


Figura 29 – Documentação fotográfica dos géis: a) fotodocumentador sobre o transiluminador ; b) captura das imagens realizadas pelo programa LISCAP Image Capture software (Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra).

20. Verificar as bandas que acenderam e anotar os resultados (Figura 30).

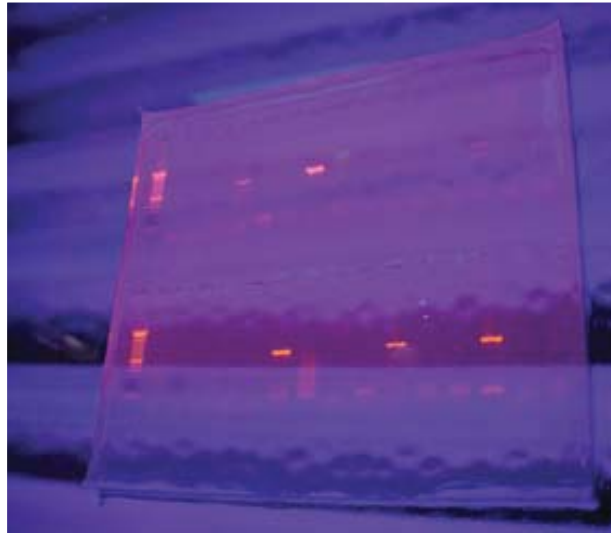


Figura 30 – Leitura das bandas no gel de agarose.

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

APÊNDICE F – Realização da curva padrão

1. Ver certificado para conferência do número do lote e quantidade de volume para endotoxina.
2. Colocar a quantidade de água apirogênica (Lonza, Walkersville, MD, EUA) de acordo com as instruções do fabricante na Endotoxina de *E. coli*, encontrado no Kit fornecido pela empresa (Figura 31).



Figura 31 – Esquema para suspender endotoxina de *E. coli* utilizando água apirogênica.

3. Agitar durante 15 minutos.
4. Separar 4 tubos de vidro apirogênicos, tamanho 13 mm x 100 mm (Lonza, Walkersville, MD, EUA), identificá-los de acordo com as diluições (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) e pipetar 0,9 mL de água apirogênica em cada tubo de vidro (Figura 32).



Figura 32 – Tubos de vidro apirrogênicos necessários para diluição da endotoxina

5. Decorridos os 15 minutos, transferir 100 μL da suspensão de endotoxina para o tubo “5” (referente à diluição 10^{-1}). Agitar 1 minuto, transferir 100 μL para o próximo tubo “0,5” (referente à diluição 10^{-2}) e assim sucessivamente (Figura 33).

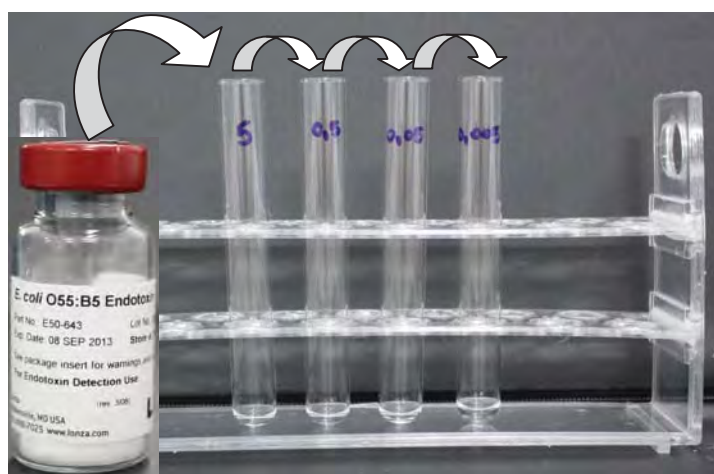


Figura 33 – Esquema de diluições da endotoxina para realização da curva padrão.

APÊNDICE G – Teste de endotoxina – Processamento das amostras

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

1. Nomear os eppendorfs de acordo com a diluição (Figura 34).

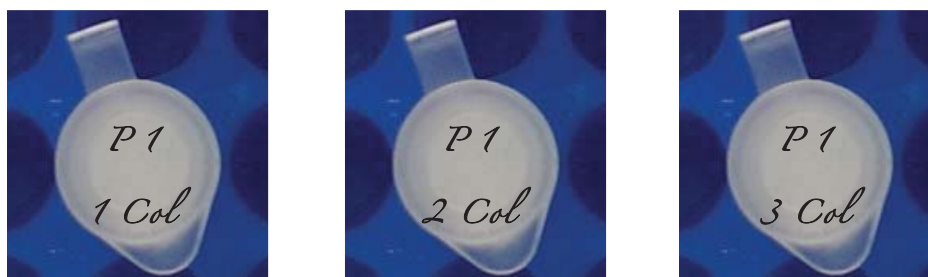


Figura 34 – Eppendorfs nomeados de acordo com a diluição.

2. Pipetar 0,9 mL em cada eppendorf.
3. Agitar durante 1 minuto o eppendorf contendo o cone de papel em 1 mL de água apirogênica (Matriz), obtido nas coletas (Figura 38).
4. Transferir 100 μ L deste eppendorf para o próximo (Diluição 10^{-1}). Agitar 1 minuto, passar 100 μ L para o próximo eppendorf (Diluição 10^{-2}) (Figura 35).

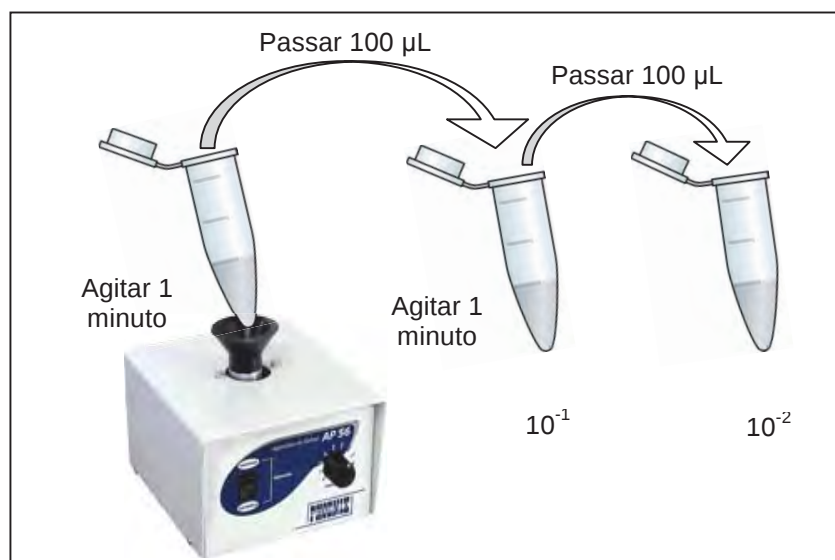


Figura 35– Sequência de diluições da amostra.

5. Após realização da diluição da amostra, agitar o eppendorf por 1 minuto e pipetar, em quadruplicata, 100 μ L da diluição 10^{-2} em placa apirogênica de 96 poços (TPP, Trasadingen, Switzerland), à partir do poço G1 (Figura 36).

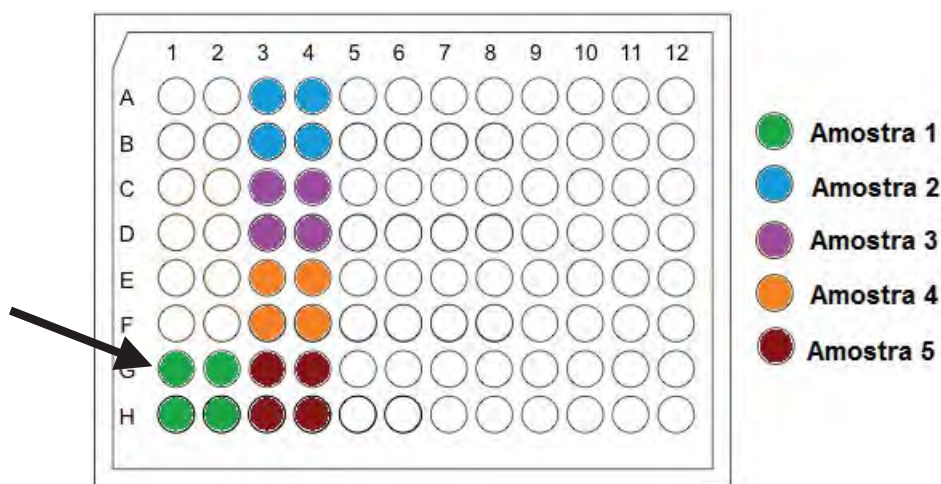


Figura 36– Placa de 96 poços: A seta indica o primeiro poço onde a amostra deverá ser colocada (G1). Cada amostra deverá ser colocada em quadruplicata, ou seja, amostra 1 será colocada nos poços G1, G2, H1 e H2, por exemplo.

6. Após a colocação de todas as amostras na placa, pipetar 100 μ L do branco da reação (água apirogênica), em duplicata, nos poços A1 e A2. Em seguida, pipetar em duplicata, as diluições da endotoxina de *E. coli* para a curva padrão, do mais diluído para o menos diluído (Figura 37).

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

Figura 37 – Placa de 96 poços: BL= Branco da reação (água apirogênica); S1 = diluição 10^{-4} da Endotoxina padrão de *E.coli*; S2 = diluição 10^{-3} da Endotoxina padrão de *E.coli*; S3 = diluição 10^{-2} da Endotoxina padrão de *E.coli*; S4 = diluição 10^{-1} da Endotoxina padrão de *E.coli*; S5 = Endotoxina padrão de *E.coli* (matriz).

7. Adicionar 10 μ L da Endotoxina padrão de *E.coli* (matriz) nos últimos poços de cada amostra (Controle Positivo – poços em amarelo da Figura 37).
8. Incubar a placa no leitor cinético QCL (Cambrex – São Paulo, SP, Brasil) (Figura 38) a $37\pm 1^\circ\text{C}$ por 10 minutos, acoplado a um microcomputador com *software* Wink QCL específico para gerenciamento, execução e emissão de relatórios.



Figura 38 – Leitor cinético QCL.

9. Pipetar 2,6 mL de água apirogênica no reagente cinético cromogênico do Lisado do amebócito *Limulus* (LAL) (Figura 39).

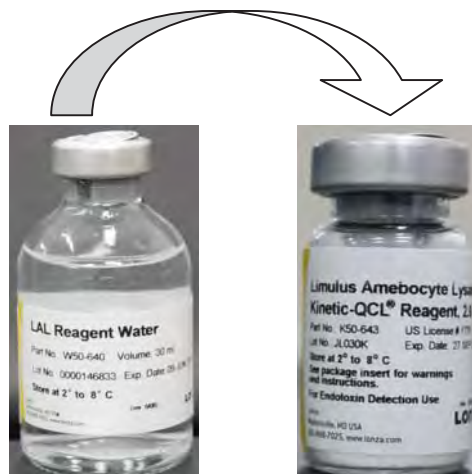


Figura 39 – Esquema para suspender LAL utilizando água apirogênica.

10. Misturar levemente, sem agitar.
11. Adicionar 100 µL do reagente cinético cromogênico do Lisado do amebócito *Limulus* (LAL) em cada poço da placa (Figura 40).

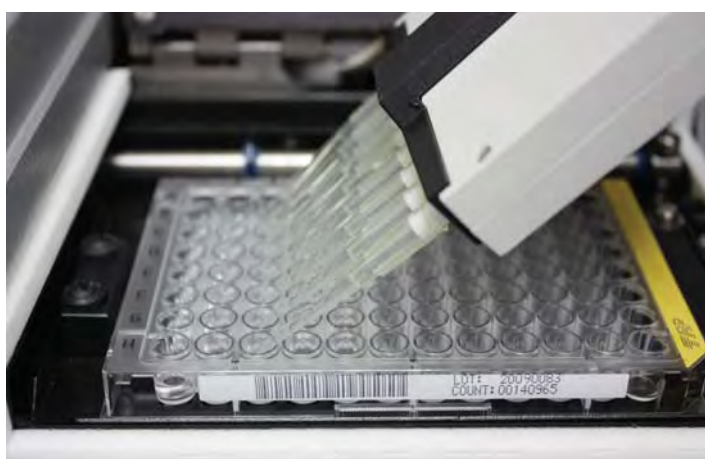


Figura 40– Reagente LAL sendo inoculado em todos os poços da placa.

12. Fechar a tampa do Leitor cinético QCL e iniciar o ensaio cinético. O ciclo demora em torno de 1h15.
13. Ao final do ciclo, os resultados ficam salvos no computador. Retirar a placa do leitor, descartá-la e desligar o equipamento.

AUTORIZAÇÃO

Nome do autor: Adriana Chung

RG: 44.292.809-9

Telefone: (11) 8778-2457

E-mail do autor: adri_chung@yahoo.com.br

Autoriza a divulgação deste endereço eletrônico na C@thedra? ☒ Sim ☐ Não

☒ **Dissertação de Mestrado**

☐ **Tese de Doutorado**

☐ **Tese de Livre-Docência**

Título: Detecção de microrganismos, quantificação de endotoxinas e ação *in vivo* do *Zingiber officinale* em dentes com necrose pulpar e lesão periapical

Palavras-chave: Endotoxinas. *Zingiber officinale*. Irrigantes do Canal Radicular. Reação em Cadeia da Polimerase.

Campus: São José dos Campos

Programa de Pós-Graduação: Odontologia Restauradora

Área de Concentração: Endodontia

Orientador: Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera

Co-orientador:

Banca: Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera; Prof. Dr. Claudio Antonio Talge Carvalho; Prof. Tit. Giulio Gavini

Data da defesa: 06 de julho de 2011

(☒) **AUTORIZO** a Universidade Estadual Paulista - UNESP, a publicar através do site <http://www.biblioteca.unesp.br/bibliotecadigital>, sem ressarcimento dos direitos autorais, o texto integral da obra acima citada, em formato PDF, a título de divulgação da produção científica gerada pela Universidade, em conformidade com o estabelecido pela CAPES (**PORTARIA No- 13, DE 15 DE FEVEREIRO DE 2006**).

Assinatura do(a) autor(a)

Data: 08 / 07 / 2011

OBS.: Preencher este Termo em duas vias assinadas. A primeira, permanece na Seção de Pós-graduação e a segunda será encaminhada à Biblioteca da Unidade juntamente com o arquivo eletrônico em formato PDF.

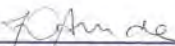
ANEXO A – Certificado do comitê de ética em pesquisa

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

 CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Com Seres Humanos

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **070/2009-PH/CEP**, sobre **“Identificação de microrganismos, quantificação de endotoxina e avaliação in vivo do extrato glicólico de gengibre em dentes com necrose pulpar e lesão periapical”**, sob a responsabilidade de **ADRIANA CHUNG**, tendo como orientadora a Profa. Adjunto Márcia 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, 13 de outubro de 2009



Profa. Adjunto JANETE DIAS ALMEIDA
Coordenadora



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - São Dimas - CEP 12201-970 - F. (12) 3947-9000 - FAX (12) 3947-9026



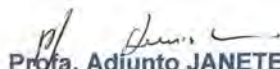
Comitê de Ética em Pesquisa
Com Seres Humanos

São José dos Campos, 08 de julho de 2011

Ofício nº 041/11-CEP

Prezado(a) Sr.(a)	ADRIANA CHUNG
Projeto	Identificação de microrganismos, quantificação de endotoxinas e avaliação in vivo do extrato glicólico de gengibre em dentes com necrose pulpar e lesão periapical
PARECER	
De acordo com solicitação da Pesquisadora Responsável fica alterado o título do projeto para "DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS, QUANTIFICAÇÃO DE ENDOTOXINAS E AÇÃO IN VIVO DO ZINGIBER OFFICINALE EM DENTES COM NECROSE PULPAR E LESÃO PERIAPICAL, Convalidando dessa forma o Protocolo nº 070/2011-PH/CEP de 13/10/2009.	

Atenciosamente,


Prof. Adjunto JANETE DIAS ALMEIDA
Coordenadora