

LILIAN EIKO MAEKAWA

**AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS E DE
GENGIBRE COMO MEDICAÇÃO INTRACANAL SOBRE
MICRORGANISMOS E ENDOTOXINAS EM CANAIS
RADICULARES**



2010

LILIAN EIKO MAEKAWA

**AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS E DE GENGIBRE COMO
MEDICAÇÃO INTRACANAL SOBRE MICRORGANISMOS E
ENDOTOXINAS EM CANAIS RADICULARES**

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

Orientadora: Profa. Adj. Marcia Carneiro Valera

São José dos Campos

2010

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; 2008.

M268a Maekawa, Lilian Eiko
Avaliação dos extratos de própolis e de gengibre como medicação
intracanal sobre microrganismos e endotoxinas em canais radiculares / Lilian
Eiko Maekawa. __ São José dos Campos : [s.n.]; 2010.
124p. : il.

Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) – Faculdade de
Odontologia de São Jose dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista,
2010.

Orientadora: Profa. Marcia Carneiro Valera

1. Própolis. 2. Gengibre. 3. Hidróxido de cálcio. 4. Clorexidina. 5. *Candida
albicans*. 6. *Enterococcus faecalis*. 7. *Escherichia coli*. 8. Endotoxinas. I.
Valera, Marcia Carneiro. II. UNESP - Univ Estadual Paulista. Faculdade de
Odontologia de São José dos Campos. III. Título.

Black TD24

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

AUTORIZAÇÃO

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

São José dos Campos, 15 de setembro de 2010.

Assinatura :

E-mail: lilian.maekawa@uol.com.br

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj. Marcia Carneiro Valera (Orientadora)
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Prof. Dr. Celso Luiz Caldeira
Faculdade de Odontologia
Universidade de São Paulo - USP

Profa. Assoc. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes
Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Universidade de Campinas - UNICAMP

Prof. Dr. Claudio Antonio Talge Carvalho
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Prof. Titular Antonio Olavo Cardoso Jorge
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista - UNESP

São José dos Campos, 29 de julho de 2010.

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Marcos e Iracema

Vocês são meus exemplos de vida, de educação, de casal, de família, de “porto seguro”, mas principalmente de AMOR, um amor incondicional que me confortou por diversas vezes. Minha mãe, dedicou sua vida para cuidar do meu crescimento e da minha educação e hoje, parece ainda cuidar de mim da mesma maneira que antes com uma dedicação indescritível. Meu pai, sempre tentando suprir todas as minhas necessidades e meus caprichos, conseguindo fazer papel de pai e professor ao mesmo tempo, deixando de realizar suas próprias vontades, para que eu realizasse meus sonhos. Levarei por toda a minha vida, a educação, o caráter e a boa índole que me ensinaram. Além de pais, são meus amigos e conselheiros na vida pessoal e profissional. Ter vocês por perto, me trouxe segurança e confiança para seguir sempre em frente. Agradeço por proporcionar todo o suporte emocional necessário para superar os momentos mais difíceis. Minha eterna admiração e gratidão, porque devo tudo de mim e tudo que sou a vocês.

Aos meus queridos irmãos, Sadao e Carla

Ao meu irmão e amigo Sadao, que embora residindo no Japão, seus esclarecimentos, incentivo, otimismo e atenção nas conversas pela internet, fizeram com que a saudade e a distância entre nós fosse bem menor.

À minha irmã e amiga Carla, com quem posso contar nas horas mais difíceis. Seus incansáveis conselhos de incentivo e conforto quando necessários foram imprescindíveis no meu crescimento como pessoa.

Admiro vocês como irmãos mais velhos e que, apesar de serem firmes comigo de vez em quando, sei que só querem o meu bem. Muito obrigada pelo carinho, amor e respeito com que cuidaram e cuidam de mim e pela amizade, compreensão e companheirismo que nos une até hoje.

Ao meu amor e noivo Sérgio

Pessoa que escolhi para dividir todos os dias da minha vida. Acredito que o amor, o respeito e a cumplicidade são fontes ideais do nosso relacionamento. Obrigada por respeitar e apoiar as minhas decisões, sempre pensando na minha felicidade. Agradeço por ser meu parceiro incondicional em todos os momentos, principalmente naqueles momentos mais estressantes. Apesar da sua ausência, da saudade e do pouco tempo que tínhamos para ficar junto, acredito que nosso amor permaneceu e firmou-se ainda mais. Obrigada pelo cuidado, pela paciência, companheirismo e amor de hoje e sempre!!!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Profa. Adj. Marcia Carneiro Valera

Agradeço à minha orientadora pela oportunidade de aprendizado nestes cinco anos de Pós-Graduação. Sem mesmo me conhecer, acreditou no meu trabalho. Sem mesmo te conhecer, já te admirava. Seu dom de ensinar e de liderar com muita paciência e tranquilidade, faz com que hoje, minha admiração seja ainda maior. Levarei seus ensinamentos como exemplo por toda a minha vida. Obrigada pela confiança depositada em mim e pela compreensão, conforto e otimismo nas horas mais difíceis durante o curso de Doutorado. Obrigada também pelas oportunidades que tive de aprender a orientar. Nossas conversas durante o curso, fizeram com que nós nos aproximássemos e hoje, acredito que posso chamá-la não só de orientadora, mas também de amiga.

Minha eterna admiração e gratidão por tê-la como orientadora.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pela sua presença constante na minha vida, por iluminar os meus caminhos, pelo auxílio nas minhas escolhas, me confortar nas horas difíceis e me dar força para seguir em frente.

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

Aos Professores da Disciplina de Endodontia por terem me recebido de braços abertos. Agradeço ao **Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo** pela sua disposição em ajudar em qualquer momento e por ter confiado em mim para ficar ao seu lado na clínica integrada. Admiro seu dom de ensinar, sua capacidade profissional e a sua vontade em fazer uma Endodontia cada vez melhor. Ao **Prof. Dr. Cláudio Antonio Talge Carvalho**, pela convivência muito divertida durante o curso de Doutorado. Muito obrigada pela amizade. À **Profa. Adj. Ana Paula Martins Gomes**, pelo carinho de sempre nas poucas conversas nos corredores do Departamento. Ao **Prof. Dr. Renato Miotto Palo** pela sua maneira sempre descontraída de ver a vida, lidando com os problemas sempre com muito bom humor. Meus sinceros

agradecimentos a todos vocês, por participarem da minha formação como Mestre e hoje Doutora.

À **Profa. Dra. Luciane Dias Oliveira**, não tenho palavras para agradecer e expressar o quanto gosto de você. Desde o início do curso de Mestrado, fazendo treinamento juntas da tal endotoxina, que eu nem sabia o que era direito, acredito que nós nos identificamos. Te admiro pela sua sinceridade, sua busca pelo conhecimento e sua força interior.

À **Profa. Dra. Samira Esteves Afonso**, pela sua amizade, atenção e conselhos durante o curso. Te admiro pelo seu bom humor e pela sua dedicação com aqueles que procuram a sua ajuda, inclusive eu, às vezes, tão desesperada.

Aos Professores da Disciplina de Prótese Parcial Removível, **Prof. Adj. Lafayette Nogueira Jr**, **Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli** e **Prof. Dr. Eduardo Uemura**, pela amizade e agradável convivência durante o estágio na disciplina de Prótese Parcial Removível. Agradeço pelos incansáveis conselhos na minha vida tanto profissional como pessoal. Obrigada pelo cuidado que vocês tem comigo devido a grande amizade que existe entre vocês e meu pai. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

Ao Prof. Adj. **Clóvis Pagani** pela amizade e incentivo constantes. A maneira com que vive a vida, faz com que eu te admire cada dia mais. Sua força interior faz com que eu me sinta confortável na sua presença. Obrigada pelos conselhos durante as viagens a São José dos Campos.

Ao Prof. Tit. **Antonio Olavo Cardoso Jorge** pelas orientações, ensinamentos, incentivo e apoio durante a execução deste trabalho.

À Profa. Adj. **Cristiane Yumi Koga-Ito**, pela disponibilidade em ajudar e ensinar. Pela amizade, boa vontade, incentivo e principalmente otimismo nos momentos mais difíceis. Sempre que precisei, você estava lá. Obrigada por fazer parte da minha vida.

À querida amiga **Alessandra Sverberi Carvalho**, por ter me acolhido na sua casa quando mais precisei de um ombro amigo. Começamos sem nos conhecer no Mestrado, continuamos juntas no Doutorado e hoje, acredito que seguiremos juntas por muito mais tempo. À querida amiga **Paula Elaine Cardoso**, pelo seu jeito muito carinhoso e meigo de lidar com as pessoas e principalmente comigo. Sei que agora estamos mais separadas, mas acredito que no coração, sempre estaremos juntas. Obrigada meninas, pela grande amizade que se construiu durante o curso de Pós-Graduação, uma amizade sincera, honesta e verdadeira, que por um simples olhar, sabíamos se era para rir ou para chorar.

Acredito que sempre lembraremos com carinho da maravilhosa convivência que tivemos durante o curso.

Aos queridos amigos **Daniel Maranha da Rocha e Milena Nunes**, pela amizade que não imaginava acontecer e que na hora que eu mais precisei, vocês estavam lá, do meu lado, incondicionalmente. Deixaram seus afazeres para me confortar com suas palavras de carinho. Podem ter certeza que nunca esquecerei estes dias. Minha eterna gratidão por ficarem do meu lado nestes momentos difíceis da minha vida.

Aos queridos amigos **João Mauricio Ferraz da Silva e Eron Toshio Colauto Yamamoto**, pela grande amizade desde à época do estágio da Removível. Obrigada pelo carinho de sempre.

Às queridas amigas, **Adriana Chung, Ana Claudia Carvalho Xavier e Flávia Cardoso** pela afinidade que tivemos desde que conheci cada uma de vocês. Antes simplesmente alunas (Iniciação Científica e bolsistas técnicas), hoje minhas amigas de coração. Agradeço por SEMPRE estarem do meu lado, por acreditarem no meu trabalho, por me respeitarem. Sem a ajuda de vocês, este trabalho não seria possível.

Às queridas amigas, **Angélica da Veiga Said e Roberta Lamping** pela amizade, conselhos e companheirismo durante a época da faculdade e, apesar de hoje estarem distantes são muito especiais pra mim. Tenho

certeza que torcemos pela felicidade uma da outra sem mesmo nos encontrarmos sempre.

À querida amiga **Maria Renata Giazzi Nassri** pela amizade e carinho de sempre.

À querida amiga **Denise Sugano**, pelas conversas, apoio e incentivo na minha vida pessoal.

Às alunas do Mestrado **Mariana, Tatê, Gleyce, Patrícia, Nádia, Claudinha**, e do Doutorado, **Aletéia, Silvia e Raffaella**, pela agradável convivência diária na salinha da Pós-Graduação.

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

Às técnicas de laboratório **Josiana e Fernanda**, que sempre foram muito atenciosas e prestativas.

À **Dona Marinete**, pelo bom humor de sempre, pelo carinho e pelo delicioso cafezinho de todos os dias.

Ao técnico de laboratório **Sérgio**, pela amizade, bom humor e mau humor durante a fase experimental deste trabalho, afinal como você sempre diz, só nós nos entendemos, pois somos vizinhos de aniversário.

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

Às alunas de Iniciação Científica **Jucely Aparecida da Rosa, Flávia Berton, Carolina Lima e Gláucia Gonçalves Faro** pelo agradável convívio durante os trabalhos de Iniciação Científica, acrescentando-me coisas boas na vida, tanto na profissional como na pessoal.

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

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

À **FAPESP**, pelo auxílio financeiro prestado para a realização deste trabalho.

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

MUITO OBRIGADA!!!

SUMÁRIO

RESUMO.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	
2.1 <i>Candida albicans</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Escherichia coli</i> em canais radiculares.....	20
2.2 Endotoxina (lipopolissacarídeo).....	24
2.3 Medicações intracanais: hidróxido de cálcio e clorexidina sobre microrganismos e endotoxinas.....	30
2.4 Própolis.....	38
2.5 Gengibre.....	43
3 PROPOSIÇÃO.....	46
4 MATERIAL E MÉTODO.....	47
4.1 Preparo dos espécimes.....	47
4.2 Contaminação dos espécimes.....	49
4.3 Divisão dos grupos experimentais.....	54
4.4 Coletas do conteúdo do canal radicular.....	58
4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	59
4.6 Quantificação de endotoxinas.....	60
5 RESULTADOS.....	63
5.1 Análise microbiológica.....	63
5.2 Quantificação de endotoxinas.....	70
6 DISCUSSÃO.....	74
6.1 Da metodologia.....	74
6.2 Dos resultados.....	79
7 CONCLUSÃO.....	88
8 REFERÊNCIAS.....	89

APÊNDICES.....	107
ANEXO.....	123
ABSTRACT.....	124

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 “Júlio de Mesquita Filho”; 2010.

RESUMO

A proposta deste trabalho foi avaliar a efetividade dos extratos glicólicos de própolis e de gengibre, hidróxido de cálcio, clorexidina gel e associações como medicação intracanal (MIC) sobre *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e endotoxinas em canais radiculares. Foram utilizadas 96 raízes de dentes unirradiculados que tiveram seus canais contaminados com suspensões dos microrganismos por 28 dias. Após a coleta de confirmação, os canais foram instrumentados com solução salina e divididas de acordo com a medicação intracanal utilizada: hidróxido de cálcio $[Ca(OH)_2]$ + solução salina; clorexidina gel 2% (CLX); $Ca(OH)_2$ + CLX; própolis (PRO); PRO + $Ca(OH)_2$; gengibre (GENG); GENG + $Ca(OH)_2$; solução salina. Foram realizadas as seguintes coletas do conteúdo do canal radicular: coleta de confirmação (após 28 dias de contaminação), 1ª coleta (imediatamente após a instrumentação), 2ª coleta (imediatamente após 14 dias da ação da MIC), 3ª coleta (7 dias após remoção da MIC). Para todas as coletas foram avaliadas: a) atividade antimicrobiana; b) quantificação de endotoxinas pelo teste cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus*. Os resultados foram submetidos aos testes estatísticos Kruskal-Wallis e Dunn (5%). Verificou-se que todas as MIC foram capazes de eliminar os microrganismos dos canais radiculares, entretanto, o $Ca(OH)_2$ não foi capaz de eliminar completamente *C. albicans* e *E. faecalis*. Verificou-se que as MIC contendo $Ca(OH)_2$ foram capazes de diminuir significativamente as endotoxinas dos canais radiculares, sendo semelhantes entre si e diferentes do grupo salina. As medicações CLX, PRO, GENG e salina foram semelhantes entre si. Conclui-se que todas as MIC foram capazes de eliminar os microrganismos do canal radicular e reduzir a quantidade de endotoxinas dos canais radiculares, entretanto, as MIC à base de hidróxido de cálcio foram mais eficazes na neutralização de endotoxinas.

Palavras-chave: Própolis. Gengibre. Hidróxido de cálcio. Clorexidina. *Candida albicans*. *Enterococcus faecalis*. *Escherichia coli*. Endotoxinas.

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos e seus produtos estão intimamente ligados à etiologia das lesões pulpares e periapicais, que, como agentes agressores, podem levar o tecido pulpar à necrose; sua persistência no canal radicular, após tratamento endodôntico, pode perpetuar ou induzir reação inflamatória periapical (Vafaie et al. 1999). Assim, o conhecimento sobre a microbiota endodôntica é fundamental para entender o desenvolvimento dos processos patológicos apicais e periapicais e oferece subsídios para a escolha de uma terapêutica adequada.

As infecções endodônticas são consideradas polimicrobianas. Além de bactérias, outros microrganismos como fungos, podem ser comumente encontrados em canais radiculares com necrose pulpar (Nair, 1990; Sen et al., 1995; Waltimo et al., 1997; Peciulienė et al., 2001; Siqueira et al., 2002; Sunde et al., 2002; Maekawa et al., 2006). *Enterococcus faecalis* tem sido frequentemente isolado em canais radiculares com necrose pulpar e nas infecções persistentes pós-tratamento endodôntico (Sundqvist et al., 1998; Love, 2001; Peciulienė et al., 2001; Sunde et al., 2002; Siqueira et al. 2004; Gomes et al., 2008). Este microrganismo é capaz de penetrar em profundidade nos túbulos dentinários, sendo de difícil eliminação após preparo biomecânico (Waltimo et al. 2000; Love 2001).

Em canais radiculares de dentes portadores de necrose pulpar e lesão periapical crônica, embora exista diversidade microbiana, predominam bactérias anaeróbias, particularmente as Gram-negativas (Mattison et al. 1987; Seltzer e Farber, 1994; Leonardo, 2005; Leonardo et al. 2004). Essa infecção de natureza polimicrobiana encontra-se

localizada não apenas na luz do canal radicular, mas também nos túbulos dentinários e em todo o sistema de canais radiculares e crateras de reabsorções apicais.

Bactérias Gram-negativas contém endotoxina em sua parede celular que estimulam células competentes como macrófagos, neutrófilos e fibroblastos, desencadeando a liberação de um grande número de mediadores químicos inflamatórios principalmente as citocinas, causando uma série de efeitos biológicos que levam a uma reação inflamatória, imunológica e reabsorção óssea periapical (Mattison et al. 1987; Wang; Stashenko, 1993).

Apesar de *Escherichia coli* não ser uma bactéria comumente encontrada no interior de canais radiculares com polpa necrosada, sua endotoxina apresenta a estrutura básica do componente lipídico, que representa o centro ativo responsável pela toxicidade do LPS. Assim, estudos têm sugerido a sua utilização para avaliar a efetividade de substâncias químicas sobre endotoxinas (Oliveira et al., 2005; Oliveira et al., 2007). Da mesma forma, para avaliar o papel das endotoxinas nos tecidos periapicais, pesquisas tem sido realizadas utilizando endotoxina de *E. coli* inoculadas em canais radiculares, mostrando que este componente bacteriano tem função no início e na perpetuação de lesões periapicais inflamatórias e reabsorção óssea (Dwyer et al., 1981).

Sabe-se que é objetivo do preparo biomecânico a limpeza e desinfecção do sistema de canais radiculares. Entretanto, é possível que, mesmo após a utilização de substâncias químicas auxiliares com ação antimicrobiana durante o preparo biomecânico, alguns microrganismos e endotoxinas permaneçam no sistema de canais radiculares, túbulos dentinários e crateras de reabsorção apical, predispondo o tratamento endodôntico ao insucesso.

Assim, a medicação intracanal tem como objetivo tornar o sistema de canais radiculares de dentes com polpa necrosada e infectada, um meio impróprio ao desenvolvimento microbiano, inibindo ou destruindo aqueles microrganismos que não foram eliminados durante o preparo biomecânico (Leonardo, 2005).

O hidróxido de cálcio tem sido amplamente utilizado como medicação intracanal devido às suas propriedades antimicrobianas (Leonardo, 2005; Leonardo et al., 2002), capacidade de induzir a mineralização (Leonardo et al., 1998) e principalmente devido sua efetiva ação sobre endotoxinas (Safavi; Nichols, 1993; Safavi; Nichols, 1994; Nelson Filho et al., 2002; Silva et al., 2002; Tanomaru et al., 2003; Leonardo et al., 2004; Oliveira et al., 2005).

A clorexidina vem sendo utilizada na forma de gel por apresentar ação sobre microrganismos aeróbios e anaeróbios, Gram-positiva e Gram-negativa e leveduras (Ferraz et al., 2001; Ferreira et al., 2002; Dametto et al., 2005; Ercan et al., 2006; Gomes et al., 2009; Valera et al., 2009; Maekawa et al., 2010). Entretanto, parece não ter ação sobre endotoxinas (Tanomaru et al., 2003; Maekawa et al., 2010). Assim, a associação hidróxido de cálcio e clorexidina a 2% vem sendo indicada como medicação intracanal com resultados satisfatórios, uma vez que esta associação apresenta maior espectro antimicrobiano, além da efetividade sobre endotoxinas presentes no canal radicular (Maekawa et al., 2007; Semenoff et al., 2008).

Atualmente, verifica-se um crescente aumento dos estudos utilizando substâncias naturais na área médica. Extratos ou chás de diversas plantas são utilizados na medicina popular desde a antiguidade, entretanto, suas reais propriedades e aplicações estão sendo cientificamente avaliadas.

Dentre os extratos naturais utilizados na Odontologia, destaca-se a própolis devido às suas inúmeras propriedades terapêuticas como antiinflamatória, analgésica e antimicrobiana (Grange; Davey, 1990; Paulino et al., 1996; Lotufo et al., 2005; Silva et al., 2008).

O gengibre (*Zingiber officinale*) sempre foi apreciado desde os tempos mais antigos, sendo largamente empregado como condimento, em bebidas alcoólicas e na medicina popular. Devido a sua ação cicatrizante, antiinflamatória e antimicrobiana, o gengibre vem sendo empregado associado a outras substâncias naturais como mel, própolis ou romã em soluções ou sprays utilizados na cavidade oral, sendo indicado para amigdalites, tosse e halitose (Grégio et al., 2006). Em Odontologia, poucos estudos são relatados na literatura. A atividade antimicrobiana do gengibre sobre *C. albicans* e *E. faecalis* inoculados em canais radiculares foi verificada por Shygei et al. (2008).

Assim, devido a importância da eliminação de microrganismos e seus produtos do interior do sistema de canais radiculares em relação ao sucesso do tratamento endodôntico, justifica-se a busca constante de medicamentos capazes de eliminar estes microrganismos. Ainda, o estudo de medicamentos naturais poderá encontrar uma substância química capaz de atuar sobre microrganismos e seus produtos com menores efeitos nocivos ao organismo humano e ao meio ambiente.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* em canais radiculares

Um dos primeiros estudos avaliando o papel dos microrganismos nas infecções pulpares e periapicais foi realizado por Kakehashi et al. (1965). Estes autores utilizaram ratos *germ-free* e convencionais, que tiveram a polpa dos primeiros molares superiores expostas à alimentação esterilizada. Após 14 dias, verificaram no grupo convencional, dentes com tecido pulpar totalmente necrosado, com tecido inflamatório crônico e formação de abscesso na região periapical, enquanto que no grupo *germ-free* não foi observado necrose pulpar nem formação de abscesso, apenas um mínimo infiltrado inflamatório, concluindo que os microrganismos estão ligados à etiologia das alterações pulpares e peripicais.

A microbiota dos canais radiculares infectados está constantemente sendo identificada, sendo que novas espécies microbianas são descobertas, de acordo com a evolução dos métodos de identificação e cultivo dos microrganismos isolados. As infecções endodônticas são consideradas polimicrobianas. Vários estudos identificaram uma grande variedade dos microrganismos, compreendendo aeróbios, anaeróbios estritos, anaeróbios facultativos e fungos, sendo que *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* estão entre os microrganismos frequentemente isolados em canais radiculares de dentes com necrose pulpar, presença de lesão periapical, ou lesões refratárias (Waltimo et al.,

1997; Sundqvist et al., 1998; Peciulienė et al., 2001; Sunde et al., 2002; Pinheiro et al., 2003).

Em casos de necrose pulpar com evidência radiográfica de periodontite apical e ausência de doença periodontal, *E. faecalis* foi isolado em 55% dos casos (Vianna et al., 2008). Entretanto, ao estudar a microbiota de dentes com abscessos agudos periapicais de origem endodôntica, Siqueira et al. (2001) detectaram a presença de *E. faecalis* e *Escherichia coli* em apenas 3,7% dos casos. Em dentes com presença de periodontite apical crônica, *E. coli* estava presente em 7,5% dos casos, *C. albicans* em 18% dos casos e *E. faecalis* em 64% dos casos (Peciulienė et al., 2001).

Ao avaliar a microbiota de dentes com lesão periapical refratária associada ao tratamento com hidróxido de cálcio, Sunde et al. (2002) identificaram *E. faecalis* e *C. albicans* em 5,6% dos casos. Em oito pacientes foi administrado antibiótico (fenoximetilpenicilina) antes da coleta microbiológica e em cinco destes pacientes, foram encontrados *E. faecalis* e *C. albicans*, comprovando a resistência destes microrganismos mesmo na presença de medicação sistêmica.

Outros estudos de identificação e análise microbiológica de dentes com tratamento endodôntico e presença de lesão periapical verificaram que *E. faecalis* é a espécie mais prevalente, estando presente em 38% (Sundqvist et al., 1998), 45% (Pinheiro et al., 2003), 77% (Siqueira et al., 2004) e até 77,8% (Gomes et al., 2008) dos casos. Utilizando o método de reação em cadeia de polimerase (PCR), Schirrmeister et al. (2007) identificou o DNA de *E. faecalis* em 31% dos casos estudados. Este mesmo método de identificação de microrganismos foi utilizado por Fouad et al. (2005) onde os autores identificaram *E. faecalis* em 22% dos casos.

Pinheiro et al. (2003) avaliaram a microbiota de 30 dentes tratados endodonticamente com lesão periapical persistente. A espécie bacteriana frequentemente isolada foi *E. faecalis* (36,7% dos casos). Neste mesmo estudo, foi avaliado a susceptibilidade aos antibióticos, verificando que *E. faecalis* foi susceptível à benzilpenicilina, amoxicilina e amoxicilina combinado ao clavulanato, entretanto, mostrou resistência à eritromicina e azitromicina

Apesar de *E. faecalis* estar na maioria das vezes presente em infecções com diversos tipos de bactérias e fungos, associado a periodontite apical pós tratamento endodôntico (Sakamoto et al., 2008), este pode estar presente em culturas puras, como monoinfecções (Sirén et al., 1997). Estudos avaliando a microbiota de dentes tratados endodonticamente com presença de lesão periapical identificaram cultura pura de *E. faecalis* em 2 de 10 dentes avaliados (Schirrmeister et al., 2009) e em 18 de 51 casos estudados (Pinheiro et al., 2003), sugerindo o importante papel deste microrganismo nas infecções endodônticas.

A identificação de *C. albicans* em dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical indica que as leveduras possuem um papel importante nos casos de periodontite apical persistente após o tratamento convencional, estando geralmente associada às bactérias (Waltimo et al., 1997; Peciulienė et al., 2001), ou ainda em alguns casos, podendo estar presente em monoinfecções (Waltimo et al., 1997). Najzar Flegler et al. (1992) identificaram espécies de *Candida* em 55% dos casos e Maekawa et al. (2006) identificaram 15,3% de *C. albicans* em canais radiculares com necrose pulpar. Molander et al. (1998) e Peciulienė et al. (2001) também relataram a presença deste microrganismo em 3 de 100 casos e em 6 de 40 dentes examinados, respectivamente, sendo que todos os dentes avaliados estavam tratados endodonticamente e com presença de periodontite apical. Outros estudos avaliando a microbiota de dentes com tratamento endodôntico e presença de lesão periapical

identificaram *C. albicans* em 2 dos 60 dentes (Pinheiro et al., 2003) e em 2 dos 54 dentes avaliados (Sundqvist et al., 1998). Estudos através de microscopia eletrônica de varredura, também confirmam a associação entre fungos e infecções do canal radicular (Sen et al., 1995; Siqueira et al., 2002).

Siqueira e Sen (2004) citaram os prováveis mecanismos de ação que parecem estar associados na patogênese de *C. albicans*: adaptabilidade a uma variedade de condições ambientais, tendo habilidade em sobreviver como comensal e capaz de se adaptar tanto em pH ácido como básico; é capaz de se coagregar com certas bactérias orais como *Actinomyces* e *Fusobacterium nucleatum*; produz enzimas hidrolíticas que podem causar danos aos tecidos periapicais como aspartil proteinase, collagenase, hialuronidase, fosfatases ácidas e alcalinas, sendo que todas estas enzimas têm algum efeito na degradação da matriz extracelular; transição morfológica, mudança de forma de levedura para a forma de hifas, representando uma mudança do estado comensal para o patogênico, possuindo a habilidade de invadir o tecido do hospedeiro e escapar da fagocitose pelos macrófagos; *C. albicans* ainda possui a capacidade de formação de biofilmes em diferentes superfícies, podendo se tornar mais resistente aos antifúngicos comumente utilizados como fluconazol e anfotericina B.

Em relação à penetração nos túbulos dentinários, *C. albicans* atinge pouca ou nenhuma profundidade de penetração (Orstavik; Haapasalo, 1990; Waltimo et al. 2000). Entretanto, *E. faecalis* tem a habilidade de penetrar rapidamente e profundamente, sendo de difícil remoção após o preparo biomecânico, permanecendo viável dentro dos túbulos e aderindo ao colágeno na presença do soro humano. Isto faz com que *E. faecalis* seja um dos microrganismos responsáveis pela persistência de alterações crônicas de dentes tratados endodonticamente (Love, 2001).

Apesar de *E. coli* não ser uma bactéria comumente encontrada no interior de canais radiculares com polpa necrosada, estudos de Siqueira et al. (2001), Peciulienė et al. (2001) e Geibel et al. (2005) identificaram sua presença em casos de necrose pulpar e presença de lesões periapicais. Ainda Molander et al. (1998) isolaram *E. coli* em 8 de 100 canais radiculares com presença periodontite apical pós-tratamento endodôntico. Como sua endotoxina apresenta a estrutura básica do componente lipídico, que representa o centro ativo responsável pela toxicidade do LPS, estudos têm sugerido a utilização para avaliar a efetividade de substâncias químicas sobre endotoxinas (Oliveira et al., 2005; Oliveira et al., 2007).

2.2 Endotoxina (lipopolissacarídeo)

A partir da 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, embora exista diversidade microbiana, predominam bactérias anaeróbias, particularmente as Gram-negativas (Mattison et al., 1987; Seltzer; Farber, 1994; Leonardo, 1998; Leonardo et al., 2004).

Bactérias Gram-negativas contêm endotoxina em sua parede celular, que são liberadas durante sua duplicação ou morte celular e é composta de polissacarídeos e lipídeos, podendo ser chamada também de lipopolissacarídeo (LPS). O LPS, molécula de alto peso molecular, é constituído de três partes. A primeira parte é o antígeno O, que é formado por repetidas unidades oligossacarídicas, que são específicas de um grupo e determinadas pela identidade da respectiva bactéria, sendo esta região única para cada cepa bacteriana. O corpo

oligossacarídico representa a segunda parte, região do núcleo, que contém ácido 2-keto-3-deoxioctônico (KDO) e heptose ou galactose ou glicose. E a terceira parte é o lipídeo A, região da molécula de endotoxina responsável pelo seu efeito tóxico (Caroff, 2002).

As endotoxinas não causam lesões celulares ou teciduais diretamente, entretanto 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).

No sangue e nos tecidos as endotoxinas ligam-se ao receptor CD-14 na superfície de monócitos e macrófagos, e estas células ativadas secretam interleucinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8) (Matsushita et al., 1999), Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) (Stashenko, 1990; Barthel et al., 1997), superóxido (O₂), óxido nítrico, interferons α , β e γ , e moléculas lipídicas como o fator ativador de plaquetas e prostaglandinas (Leonardo et al., 1998). As endotoxinas ainda podem contribuir para um aumento na liberação de substâncias vasoativas neurotransmissoras na região das terminações nervosas dos tecidos periapicais, conduzindo à ocorrência da dor (Seltzer e Farber, 1994), além de ativar o sistema complemento (Morrison e Kline, 1977; Horiba et al., 1992) e o fator de Hageman (fator XII da cascata da coagulação) (Leonardo et al., 2004).

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, atuando na síntese e liberação de citocinas como a interleucina-1 α , interleucina-1 β e fator de necrose tumoral (TNF) (Wang; Stashenko, 1993). O LPS também estimula as células do hospedeiro na

liberação de prostaglandina- E_2 (Safavi e Nichols, 1993), a qual tem influência sobre os osteoclastos, perpetuando a reação inflamatória periapical (Leonardo, 1998).

Schein e Schilder (1975) realizaram um estudo *in vivo* para detectar e quantificar os níveis de endotoxina em dentes que necessitavam de tratamento endodôntico. Os resultados mostraram diferença estatística significativa nos casos de dentes com e sem vitalidade, presença e ausência de sintomas e presença ou não de lesões periapicais radiograficamente visíveis. As maiores quantidades de endotoxina estavam presentes em dentes sem vitalidade, com sintomatologia dolorosa e lesões periapicais radiograficamente visíveis. Os autores enfatizam a importância da endotoxina liberada pelas bactérias Gram-negativas, sendo fator importante nas doenças pulpare e periapicais.

Estudos têm sugerido que as endotoxinas representam um dos principais fatores etiológicos envolvidos nas patologias pulpare e periapicais. Horiba et al. (1991) indicaram uma correlação positiva entre a quantidade de endotoxina e sinais e sintomas clínicos e presença de área radiolúcida. Evidenciaram ainda que dentes com grande quantidade de endotoxinas podem estar associados com o aumento da doença periapical. Esta correlação positiva tem sido encontrada em estudo com endotoxina de *Fusobacterium nucleatum* inoculada em macacos, onde os autores sugerem que o LPS pode induzir a destruição óssea (Dahlén et al., 1981). Em um estudo em cães, foram inoculadas endotoxina de *Salmonella Minnesota* (Pitts et al., 1982) e de *E. coli* (Mattison et al., 1987; Nelson Filho et al., 2002) verificando que a endotoxina tem papel importante na inflamação periapical e reabsorção óssea. E ainda Dwyer et al. (1981) utilizando endotoxina de *E. coli* inoculada em dentes de gatos sugeriram que as endotoxinas tem função no início e na perpetuação de lesões periapicais inflamatórias em humanos.

Ainda quando endotoxina de *E. coli* foi inoculada em canais de dentes de cães, foram observadas extensivas áreas de reabsorção ativas, reabsorção do cimento apical, infiltrado inflamatório severo e radiograficamente presença de lesões periapicais, perda da integridade da lâmina dura e áreas circunscritas de reabsorção óssea periapical (Nelson Filho et al., 2002, Silva et al., 2004). Em humanos, Khabazz et al. (2000), verificaram a presença de endotoxinas em dentes portadores de lesões cariosas sintomáticas (pulpite reversível) ou não sintomáticas (pulpite irreversível), sendo que quantidades maiores de endotoxina foram detectadas na superfície das lesões cariosas e em dentes com sintomatologia. Estes mesmos autores, em 2001, relacionaram a presença de endotoxinas como fator principal na patogênese de doenças pulpares. Jacinto et al. (2006), e Martinho e Gomes (2008), verificaram que a endotoxina está presente em altas concentrações em canais radiculares de dentes sintomáticos e que há uma relação positiva entre a concentração de endotoxina no canal radicular e a presença de sinais e sintomas. A atividade endotóxica em dentes com necrose pulpar está relacionada diretamente à presença e a quantidade de bactérias Gram-negativas presentes no sistema de canais radiculares (Dhalén e Bergenholtz, 1980; Yamazaki et al., 1992).

Em relação à difusão da endotoxina em túbulos dentinários, Nissan et al. (1995) verificaram que a endotoxina é capaz de penetrar 0,5 mm de dentina em um curto período de tempo que pode variar de 15 min a 4½ h. Oliveira et al. (2005) verificaram que a endotoxina é capaz de se difundir pelos túbulos dentinários em direção ao cimento, atingindo a região externa da raiz após 24 h.

Para avaliação de soluções irrigadoras e medicações intracanaís sobre endotoxinas, estudos *in vitro* têm utilizado endotoxina de *E. coli* (Haight-Ponce et al., 1999), associada ou não ao hidróxido de cálcio para verificar produção de prostaglandinas E₂ (Safavi; Nichols,

1994) e liberação de TNF- α (Barthel et al., 1997). Endotoxina de *E. coli* também tem sido utilizado em estudos *in vivo* para verificar indução de lesão periapical e ação de soluções irrigadoras e medicação intracanal sobre endotoxinas em dentes de cães (Nelson Filho et al., 2002, Silva et al., 2004). Mattison et al. (1987) comparam o efeito da endotoxina de *Eikenella corrodens* e de *E. coli* na região periapical de dentes de cães e verificaram que ambas bactérias induziram de forma semelhante extensiva reabsorção óssea, reabsorção radicular externa e presença de infiltrado inflamatório intenso. Quantidades elevadas de endotoxina foram encontradas após contaminação com suspensão padronizada a 10^6 células/ml de *E. coli* por 28 dias (Aguiar, 2009).

Vianna et al. (2007) sugerem que durante o tratamento endodôntico, o preparo biomecânico é o principal responsável pela maior redução da quantidade de microrganismos (99,96%) e endotoxinas (44,4%), sendo que após a utilização de medicação intracanal, houve uma redução de apenas 1,4% de endotoxinas. Os autores citaram que mesmo com a eliminação das bactérias, a quantidade de endotoxinas após a instrumentação estava alta. Dessa forma, é necessário o estudo de medicações intracanaís utilizadas durante a terapia endodôntica que possam neutralizar estas substâncias flogísticas.

Para quantificar endotoxinas de canais radiculares, tanto nos trabalhos *in vitro* como *in vivo*, após a coleta dos canais radiculares, estes conteúdos são levados em contato com o Lisado de amebócito de *Limulus* (LAL). O lisado é preparado a partir do amebócito circulante do caranguejo ferradura *Limulus polyphemus*, que, quando exposto a quantidade pequena de endotoxinas, aumenta sua opacidade bem como sua viscosidade, tornando-se um gel duro (Levin; Bang, 1968).

O uso do LAL envolvido na detecção de endotoxinas bacterianas foi observado inicialmente por Bang (1956) através de uma infecção por bactérias Gram-negativas no caranguejo *Limulus polyphemus* que resultou em uma coagulação intravascular fatal. Mais tarde, Levin e Bang (1968) demonstraram que esta coagulação foi o resultado de uma reação enzimática entre a endotoxina e uma proteína coagulável presente nos amebócitos circulantes do *Limulus*. Seguindo o desenvolvimento de um anticoagulante adequado para o sangue do *Limulus*, os autores prepararam um lisado do amebócito que foi um indicador extremamente sensível à presença de endotoxina.

Assim, pelo método do LAL, a endotoxina 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 nanometro (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 da curva-padrão contendo quantidades conhecidas de endotoxina. Neste teste, o leitor cinético acoplado a um microcomputador com *software* Wink QCL específico (Cambrex)*, realiza o gerenciamento, calculando automaticamente os parâmetros da curva-padrão e os valores da quantidade de endotoxinas, emitindo estes valores em relatórios que poderão ser impressos.

* Cambrex Bio Ciência Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil

2.3 Medicações intracanaais: hidróxido de cálcio e clorexidina sobre microrganismos e endotoxinas

A utilização de soluções irrigadoras como hipoclorito de sódio em concentrações 1%, 2% e 2,5%, e da clorexidina gel 2% durante a instrumentação de canais radiculares, *in vitro* e *in vivo*, não é capaz de eliminar completamente os microrganismos dos canais radiculares (Salvia et al., 2007; Blome et al., 2008; Martinho; Gomes, 2008; Gomes et al., 2008; Valera et al., 2009). Sabendo-se que o preparo biomecânico associado à utilização de soluções irrigadoras pode apenas reduzir a quantidade de microrganismos e que estes podem estar protegidos em biofilmes microbianos em crateras de reabsorção, áreas estas inacessíveis ao preparo biomecânico, justifica-se a necessidade de uma conduta terapêutica no sentido de sua eliminação representada pela utilização de medicações intracanaais entre sessões durante a terapia endodôntica.

O hidróxido de cálcio tem sido amplamente utilizado como medicação intracanal em Endodontia devido às suas propriedades antimicrobianas (Bystrom et al., 1985; Sjogren et al., 1991; Siqueira e Lopes, 1999), capacidade de induzir a mineralização (Leonardo et al., 2002) e principalmente tem demonstrado efetiva ação sobre LPS (Safavi; Nichols, 1993; Safavi; Nichols, 1994; Nelson Filho et al., 2002; Silva et al., 2002; Tanomaru et al., 2003; Leonardo et al., 2004; Oliveira et al., 2005; Maekawa et al., 2010).

Segundo Siqueira e Lopes (1999), a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio é devido à liberação de íons hidroxila em um meio aquoso. Estes íons são capazes de induzir a peroxidação lipídica, resultando na destruição dos fosfolípídeos, os quais são componentes estruturais da membrana celular dos microrganismos.

Além disto, o metabolismo celular destes microrganismos é dependente da atividade enzimática, sendo que em menores valores de pH, as enzimas têm ótima atividade e estabilidade. A manutenção de um pH alcalino pelo hidróxido de cálcio faz com que ocorra uma quebra da união iônica e alteração da estrutura das proteínas da membrana celular. Estas alterações resultam na perda da atividade biológica das enzimas e rompimento do metabolismo celular.

Bystrom et al. (1985) afirmam que a efetividade da ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio depende da concentração de íons hidroxila. Se os íons hidroxila são consumidos por reação envolvendo bactérias, a dissolução destes íons irá continuar para manter este balanço e mais íons hidroxila serão dissociados. Um consumo de íons cálcio pela formação de compostos como o fosfato, carbonato ou íons sulfato disponíveis no tecido apical também irá resultar na liberação de íons hidroxila.

Apesar do hidróxido de cálcio apresentar atividade antimicrobiana, muitos estudos têm verificado que *E. faecalis* é resistente ao hidróxido de cálcio (Bystrom et al., 1985; Haapasalo; Orstavik, 1987; Orstavik; Haapasalo, 1990; Siqueira et al., 1996; Sirén et al., 1997; Blome et al., 2008). Além de *E. faecalis*, várias espécies de *Candida*, principalmente *C. albicans*, também têm mostrado ser resistentes a essa medicação, o que pode explicar a identificação de leveduras em casos de periodontite apical persistente (Waltimo et al., 1999; Valera et al., 1999; Valera et al., 2010).

Devido à presença de uma bomba de prótons em sua parede celular, *E. faecalis* têm mostrado resistência ao hidróxido de cálcio em pH igual ou menor que 11,1. Esta bomba de prótons tem a capacidade de acidificar o citoplasma, fazendo com que este microrganismo sobreviva mesmo em pH alcalino (Evans et al., 2002).

Entretanto, quando o pH alcança valores iguais ou maiores que 11,5, não há a ativação desta bomba de prótons, ocorrendo assim a morte do microrganismo (McHugh et al., 2004). Além disto, Tronstad et al. (1981) verificaram o pH de várias áreas da dentina após a medicação com hidróxido de cálcio, verificando que o pH dentro do canal radicular se manteve entre 10 a 12,2; na dentina circumpulpar, entre 8 a 11,1; e na dentina periférica, entre 7,4 para 9,6. Assim, devido aos valores do pH permanecerem abaixo do limiar para eliminar *E. faecalis*, este microrganismo pode persistir nos túbulos dentinários e causar reinfecção do canal radicular.

Outro mecanismo de resistência do *E. faecalis* ao hidróxido de cálcio pode ser devido a pouca difusão de íons hidroxila para o interior dos túbulos dentinários ou efeito tampão que a dentina exerce sobre o hidróxido de cálcio (Haapasalo et al., 2000). No entanto, sugerem que mais estudos são necessários para o melhor entendimento da interação entre o hidróxido de cálcio e dentina e Enterococcus-dentina-hidróxido de cálcio.

A maioria das substâncias utilizadas como veículo para o hidróxido de cálcio não possuem atividade antimicrobiana, como a água destilada, solução salina, solução anestésica, glicerina e propilenoglicol. Recentemente, a clorexidina tem sido utilizada como substância química auxiliar ao preparo biomecânico com resultados satisfatórios devido à sua biocompatibilidade (Tanomaru et al., 2002; Semenoff et al., 2008), atividade antimicrobiana com amplo espectro de ação (Ferraz et al., 2001; Ferreira et al., 2002; Dametto et al., 2005; Ercan et al., 2006; Gomes et al., 2009; Valera et al., 2009) e efeito residual que varia de 48 h, 72 h até 7 dias (White et al., 1997; Leonardo et al., 1999; Komorowski et al., 2000; Weber et al., 2003).

A atividade antimicrobiana da clorexidina se deve a sua natureza catiônica que promove aderência ao composto aniônico da superfície microbiana, capaz de alterar a integridade de sua membrana plasmática, modificando sua permeabilidade, promovendo a precipitação das proteínas citoplasmáticas e alterando o balanço osmótico, além de modificar o metabolismo, crescimento e divisão da célula (Ferraz et al, 2001). Por outro lado, as moléculas da clorexidina carregadas positivamente também interagem, por adsorção, na superfície dentinária por algum tempo (Basrani et al., 2002). Este efeito antimicrobiano da clorexidina após o tempo da sua utilização é chamado de substantividade da atividade antimicrobiana ou efeito residual. Komorowski et al. (2000) demonstraram a dependência do efeito residual em função da concentração da clorexidina. Assim, devido ao efeito residual depender da quantidade de moléculas viáveis para interagir com a dentina, medicar o canal radicular com a clorexidina mais concentrada pode resultar em um aumento da resistência a colonização microbiana.

Estudos para a avaliação da biocompatibilidade da clorexidina foram realizados. Semenoff et al. (2008) avaliaram a biocompatibilidade da clorexidina em tecido submucoso bucal de ratos. Os autores verificaram que a clorexidina foi capaz de diminuir a severidade da reação inflamatória, sendo semelhante ao hidróxido de cálcio. Tanomaru et al. (2002) estudaram a resposta inflamatória de soluções irrigadoras, hipoclorito de sódio a 0,5% e clorexidina 2%, injetadas na cavidade peritoneal de ratos e concluíram que o hipoclorito de sódio foi capaz de induzir reações irritativas nos tecidos e respostas inflamatórias severas, enquanto que a clorexidina não induziu uma resposta inflamatória significativa, sendo biocompatível aos tecidos.

Devido às propriedades da clorexidina, citadas acima, estudos têm sugerido a sua utilização associada ao hidróxido de cálcio como medicação intracanal para adicionar propriedades antimicrobianas

ao hidróxido de cálcio, obtendo-se assim um efeito sinérgico entre as duas medicações (Evans et al., 2003; Sirén et al., 2004; Gomes et al., 2006; Gomes et al., 2009).

A atividade antimicrobiana da associação hidróxido de cálcio e clorexidina sobre *C. albicans* e *E. faecalis* tem sido verificada em diversos estudos (Sirén et al., 2004; Ercan et al., 2006; Gomes et al., 2006; Souza-Filho et al., 2008; Gomes et al., 2009; Valera et al., 2009). Esta associação tem mostrado ser estatisticamente mais efetiva sobre *E. faecalis* e *C. albicans* do que a pasta de hidróxido de cálcio utilizada sozinha (Evans et al., 2003; Al-Nazhan; Al-Obaida, 2008). Entretanto, Ballal et al. (2007) sugerem que em dentes tratados endodonticamente sem sucesso, a clorexidina gel 2% pode ser mais efetiva como medicação intracanal do que a pasta de hidróxido de cálcio ou sua combinação sobre *C. albicans* e *E. faecalis*.

A clorexidina utilizada isoladamente ou associada ao hidróxido de cálcio é capaz de se difundir nos túbulos dentinários e alcançar a superfície externa da raiz, na presença ou ausência de cimento, exercendo assim sua ação antimicrobiana (Gomes et al., 2009). Além disto, a presença do hidróxido de cálcio nesta associação permite a formação de uma barreira física estável, a qual poderá permanecer no canal radicular por um longo período, diminuindo assim a possibilidade de recontaminação (Souza-Filho et al., 2008).

Uma avaliação comparativa da tensão superficial e pH do hidróxido de cálcio associado a cinco veículos (água destilada, solução salina, solução anestésica, clorexidina e glicerina) foi realizada por Poorni et al. (2009). Entre os veículos individuais, foi verificado que a clorexidina possui o menor valor de tensão superficial. Entre as associações com hidróxido de cálcio, foi verificado que hidróxido de cálcio com clorexidina apresentou os menores valores de tensão superficial. O pH de todos os

veículos foram considerados ácidos (pH 5 a 6,5). Entretanto, quando associados ao hidróxido de cálcio (pH 11,5), foram considerados alcalinos (pH 9 a 11,5). Assim, os autores concluíram que a clorexidina foi o melhor veículo para o hidróxido de cálcio quando utilizado como medicação intracanal. Outros autores (Haenni et al., 2003; Souza Filho et al., 2008) também verificaram a manutenção do pH alcalino nesta associação.

A manutenção do alto pH quando o hidróxido de cálcio é associado à clorexidina é importante, pois a maioria das bactérias presentes no sistema de canais radiculares se desenvolvem em um pH entre 6,5 a 7,5, e a maioria dos microrganismos são destruídos em um pH 9,5, entretanto, uma minoria pode sobreviver em pH 11 ou maior. Além disto, o alto pH pode neutralizar os ácidos secretados pelos osteoclastos e assim ajudar a prevenir mais adiante a destruição de tecidos mineralizados (Souza-Filho et al., 2008).

Além da manutenção do pH, a adição de clorexidina ao hidróxido de cálcio faz com que ocorra uma diminuição do ângulo de contato entre a medicação e a superfície dentinária, aumentando o umedecimento e reduzindo a tensão superficial da medicação no interior do canal radicular (Basrani et al., 2004).

Estudos têm mostrado que a atividade antimicrobiana da clorexidina em combinação com o hidróxido de cálcio pode ser um benefício no tratamento de certos tipos de infecções persistentes primárias e particularmente em casos de retratamento onde *E. faecalis* é o microrganismo mais comumente isolado (Molander et al., 1998; Sirén et al., 2004; Zerella et al., 2005). Ainda Podbielski et al. (2003) verificaram um efeito sinérgico entre estes medicamentos quando utilizado sobre *E. faecalis* e concluíram que o hidróxido de cálcio não altera a solubilidade e a atividade da clorexidina. Soares et al. (2006) verificou em dentes de cães uma redução significativa da microrganismos do canal radicular,

tanto quanto na incidência dos biofilmes periapicais quando esta associação foi utilizada por 21 dias como medicação intracanal.

Um estudo realizado por Valera et al. (2009) avaliou a atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio associado a medicações intracanaís (hidróxido de cálcio, clorexidina gel 2%, associação hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2%) sobre *C. albicans* e *E. faecalis* inoculados em canais radiculares. Os autores verificaram que todas as medicações intracanaís testadas foram capazes de produzir uma diminuição significativa no número de microrganismos, entretanto, somente a associação Ca(OH)_2 e clorexidina foi capaz de eliminar completamente os microrganismos.

Estudos como de Semenoff et al. (2008) para avaliar a biocompatibilidade da clorexidina, do hidróxido de cálcio e da associação de ambos em tecido submucoso bucal de ratos foram realizados. Os autores verificaram que a associação hidróxido de cálcio e clorexidina foi capaz de diminuir significativamente a severidade da reação inflamatória causada pela agressão sofrida durante o processo cirúrgico inicial em tecido submucoso bucal de ratos durante o período do experimento, sendo semelhante à clorexidina e ao hidróxido de cálcio avaliados isoladamente (Semenoff et al., 2008).

Em relação ao período da ação de medicação intracanal, estudos têm verificado que o período necessário e ideal para o hidróxido de cálcio difundir-se pelos túbulos dentinários e desta forma exercer a sua função como medicação intracanal é de 15 a 30 dias (Nerwich et al., 1993; Takahashi et al., 1996; Leonardo et al., 2002).

Em relação à medicação intracanal sobre endotoxinas, estudos *in vitro* verificaram que o hidróxido de cálcio é capaz de hidrolizar o lipídeo A do LPS, resultando na liberação elevada de ácidos graxos livres (Safavi; Nichols, 1993). Em 1994, estes mesmos autores

investigaram se o hidróxido de cálcio é capaz de alterar as propriedades biológicas da endotoxina bacteriana medindo a produção de prostaglandinas E_2 pelos monócitos humanos. Esta produção foi identificada nos sobrenadantes de monócitos estimulados pelo LPS, entretanto não foi identificada naqueles que foram tratados previamente com hidróxido de cálcio. Esses experimentos sugeriram que a ação biológica do LPS requer a presença de ácidos graxos hidroxilados ligados a junção éster e estas ligações são rompidas pelo tratamento com o hidróxido de cálcio.

Estudo realizado por Barthel et al. (1997) avaliaram a capacidade do hidróxido de cálcio em neutralizar endotoxinas de *E. coli* pela liberação de fator de necrose tumoral- α (TNF- α). Verificaram que o hidróxido de cálcio é capaz de eliminar a capacidade do LPS de induzir a produção de TNF- α . Já Olsen et al. (1999) observaram a redução na produção de interleucina-1 β quando o LPS de *Pseudomonas aeruginosa* foi tratado com hidróxido de cálcio em todos os períodos de tempo.

Jiang et al. (2003) verificaram que o LPS age diretamente na estimulação de osteoclastos e que o hidróxido de cálcio inibe de forma significativa a capacidade do LPS em estimular a formação de osteoclastos. Além de neutralizar as endotoxinas, o hidróxido de cálcio é capaz de desnaturar os mediadores inflamatórios responsáveis pela patogênese da periodontite periapical, como a interleucina-1 α (IL-1 α) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (Khan et al., 2008).

Em estudo em cães, Nelson Filho et al. (2002) e Silva et al. (2002), verificaram que a endotoxina causa lesão periapical visível radiograficamente, entretanto quando associada ao hidróxido de cálcio, esta endotoxina fica desprovida de ação tóxica. Tanomaru et al. (2003), verificaram que o preparo biomecânico com as soluções de hipoclorito de sódio e clorexidina não foi capaz de inativar os efeitos da endotoxina,

entretanto quando foi utilizado o hidróxido de cálcio como medicação intracanal, este foi capaz de inativar os efeitos induzidos pela endotoxina.

A associação hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2% tem mostrado efetividade sobre endotoxinas nos canais radiculares. Estudos *in vitro* realizado por Maekawa et al. (2008), Maekawa et al. (2010), Valera et al. (2010) avaliando as substâncias químicas auxiliares ao preparo biomecânico e medicações intracanaís, verificaram que esta associação foi capaz de reduzir significativamente as endotoxinas presentes nos canais radiculares, sendo estatisticamente semelhante à pasta de hidróxido de cálcio. No entanto, estudo *in vivo* de Vianna et al. (2007) utilizando clorexidina gel 2% como substância química auxiliar ao preparo biomecânico e medicações intracanaís à base de hidróxido de cálcio, verificaram que, mesmo após a utilização da medicação intracanal por 7 dias, os valores da quantidade de endotoxinas presentes no canais radiculares ainda continuavam relativamente altos.

2.4 Própolis

As abelhas coletam resinas e exsudatos de plantas e adicionam secreção, fragmentos, pólen e cera. O produto assim obtido pelas abelhas é chamado de própolis. A própria palavra de origem grega é a combinação de Pro = defesa e polis = cidade, que combinadas significam algo que defende a cidade, sendo que a cidade se refere à colméia da abelha. Deste modo, acredita-se que as abelhas utilizam a própolis para defender a vida, preservando a temperatura da sua moradia, impedindo a entrada de agentes estranhos e, em certos casos, impedindo a propagação de agentes epidemiológicos (Burdock, 1998).

A composição da própolis depende da flora da região onde é produzida, podendo variar sua coloração de amarelo-esverdeado até marrom escuro. No entanto, em geral, a própolis é composta por 50% de resina, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de várias outras substâncias, incluindo debris orgânicos (Burdock, 1998). Possui uma composição química complexa, sendo que mais de 200 constituintes já foram identificados. Alguns autores atribuem aos flavonóides à maior capacidade de atuarem como agentes antimicrobianos (Grange e Davey, 1990; Burdock, 1998; Koo et al., 2000).

O extrato de própolis apresenta atividades antiinflamatórias, analgésicas e antimicrobianas (Grange; Davey, 1990; Paulino et al., 1996; Burdock, 1998; Koo et al., 2000; Lotufo et al., 2005; Silva et al., 2004). Martin; Pileggi (2004) verificaram que o extrato alcoólico de própolis a 50% e 100% obtiveram melhores resultados na manutenção da viabilidade das células do ligamento periodontal quando comparados com solução salina balanceada de Hanks, leite e solução salina. A solução de própolis em propilenoglicol tem sido utilizada como terapia das úlceras aftosas recorrentes não apresentando efeitos adversos, sendo benéfica no tratamento de úlceras aftosas recorrentes (Lotufo et al., 2005). Estudos em capeamento direto da polpa utilizando os flavonóides extraídos da própolis mostraram que estes podem postergar a inflamação pulpar e estimular a reparação da dentina, com formação de ponte dentinária parcial em um período de 4 semanas (Sabir et al., 2005).

Vários autores demonstraram que o extrato própolis apresenta atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* (Koo et al., 2000; Grange; Davey, 1990; Park et al., 1998). Koo et al. (2000) avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato alcoólico da própolis sobre vários microrganismos envolvidos na formação da cárie dental e em doenças periodontais e endodônticas pelo teste de difusão em ágar e observaram que o extrato de própolis foi efetivo contra todos os

microrganismos testados, sendo que *C. albicans* apresentou o menor halo de inibição. Estes autores sugerem que a própolis pode prevenir a cárie dental e a doença periodontal, pois a própolis demonstrou atividade antimicrobiana significativa sobre os microrganismos envolvidos nestas doenças e, especialmente, inibição da formação da placa dental *in vitro*.

A efetividade da própolis (extrato alcoólico) sobre *E. faecalis* também foi observada por Koo et al. (2000) e Ferreira et al. (2007). Onçag et al. (2006) verificaram a efetividade do extrato de própolis como medicação intracanal (durante 10 dias) sobre *E. faecalis* inoculados por 7 dias em canais radiculares, sugerindo que esta pode ser uma medicação intracanal alternativa. Awawdeh et al. (2008) compararam a atividade antimicrobiana da própolis (solução aquosa a 30%) e da pasta de hidróxido de cálcio como medicação intracanal sobre *E. faecalis*. Estes autores verificaram que a própolis foi significativamente mais efetiva que o hidróxido de cálcio após pequeno tempo de exposição (1 e 2 dias).

A própolis também tem demonstrado atividade antimicrobiana sobre bactérias anaeróbias comumente isoladas de canais radiculares como *Prevotella nigrescens* e *Fusobacterium nucleatum* (Ferreira et al., 2007). Apesar de vários autores verificarem que a própolis possui atividade antimicrobiana, o real mecanismo da ação antimicrobiana parece ser complexa e ainda não é completamente entendida (Koo et al., 2000).

Almeida et al. (2006) verificaram a ação da solução do extrato alcoólico da própolis 6,25% sobre *S. mutans*, concluindo que esta solução apresenta satisfatória atividade antimicrobiana com comportamento semelhante ao da clorexidina 0,12%, além de atuar sobre condições clínicas como a presença de biofilme oral e doença gengival, podendo ser empregado como agente terapêutico.

A atividade antifúngica dos extratos de própolis, mamona, sálvia e calêndula sobre 20 cepas isoladas de clinicamente de *C. albicans* foi avaliada por Molina et al. (2008). Os autores verificaram que o extrato de própolis foi o mais efetivo, apresentando atividade antifúngica para todas as cepas de *C. albicans* avaliadas. Em um estudo realizado também por Molina (2008) avaliou o extrato glicólico de própolis como solução irrigadora durante a instrumentação de canais radiculares, verificando que este extrato mostrou atividade antimicrobiana sobre *C. albicans*, *E. faecalis* e *E. coli* com efeito residual por sete dias, com resultados semelhantes à solução de clorexidina 2%. Entretanto, este extrato não apresentou redução significativa da quantidade de endotoxinas presentes nos canais radiculares.

Valera et al. (2010) avaliaram a ação do extrato glicólico de própolis como solução irrigadora durante a instrumentação de canais radiculares inoculados com *E. coli* e sobre endotoxinas. Os autores verificaram que o preparo biomecânico realizado com extrato de própolis foi capaz de eliminar completamente *E. coli* e reduzir a quantidade de endotoxinas dos canais radiculares.

Estudos têm utilizado a própolis associada ao hidróxido de cálcio para verificação da atividade antimicrobiana. Rezende et al. (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana desta associação e verificaram que esta, *in vitro*, foi mais efetiva que o hidróxido de cálcio e propilenoglicol no controle de infecções dentárias em dentes primários. Estes autores sugerem que esta associação poderia agregar todos os benefícios de cada um, resultando em uma escolha do melhor tratamento para doenças pulpares em dentes primários. Entretanto, resultados controversos foram encontrados por Sanchez-Ayala et al. (2008), que verificaram pelo método de difusão em ágar, que esta associação foi menos efetiva que a pasta hidróxido de cálcio e solução fisiológica tanto sobre bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas. Estes autores

sugerem ainda estudos posteriores para verificar se a característica resinosa da própolis pode ter dificultado a difusão e consequentemente ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio.

Em relação à citotoxicidade da própolis, Lotufo (2003) verificou que a solução de própolis em propilenoglicol é biocompatível, não afetando ou impedindo o crescimento e a viabilidade celular dos fibroblastos da mucosa bucal humana. Al-Shaher et al. (2004) compararam a citotoxicidade da própolis e do hidróxido de cálcio separadamente em fibroblastos do ligamento periodontal e da polpa. Os autores verificaram que em concentrações similares, o hidróxido de cálcio foi extremamente tóxico, sendo 10 vezes mais citotóxico que a própolis em ambos os fibroblastos. Assim, os autores sugeriram que a própolis pode ser uma alternativa viável como medicação intracanal por causa da sua baixa citotoxicidade. Entretanto, em altas concentrações, a própolis pode ser citotóxica aos fibroblastos de ratos como relatado em estudo de Funari et al. (2007). Estes autores sugeriram que a toxicidade da própolis depende diretamente da sua concentração. Outro estudo comparando a biocompatibilidade da própolis com *Casearia sylvestris*, Otosporin e solução salina em tecido subcutâneo de ratos machos da linhagem Wistar foi realizado por Silva et al. (2004), que verificaram que a própolis foi a medicação que apresentou menor potencial irritativo e foi a mais efetiva na redução do exsudato inflamatório agudo. Os autores sugerem ainda a aplicação destes produtos naturais como uma alternativa para o tratamento endodôntico.

Com base na literatura apresentada pode-se verificar que o extrato de própolis apresenta várias qualidades como ação antiinflamatória, analgésica e antimicrobiana, além de apresentar baixa citotoxicidade que são desejáveis em uma medicação intracanal.

2.5 Gengibre

O *Zingiber officinale* (gengibre) sempre foi apreciado desde os tempos mais antigos, sendo largamente empregado como especiaria, em bebidas alcoólicas e na medicina popular (Grégio et al., 2006). É utilizado também extensivamente na medicina tradicional chinesa para tratar dores de cabeça, náusea e febre como também artrite, reumatismos, dores musculares (Ojewole, 2006; Ali et al., 2008). Os princípios ativos do gengibre são os gingeróis e os shogaóis, sendo o gingerol o principal componente biologicamente ativo responsável pelas propriedades antiinflamatórias e analgésicas do gengibre (Ojewole, 2006; Zhou et al., 2006; Aimbire et al., 2007, Ali et al., 2008). Analisando os compostos ativos do gengibre, Lantz et al. (2007) verificaram que o gingerol e o shogaol foram capazes de inibir significativamente a produção de prostaglandinas E_2 induzidas pelo LPS de *E. coli*. Os extratos contendo principalmente gingerol tiveram a capacidade de inibir a produção de COX-2, enquanto que os extratos contendo shogaol não tiveram efeito sobre a COX-2.

Zhou et al. (2005) verificaram que o óleo essencial de gengibre foi capaz de inibir a secreção de IL-1 β pelos macrófagos de ratos, podendo exercer efeitos benéficos em várias condições clínicas, como uma inflamação crônica e doenças autoimunes. Segundo Ali et al. (2008) o gengibre é uma substância antioxidante forte podendo diminuir ou impedir a geração de radicais livres. Considera-se que é uma planta medicinal segura, com poucos e insignificantes efeitos adversos.

Em Odontologia, poucos estudos são relatados na literatura. Pereira et al. (2003) avaliaram o efeito do gengibre no processo de cicatrização de úlceras na mucosa bucal de ratos e verificaram que o gengibre, na sua forma de extrato aquoso, não possui efeitos

farmacológicos significativos, porém o seu extrato óleo resinoso é farmacologicamente ativo, promovendo a cicatrização das áreas ulceradas.

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

Além destas propriedades, o gengibre tem mostrado também atividade antimicrobiana e cicatrizante (Pereira et al., 2006; Grégio et al., 2006). Devido a estas propriedades benéficas, recentemente, o gengibre tem ganhado atenção e reputação internacional considerável como suplemento natural no mundo inteiro. Popularmente, o gengibre vem sendo empregado associado a outras substâncias naturais como mel, própolis ou romã em soluções ou *sprays* utilizados na cavidade oral, sendo indicado para amigdalites, tosses e halitose.

Avaliando a atividade antimicrobiana do gengibre sobre três bactérias Gram-negativas aneróbias, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* e *Prevotella intermedia*, causadoras da doença periodontal, Park et al. (2008), concluíram que apenas dois componentes do gengibre, [10]-gingerol e [12]-gingerol, são capazes de eliminar e inibir efetivamente o crescimento dos microrganismos testados.

O gengibre também apresentou atividade antimicrobiana contra *E. coli* em um estudo realizado por Indu et al. (2007).

A atividade antimicrobiana do extrato glicólico de gengibre 10% sobre 24 cepas clínicas e amostra-padrão de *C. albicans* foi avaliada por Caires et al. (2008). Os autores verificaram que este extrato apresentou atividade fungicida a partir da concentração de 12,5% (DFM) e DIM (diluição inibitória mínima) de 6,25%, concluindo que a atividade deste extrato mostrou-se dependente de sua concentração.

Shygei et al. (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana das seguintes soluções irrigadoras: hipoclorito de sódio 2,5%, clorexidina gel 2%, extrato da mamona, extrato glicólico de gengibre 10%, extrato glicólico de Aloe vera, sobre *C. albicans* e *E. faecalis* inoculados em canais radiculares. Os autores concluíram que o hipoclorito de sódio e a clorexidina gel foram as substâncias mais efetivas, seguido do extrato da mamona e do extrato de gengibre.

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

Com base na literatura apresentada pode-se verificar que o gengibre apresenta propriedades benéficas como ação antiinflamatória, analgésica e antimicrobiana; estas propriedades são desejáveis para uma medicação intracanal, justificando assim a importância dos estudos com este produto.

3 PROPOSIÇÃO

A proposta deste trabalho foi avaliar:

- Se os extratos glicólicos de própolis e de *Zingiber officinale*, hidróxido de cálcio, clorexidina gel e associações são efetivos, como medicação intracanal, sobre *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*;
- Se estas medicações intracanaís são efetivas sobre endotoxinas de *Escherichia coli*.

4 MATERIAL E MÉTODO

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, protocolo nº 06/2008-PH/CEP (Anexo A).

4.1 Preparo dos espécimes

Foram utilizados 96 dentes humanos unirradiculados recém-extraídos de consultórios particulares que, após a exodontia foram limpos e imersos em solução fisiológica até o momento do uso. A seleção dos dentes foi feita baseada nas dimensões e similaridade morfológica da raiz. As coroas foram seccionadas com disco de carborundum, padronizando o comprimento dos espécimes em $16\pm0,5$ mm (Figura 1).

A instrumentação inicial dos canais radiculares foi realizada em toda a sua extensão, desde seu diâmetro anatômico, da lima tipo K15 (Dentsply Indústria e Comércio Ltda., Petrópolis, RJ, Brasil) até a lima tipo K30 (Figura 1); irrigando com 3 ml de solução de cloreto de sódio 0,9% (soro fisiológico) a cada troca de instrumento. Após o preparo, os canais foram preenchidos com EDTA (Inodon, Porto Alegre, RS, Brasil) por 3 minutos e irrigados com 10 ml de soro fisiológico.

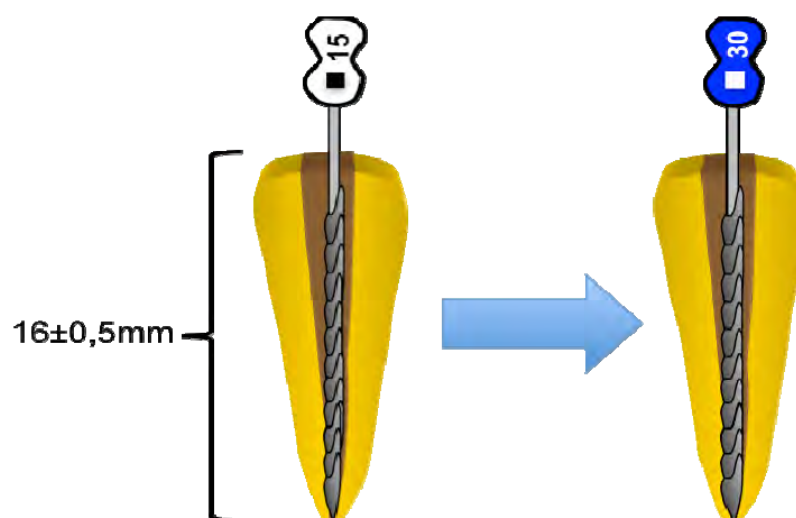


Figura 1 – Preparo inicial dos espécimes: padronização do comprimento das raízes e sequência da instrumentação inicial.

Em seguida, foi realizado condicionamento ácido com ácido fosfórico a 37% (Vigodent SA Indústria e Comércio, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), aplicação de adesivo (3M ESPE, Dental Products, Saint Paul, USA) e vedamento da região apical dos dentes com resina composta fotopolimerizável Z-100. A fotopolimerização foi realizada durante 40 segundos (3M ESPE, Dental Products, Saint Paul, USA) e as raízes impermeabilizadas externamente com uma camada de adesivo epóxi (Brascola, São Paulo, SP, Brasil), exceto a região da abertura cervical (Figura 2).

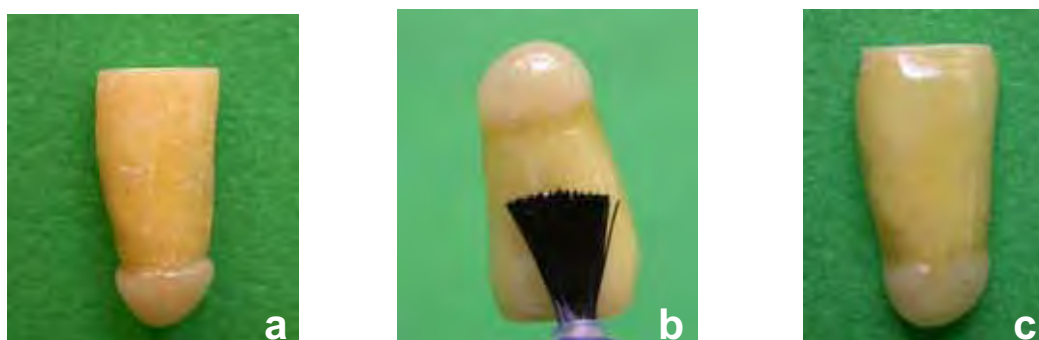


Figura 2 – Impermeabilização das raízes: a) selamento do ápice; b) impermeabilização externa com resina epóxi; c) raiz após impermeabilização externa.

Os espécimes foram distribuídos aleatoriamente em placas de cultura celular de 24 poços (Costar, New York, NY, USA), com 12 dentes em cada e fixados com resina acrílica quimicamente ativada (Dencor Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 3). As placas foram tampadas e embaladas. Estas placas e todos os materiais utilizados foram esterilizados por radiação gama com cobalto 60 (20 KGy por 6 h) para neutralizar endotoxinas pré-existentes (Csako et al., 1983). Esta esterilização foi realizada pela EMBRARAD (Empresa Brasileira de Radiação, Cotia, SP, Brasil).



Figura 3 – Raízes incluídas com resina acrílica na placa de cultura de células: a) distribuição dos 12 espécimes na placa; b) detalhe dos dentes incluídos.

4.2 Contaminação dos espécimes

Os microrganismos utilizados foram *Candida albicans* (ATCC 18804), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Inicialmente, para verificação da pureza das cepas, foram utilizados meios seletivos para crescimento de cada microrganismo, foi realizada coloração de Gram e avaliação microscópica. Após esta verificação, os microrganismos foram semeados em placas de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) para *C. albicans*, placas contendo ágar infusão de cérebro e

coração (BHI Agar) (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) para *E. faecalis* e *E. coli*. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa microbiológica a $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 h (*C. albicans* e *E. coli*) e 48 h (*E. faecalis*) (Figura 4). A partir do crescimento nas placas, foram preparadas suspensões em soro fisiológico estéril e apirogênico (Segmenta, Ribeirão Preto, SP, Brasil) contendo 10^6 céls/ml comprovadas pela leitura em espectrofotômetro (modelo B-582, Micronal S/A, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 5) (Quadro 1).



Figura 4 – Placas de petri após a semeadura dos microrganismos para preparo das suspensões: a) *C. albicans* em ágar Sabouraud Dextrose; b) *E. faecalis* em ágar BHI; c) *E. coli* em ágar BHI.



Figura 5 – Espectrofotômetro utilizado para leitura das suspensões.

Quadro 1 – Descrição dos microrganismos, amostra-padrão, comprimento de onda, densidade óptica.

Microrganismo	Amostra-padrão	Comprimento de onda	Densidade óptica
<i>C. albicans</i>	ATCC 18804	530 nm	0,284
<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212	760 nm	0,298
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	590 nm	0,324

Em ambiente estéril (câmara de fluxo laminar) (VecoFlow Ltda. – Campinas, SP, Brasil), os canais radiculares foram contaminados com 10 microlitros (μ l) da suspensão de *E. coli* e 10 μ l de caldo infusão de cérebro e coração (BHI Broth) (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia). Na entrada dos canais foi colocada uma bolinha de algodão apirogênica embebida em caldo BHI. Em seis poços vazios da placa de 24 poços foi adicionado soro fisiológico. Os espécimes foram mantidos em estufa a $37^{\circ}\pm 1^{\circ}$ C, por 7 dias, sendo que a cada 2 dias, foi adicionado caldo BHI no interior dos canais radiculares (Menezes et al., 2004). Após 7 dias, foram adicionados aos canais radiculares 5 μ l da suspensão de *C. albicans*, 5 μ l da suspensão de *E. faecalis* e 10 μ l de caldo BHI. Na entrada dos canais foi colocada uma bolinha de algodão apirogênica embebida em caldo BHI. Os espécimes foram mantidos em estufa a $37^{\circ}\pm 1^{\circ}$ C, em umidade relativa, por 21 dias, sendo que a cada 2 dias, foi adicionado meio de cultura (caldo BHI) no interior dos canais radiculares até o preenchimento completo dos mesmos (15 a 20 μ l) com o auxílio de seringas tipo insulina de 1 ml (Injex Indústrias Cirúrgicas Ltda., Ourinhos, SP, Brasil).

Após 28 dias de incubação, foi realizada coleta de todos os espécimes para confirmação da contaminação dos canais radiculares (descrita no item 4.4).

Para avaliar o período necessário para contaminação da massa dentinária pelos microrganismos, foi realizado um estudo piloto.

Neste estudo, realizou-se a contaminação por 28 dias e avaliação dos espécimes por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) no Instituto de Pesquisas Espaciais (INPE – São José dos Campos, SP, Brasil) para verificar a penetração dos microrganismos nos túbulos dentinários. Observou-se penetração intensa dos microrganismos em toda a massa dentinária (Figura 6).

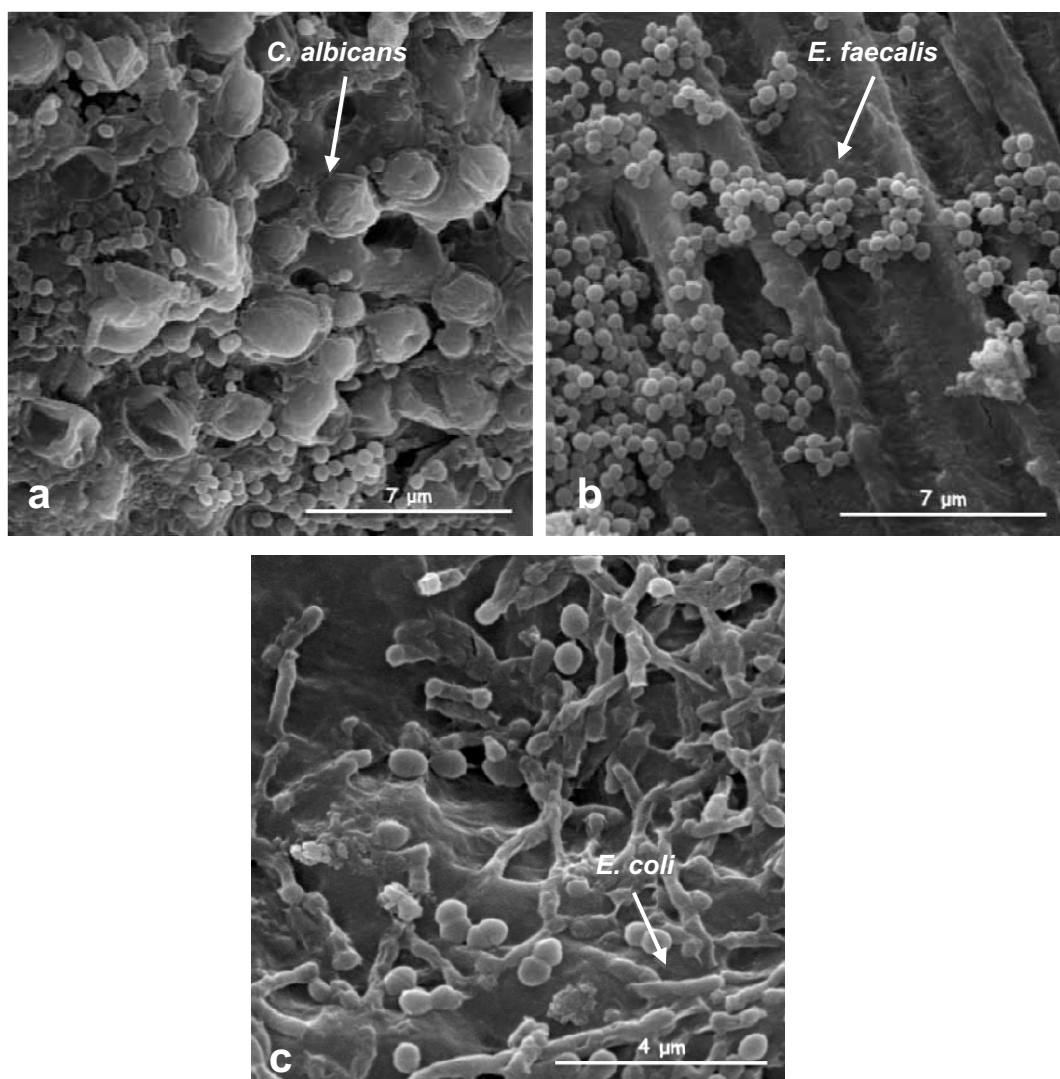


Figura 6 – Fotomicrografias em MEV dos espécimes para avaliação após 28 dias da contaminação a) microrganismos nas paredes do canal radicular: verifica-se predomínio de *E. faecalis* e *C. albicans* que dificultam a visualização de *E. coli* (aumento de 5000x); b) microrganismo dentro dos túbulos dentinários: verifica-se presença de *E. faecalis* em grande quantidade (aumento de 5000x); c) presença de *E. coli* (aumento de 10000x).

4.3 Divisão dos grupos experimentais

Após a confirmação da contaminação, todos os espécimes foram instrumentados, pela técnica convencional, até a lima tipo K50 utilizando-se 3 ml de soro fisiológico apirogênico a cada troca de instrumento, sendo a irrigação realizada com auxílio de agulhas (25X7) e seringas apirogênicas de 3 ml (Injex Indústrias Cirúrgicas Ltda., Ourinhos, SP, Brasil) e a aspiração realizada com bomba à vácuo (NSR, Indústria, Comércio e Representações Ltda.), intermediários e agulhas (40X12) (Nipro Medical Ltda., Sorocaba, SP, Brasil). Imediatamente após o preparo biomecânico foi realizada a 1ª coleta (Item 4.4).

Previamente à colocação das medicações intracaneais, foi utilizado EDTA durante 3 minutos, seguido da irrigação dos canais radiculares com 10 ml de solução soro fisiológico apirogênico. Em seguida, os espécimes foram divididos em 8 grupos experimentais (n=12), de acordo com a medicação intracanal utilizada (Quadro 2):

Quadro 2: Divisão dos grupos experimentais

Grupos	n	Medicação intracanal	Procedência
Ca(OH) ₂	12	Hidróxido de cálcio e soro fisiológico	Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda, Ibiporã, PR, Brasil
CLX	12	Clorexidina gel 2%	Byofórmula – Farmácia de Manipulação, São José dos Campos, SP, Brasil
Ca(OH) ₂ + CLX	12	Hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2%	Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda, Ibiporã, PR, Brasil Byofórmula – Farmácia de Manipulação, São José dos Campos, SP, Brasil
PRO	12	Extrato glicólico de própolis 12%	Apis Flora, Ribeirão Preto, SP, Brasil
PRO + Ca(OH) ₂	12	Hidróxido de cálcio e extrato glicólico de própolis 12%	Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda, Ibiporã, PR, Brasil Apis Flora, Ribeirão Preto, SP, Brasil
GENG	12	Extrato glicólico de gengibre 20%	Apis Flora, Ribeirão Preto, SP, Brasil
GENG + Ca(OH) ₂	12	Hidróxido de cálcio e extrato glicólico de gengibre 20%	Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda, Ibiporã, PR, Brasil Apis Flora, Ribeirão Preto, SP, Brasil
Salina	12	Soro fisiológico apirrogênico	Segmenta, Ribeirão Preto, SP, Brasil

As medicações CLX, PRO (Figura 7a), GENG (Figura 7b) e Salina foram levadas ao canal radicular com o auxílio de seringas de 3 ml até o completo preenchimento do canal radicular. A medicação Ca(OH)₂ + soro fisiológico foi realizada na proporção 0,1g (grama) de Ca(OH)₂ para 100 µl soro fisiológico (Figura 8a). A associação Ca(OH)₂ + CLX foi realizada na proporção 1:1 em volume, na consistência de pasta de dente (Gomes et al. 2006; Semenoff et al., 2008) (Figura 9a). A associação PRO + Ca(OH)₂ foi realizada na proporção 0,1g (grama) de Ca(OH)₂ para 100 µl de própolis (Figura 10a e b) e a associação GENG + Ca(OH)₂, na proporção 0,1g de Ca(OH)₂ para 100 µl de gengibre (Figura 11a e b). Todas as associações foram levadas ao canal radicular com o auxílio de uma lima K30 (Figuras 8b, 9b, 10c e 11c).

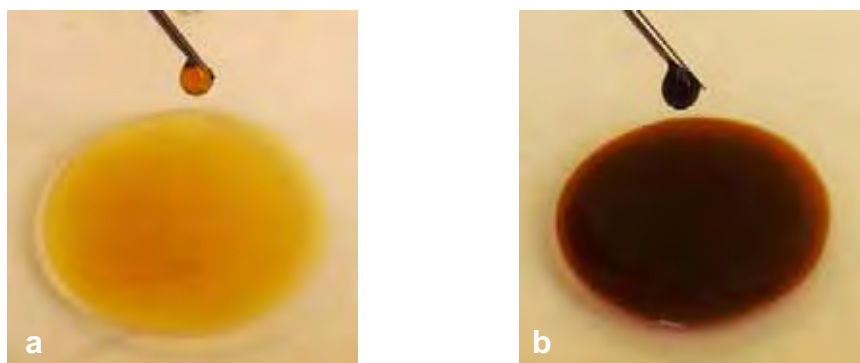


Figura 7 – a) extrato glicólico de própolis 12%; b) extrato de glicólico de gengibre 20%

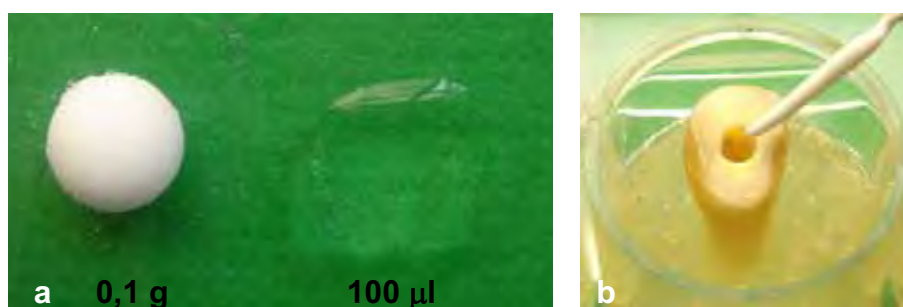


Figura 8 – a) Ca(OH)_2 , soro fisiológico e proporções, respectivamente; b) colocação da medicação com o auxílio de uma lima K30.



Figura 9 – a) Ca(OH)_2 , CLX e proporções respectivamente; b) colocação da medicação com o auxílio de uma lima K30.

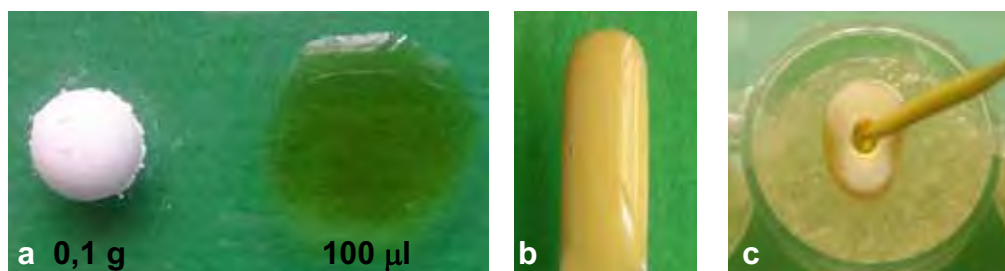


Figura 10 – a) Ca(OH)_2 , PRO e proporções, respectivamente; b) pasta da associação após a manipulação; c) colocação da medicação com o auxílio de uma lima K30.

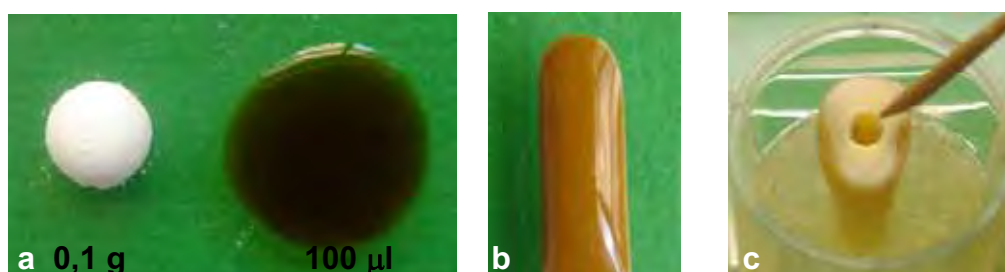


Figura 11 – a) Ca(OH)_2 , GENG e proporções, respectivamente; b) pasta da associação após a manipulação; c) colocação da medicação com o auxílio de uma lima K30.

Após o preenchimento dos canais radiculares com a medicação intracanal, foram posicionadas bolinhas de algodão apirogênica na entrada dos canais radiculares. Foi adicionado mais soro fisiológico naqueles poços que já continham soro. Os dentes permaneceram em estufa a 37°C por catorze dias. Após este período, a medicação foi removida com auxílio de uma lima K50 e 10 ml de solução soro fisiológico apirogênico e em seguida foi realizada coleta do conteúdo do canal radicular (2ª coleta: imediatamente após 14 dias da ação da medicação). Os canais foram preenchidos com solução soro fisiológico apirogênico e levados novamente em estufa, e após 7 dias foi realizada outra coleta (3ª coleta).

4.4 Coletas do conteúdo do canal radicular (Figura 12)

Todas as coletas dos canais radiculares (coleta de confirmação, 1ª coleta: imediatamente após a instrumentação, 2ª coleta: imediatamente após 14 dias da ação da medicação intracanal e 3ª coleta: após sete dias da remoção da medicação) foram realizadas da mesma forma: os canais foram preenchidos com solução fisiológica apirogênica com o auxílio de agulhas e seringas de 1 ml, esta solução foi agitada com auxílio da agulha e o conteúdo do canal radicular foi coletado com auxílio de outra seringa de 1 ml. Este procedimento foi realizado até completar a quantidade de 100 µl coletados do canal radicular, os quais foram transferidos para microtubos de centrifugação de 1,5 ml (tipo eppendorf) (Axygen, Union City, USA) contendo 900 µl de soro fisiológico apirogênico.

Para todas as amostras coletadas, foram realizados testes microbiológicos e quantificação de endotoxinas para verificar presença de microrganismos e endotoxinas nos canais radiculares.

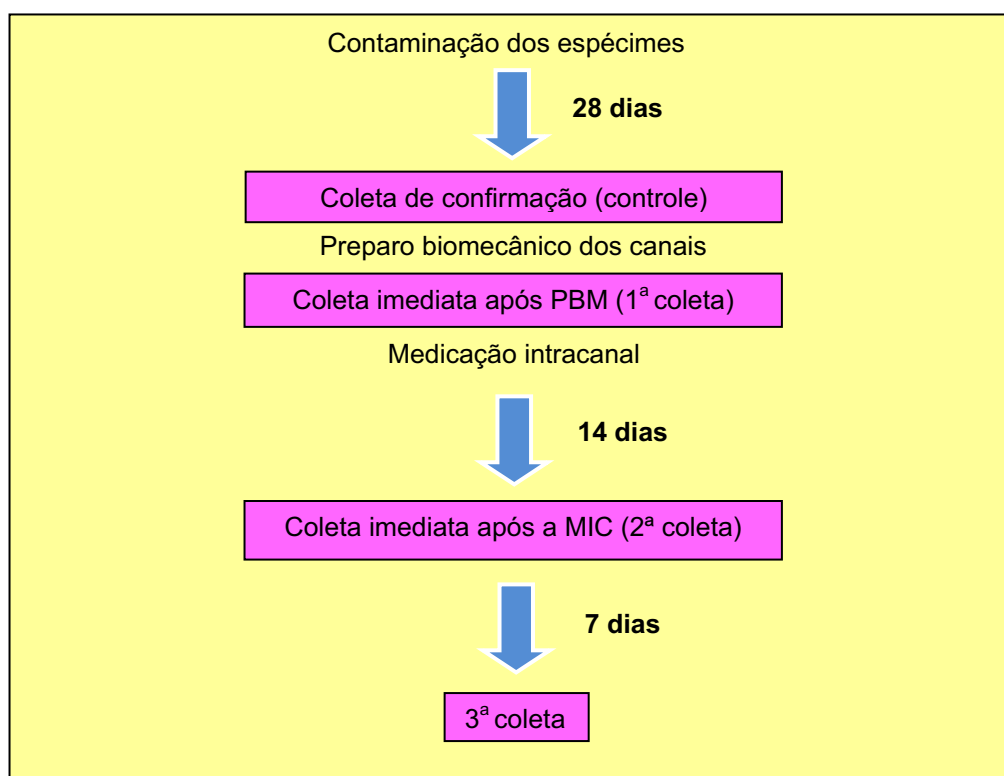


Figura 12 – Sequência das coletas realizadas durante o estudo

4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana

Para determinar a atividade antimicrobiana, foram realizadas diluições seriadas das amostras coletadas do canal radicular e semeadura, em duplicata, em três diferentes meios de cultura, seletivo para cada microrganismo: ágar Sabouraud Dextrose acrescido de 0,1 mg/ml de cloranfenicol (Vixmicina, União Química Farmacêutica S/A, Embu-Guaçu, SP, Brasil) para *C. albicans*, ágar Enterococcosel (Becton, Dickinson and Company Sparks, MD 21152, USA) para *E. faecalis* e ágar MacConkey com 0,15% de sais biliares, cristal violeta e NaCl (cloreto de sódio) (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) para *E. coli*.

As placas foram mantidas em estufa a 37°C por 24 h, para determinação de UFC/ml. Em todas as coletas, a atividade

antimicrobiana dos tratamentos e substâncias utilizadas foi avaliada pela contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml) de *C. albicans*, *E. faecalis* e *E. coli* remanescentes no canal radicular. Os resultados foram transformados em log₁₀ e submetidos à análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis e de Dunn, com significância de 5%.

4.6 Quantificação de endotoxinas

Nos dias dos testes (coleta de confirmação; 1^a coleta: imediatamente após o preparo biomecânico; 2^a coleta: imediatamente após 14 dias da ação da medicação e 3^a coleta: após 7 dias), as amostras coletadas do canal radicular foram diluídas 1:1000. Em seguida, foram submetidas à análise quantitativa de LPS pelo método cinético cromogênico do lisado do amebócito de *Limulus* (LAL).

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

Em uma placa apirogênica de 96 poços (TPP – Techno Plastic Products AG, Zollstrasse, Trasadingen, Suíça) (Figura 13) foram distribuídos em duplicata: a água apirogênica (branco da reação) (Figura 14a) e a curva-padrão de endotoxina. As amostras coletadas do canal radicular foram colocadas em quadruplicata, sendo que em cada duplicata foi adicionado 10 µl do controle padrão de endotoxina (CPE) (Figura 14b)

para verificação de possíveis interferências na reação (Controle Positivo de Produto – PPC).

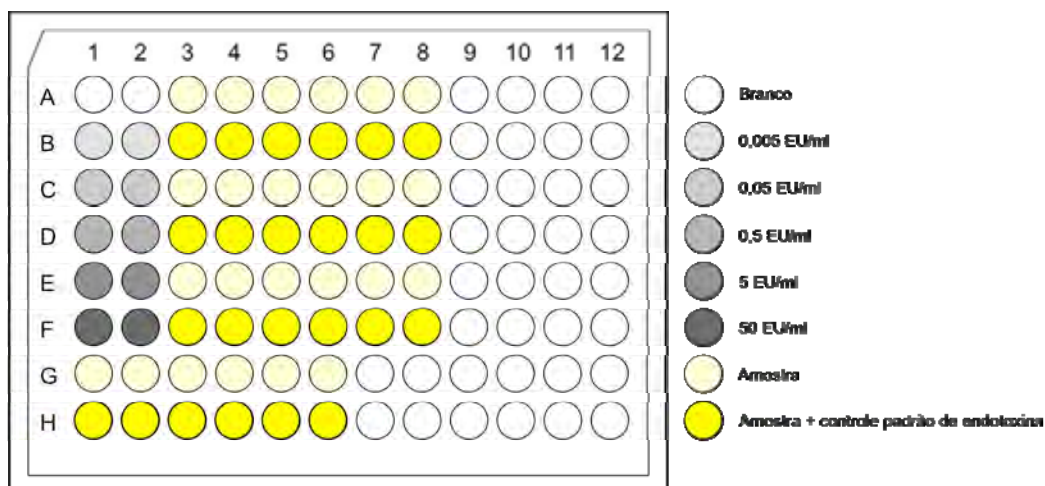


Figura 13 – Esquema da montagem da placa de 96 poços para o teste cinético cromogênico LAL.

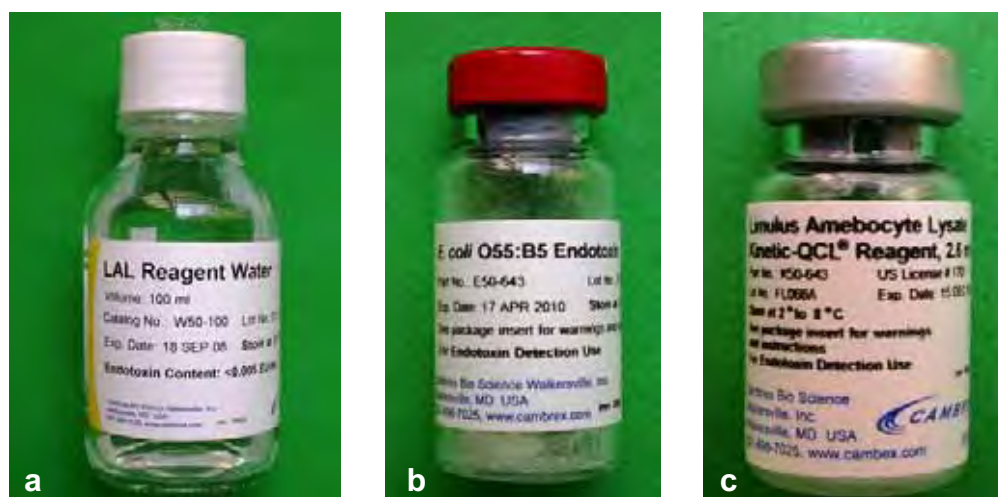


Figura 14 – Substâncias utilizadas como padrão: a) água apirogênica; b) endotoxina padrão de *E. coli*; c) Reagente LAL.

Após, a placa foi incubada no leitor cinético QCL (Cambrex Bio Ciência Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) (Figura 9a) a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 10 min, o qual está acoplado a um microcomputador com *software* Wink QCL (Cambrex Bio Ciência Brasil Ltda., São Paulo, SP,

Brasil) específico para gerenciamento, execução e emissão de relatórios. Foram adicionados em cada poço da placa 100 μ l do reagente cinético cromogênico do LAL (Figura 14c), com uma micropipeta multicanal de 8 canais e ponteiros apirogênicos (Figura 15a e b).

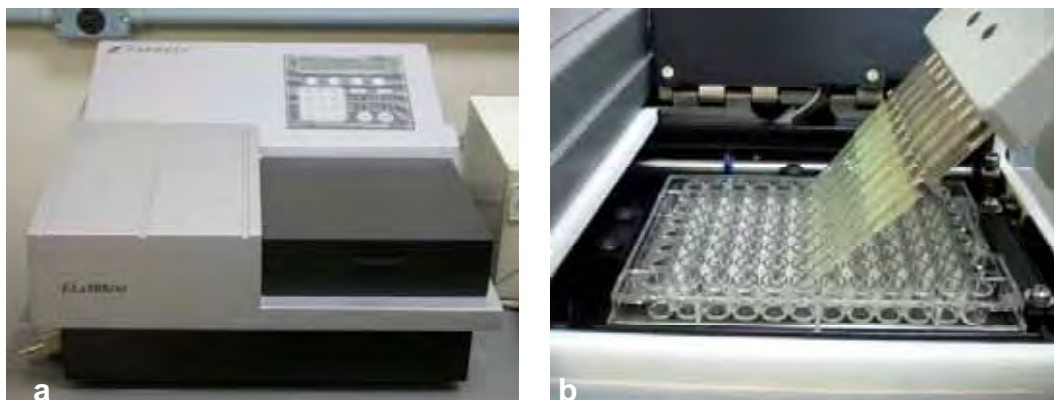


Figura 15 – a) Leitor cinético; b) adição do reagente LAL.

Após o início do ensaio cinético, o *software* da leitora de microplacas monitorou, de forma contínua durante todo o ensaio, a absorbância a 405 nanometro (nm) em cada poço da microplaca. Os parâmetros da curva-padrão e os valores da quantidade de endotoxina das amostras dos canais radiculares foram impressos em relatórios.

Uma vez que a curva-padrão apresentou-se com adequado padrão linear (sem alterações), esta fica armazenada no *software* Wink QCL durante toda a utilização deste kit cromogênico LAL. Assim, nos testes realizados posteriormente, foi utilizado somente o controle padrão de endotoxina igual a 0,5 EU/ml.

Os resultados deste teste foram submetidos à análise estatística de Kruskal-Wallis e teste de Dunn, com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Análise microbiológica

A Figura 16 (a, b e c) ilustra placas de petri contendo os microrganismos após a semeadura referente a coleta de confirmação das amostras após 28 dias de contaminação.

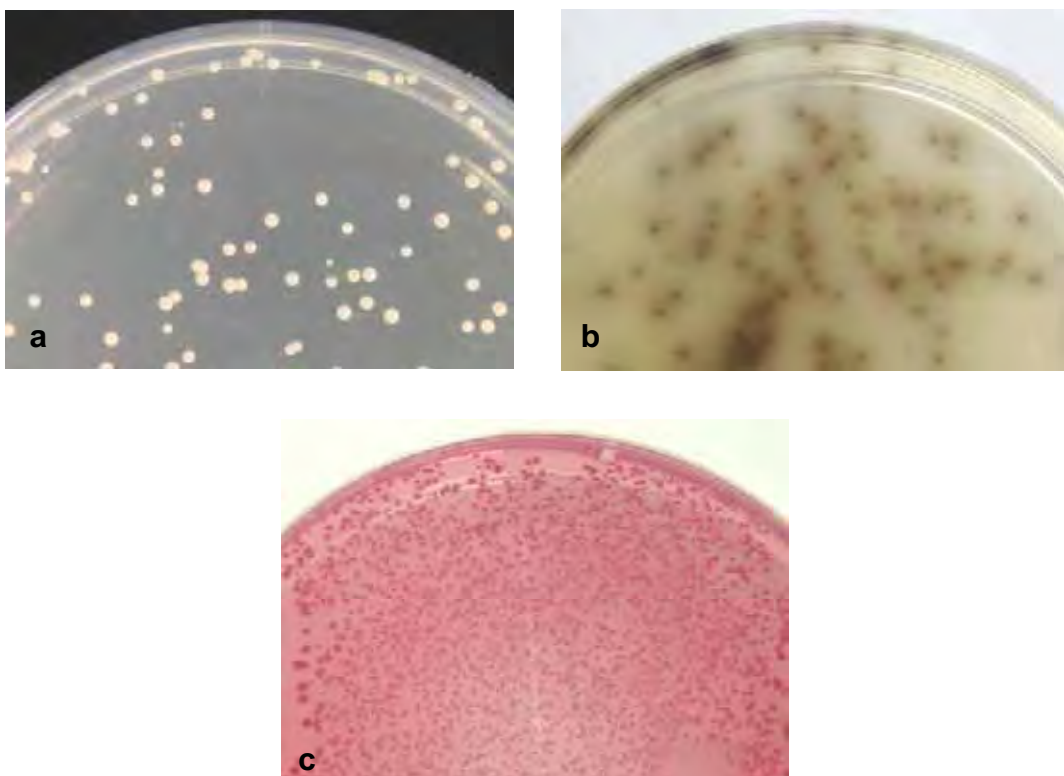


Figura 16 – Placas de petri após a coleta de confirmação: a) *C. albicans* em ágar Sabouraud Dextrose; b) *E. faecalis* em ágar Enterococcel; c) *E. coli* em ágar MacConkey

Os resultados obtidos pela contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml), em $\log_{10}$, em cada espécime, em todas as coletas, estão apresentados nas Tabelas 8 a 15 (Apêndice A).

Os valores médios de UFC/ml de todos os grupos estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Médias dos valores de UFC/ml (log10) em todos os grupos experimentais (n=12)

Grupos	Confirmação (após 28 dias de contaminação)						1ª coleta (após o PBM)						2ª coleta (após 14 dias da MIC)						3ª coleta (7 dias da remoção da MIC)					
	<i>C. albicans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>
Ca(OH) ₂	6,16	7,04	6,34	4,35	5,62	5,28	0,58	0,20	0	1,04	1,43	0												
CLX	6,43	6,83	6,73	3,48	5,16	4,89	0	0	0	0	0	0												
CLX + Ca(OH) ₂	5,80	7,31	7,04	3,20	4,78	5,75	0	0	0	0	0	0												
PRO	7,14	6,99	7,09	3,24	4,47	4,66	0	0	0	0	0	0												
PRO + Ca(OH) ₂	6,35	6,40	6,45	3,10	4,70	4,65	0	0	0	0	0	0												
GENG	7,11	6,92	6,17	3,87	4,43	4,62	0	0	0	0	0	0												
GENG+ Ca(OH) ₂	7,27	6,79	7,13	4,53	4,84	5,13	0	0	0	0	0	0												
Salina	5,89	6,87	7,33	3,49	4,93	4,89	3,24	4,37	4,60	4,63	5,13	5,72												

A Tabela 1 ilustra a média dos valores de UFC/ml (log10) em todos os grupos experimentais. Analisando as Tabelas 8 a 15 (Apêndice A) pôde-se verificar crescimento microbiano em todos os espécimes na coleta de confirmação.

Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn (nível de significância 5%). A Tabela 2 mostra a estatística descritiva da coleta de confirmação e 1ª coleta, na qual todos os grupos receberam o mesmo tratamento: preparo biomecânico com solução salina (n=96).

Tabela 2 – Estatística descritiva dos valores da média, desvio-padrão e mediana de UFC/ml (log10) da coleta de confirmação e 1ª coleta

Microrganismo	n	Coleta de confirmação		1ª coleta	
		Média e DP*	Mediana	Média e DP*	Mediana
<i>C. albicans</i>	96	6,52 ± 0,77	6,63	3,66 ± 1,42	3,90
<i>E. faecalis</i>	96	6,89 ± 0,50	6,97	4,87 ± 0,62	4,90
<i>E. coli</i>	96	6,78 ± 0,91	7,07	4,98 ± 0,96	5,17

*DP: desvio-padrão

A estatística realizada neste estudo foi baseada nos percentuais de redução referente à diminuição de UFC/ml dos microrganismos de cada coleta em relação à coleta de confirmação.

Os percentuais de redução obtidos na 1ª coleta em relação à coleta de confirmação estão descritos na Tabela 3, pôde-se verificar que houve redução de todos os microrganismos avaliados, entretanto, sabe-se que a solução salina não possui atividade antimicrobiana, portanto, esta redução foi devido à ação mecânica dos instrumentos e física da irrigação e aspiração dos canais radiculares.

Tabela 3 – Percentuais de redução obtidos na 1ª coleta em relação à coleta de confirmação: média, desvio-padrão e mediana em porcentagem, referente à diminuição de UFC/ml dos microrganismos

Microrganismo	n	Média e Desvio-padrão	Mediana
<i>C. albicans</i>	96	43,98 ± 21,40	37,55
<i>E. faecalis</i>	96	29,06 ± 9,84	29,26
<i>E. coli</i>	96	26,30 ± 14,43	25,55

Os percentuais de redução obtidos na 2ª e 3ª coleta em relação à coleta de confirmação estão descritos nas Tabelas 4 e 5. Estas coletas foram avaliadas considerando cada grupo experimental individualmente, com as variações das medicações intracanaís (n=12).

Na 2ª coleta (Tabela 4), todos os grupos experimentais foram semelhantes entre si e diferentes do grupo Salina. Entretanto, o grupo Ca(OH)_2 apesar de ter sido semelhante aos demais grupos, verifica-se que esta medicação não foi capaz de eliminar completamente *C. albicans* e *E. faecalis* nos canais radiculares. Já na Tabela 5 (3ª coleta) verifica-se que o grupo Ca(OH)_2 foi estatisticamente semelhante ao grupo Salina.

Tabela 4 – Percentuais de redução obtidos na 1ª coleta e da 2ª coleta em relação a coleta de confirmação: média, desvio-padrão, mediana e representação dos grupos homogêneos referente à diminuição de UFC/ml dos microrganismos

Grupos	1ª coleta X confirmação						2ª coleta X confirmação					
	<i>C. albicans</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>E. coli</i>		<i>C. albicans</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>E. coli</i>	
	Média±DP*	Mediana	Média±DP*	Mediana	Média±DP*	Mediana	Média±DP*	Mediana	Média±DP*	Mediana	Média±DP*	Mediana
Ca(OH) ₂	28,96±14,51	24,24	19,83±9,81	22,68	16,54±6,42	16,62	90,64±22,52	100	96,81±11,06	100	100±0,00	100
CLX	45,76±18,90	38,37	24,56±8,28	25,47	25,85±15,06	28,93	100±0,00	100	100±0,00	100	100±0,00	100
CLX + Ca(OH) ₂	44,52±19,89	37,41	34,46±6,55	35,31	18,48±10,07	18,10	100±0,00	100	100±0,00	100	100±0,00	100
PRO	54,70±25,36	48,72	35,91±9,19	34,58	34,57±9,29	37,19	100±0,00	100	100±0,00	100	100±0,00	100
PRO + Ca(OH) ₂	53,42±26,46	47,51	25,52±9,81	25,56	26,60±17,50	24,96	100±0,00	100	100±0,00	100	100±0,00	100
GENG	45,49±10,88	43,72	35,84±10,93	35,91	27,21±25,61	18,45	100±0,00	100	100±0,00	100	100±0,00	100
GENG + Ca(OH) ₂	37,83±14,39	31,12	28,49±3,85	29,52	27,87±7,58	27,01	100±0,00	100	100±0,00	100	100±0,00	100
Salina	41,20±28,28	33,20	27,91±7,13	28,89	33,27±4,63	33,79	44,98±12,54	47,79	36,18±8,30	37,19	37,10±7,27	39,46

*DP: desvio padrão (±)

**GH: grupos homogêneos, letras diferentes significam diferença estatisticamente significantes

Tabela 5 – Percentuais de redução obtidos na 1ª coleta e da 3ª coleta em relação a coleta de confirmação: média, desvio-padrão, mediana e representação dos grupos homogêneos referente à diminuição de UFC/ml dos microrganismos

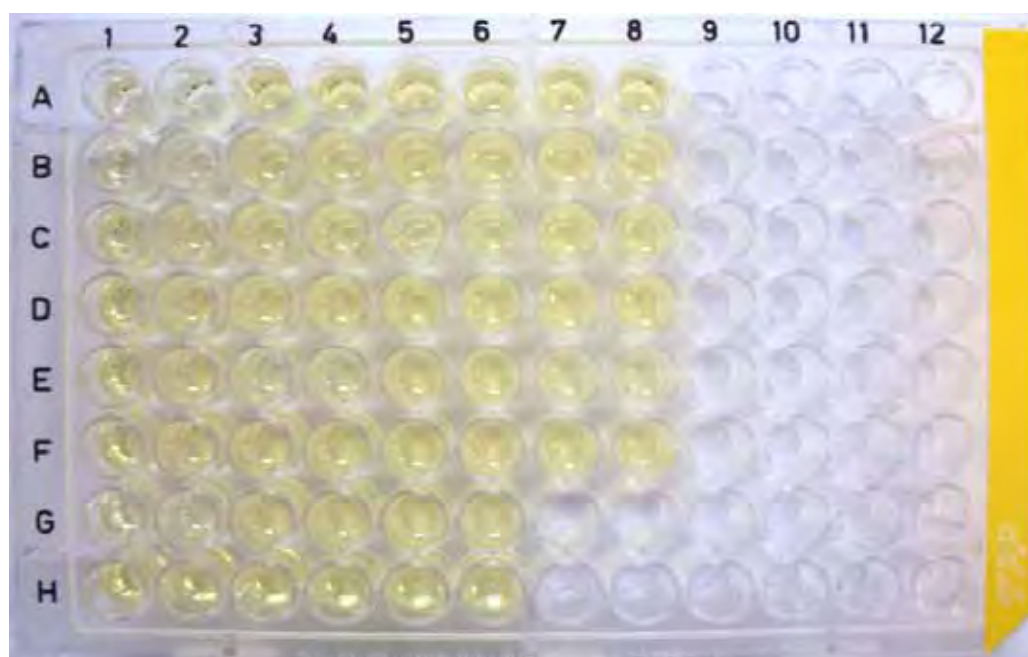
Grupos	1ª coleta X confirmação						3ª coleta X confirmação					
	<i>C. albicans</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>E. coli</i>		<i>C. albicans</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>E. coli</i>	
	Média±DP*	Mediana	Média±DP*	Mediana	Média±DP*	Mediana	Média±DP*	Mediana	Média±DP*	Mediana	Média±DP*	Mediana
Ca(OH) ₂	28,96±14,51	24,24	19,83±9,81	22,68	16,54±6,42	16,62	83,32±26,75	100	79,44±6,34	100	100±0,00	100
CLX	45,76±18,90	38,37	24,56±8,28	25,47	25,85±15,06	28,93	100±0,00	100	100±0,00	100	100±0,00	100
CLX + Ca(OH) ₂	44,52±19,89	37,41	34,46±6,55	35,31	18,48±10,07	18,10	100±0,00	100	100±0,00	100	100±0,00	100
PRO	54,70±25,36	48,72	35,91±9,19	34,58	34,57±9,29	37,19	100±0,00	100	100±0,00	100	100±0,00	100
PRO + Ca(OH) ₂	53,42±26,46	47,51	25,52±9,81	25,56	26,60±17,50	24,96	100±0,00	100	100±0,00	100	100±0,00	100
GENG	45,49±10,88	43,72	35,84±10,93	35,91	27,21±25,61	18,45	100±0,00	100	100±0,00	100	100±0,00	100
GENG + Ca(OH) ₂	37,83±14,39	31,12	28,49±3,85	29,52	27,87±7,58	27,01	100±0,00	100	100±0,00	100	100±0,00	100
Salina	41,20±28,28	33,20	27,91±7,13	28,89	33,27±4,63	33,79	21,20±12,10	21,11	23,34±5,69	24,08	21,82±3,93	22,90

*DP: desvio padrão (±)

**GH: grupos homogêneos, letras diferentes significam diferença estatisticamente significantes

5.2 Quantificação de endotoxinas

A Figura 17 ilustra a placa de 96 poços após a realização do teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (LAL).



A1-A2: branco da reação

B1-B2: 0,005 EU/ml

C1-C2: 0,05 EU/ml

D1-D2: 0,5 EU/ml

E1-E2: 5 EU/ml

F1-F2: 50 EU/ml

G1-G2: amostra 1

H1-H2: amostra 1 + CPE

A3-A4: amostra 2

B3-B4: amostra 2 + CPE

C3-C4: amostra 3

D3-D4: amostra 3 + CPE

E3-E4: amostra 4

F3-F4: amostra 4 + CPE

G3-G4: amostra 5

H3-H4: amostra 5 + CPE

A5-A6: amostra 6

B5-B6: amostra 6 + CPE

C5-C6: amostra 7

D5-D6: amostra 7 + CPE

E5-E6: amostra 8

F5-F6: amostra 8 + CPE

G5-G6: amostra 9

H5-H6: amostra 9 + CPE

A7-A8: amostra 10

B7-B8: amostra 10 + CPE

C7-C8: amostra 11

D7-D8: amostra 11 + CPE

E7-E8: amostra 12

F7-F8: amostra 12 + CPE

Figura 17 – Placa de 96 poços após a realização do teste cinético cromogênico LAL

Os dados obtidos pelo teste de quantificação de endotoxinas dos canais radiculares, em cada espécime, em todas as coletas estão apresentados nas Tabelas 16 a 31 (Apêndice B).

Os valores médios da quantidade de EU/ml de todos os grupos estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 – Médias dos resultados obtidos: quantidade de endotoxinas de *E. coli* (EU/ml) em todos os grupos experimentais

Grupos	n	Confirmação	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
Ca(OH) ₂	12	203175	2745	5,53	6,89
CLX	12	43123	564	2047	2691
CLX + Ca(OH) ₂	12	294733	2036	29,13	51,5
PRO	12	352192	5957	422	771
PRO + Ca(OH) ₂	12	357842	7221	11,24	11,94
GENG	12	378167	1555	438	1611
GENG + Ca(OH) ₂	12	160401	3280	19,93	20,16
Salina	12	51061	14560	6403	36867

A estatística realizada neste estudo foi baseada nos percentuais de alteração referente a diminuição ou aumento da quantidade de endotoxina (EU/ml) de cada coleta em relação à coleta de confirmação (Apêndice B). Os dados foram analisados pelo teste estatístico de Kruskal-Wallis e teste de Dunn (nível de significância 5%).

Os percentuais de alteração da 1ª, 2ª e 3ª coletas estão descritos na Tabela 7. Pôde-se verificar que na 1ª coleta, após o preparo biomecânico com solução salina, houve grande redução da quantidade de endotoxinas. Os valores do percentual de alteração obtido na 1ª coleta em relação à coleta de confirmação (n=96) foram, média e desvio padrão: 88,95±44,33; e mediana: 98,33. Entretanto, na Tabela 7, os valores

descritos estão de acordo com cada grupo experimental (n=12). Não foi realizada comparação de grupos homogêneos na 1ª coleta, pois todos os grupos foram instrumentados com a mesma solução irrigadora (solução salina). Em relação à 2ª coleta, foi possível verificar que o grupo Ca(OH)_2 foi estatisticamente semelhante aos grupos CLX + Ca(OH)_2 , PRO + Ca(OH)_2 , GENG e GENG + Ca(OH)_2 , apresentando os maiores percentuais de redução; sendo diferente dos grupos CLX, PRO. O grupo Salina foi semelhante aos grupos CLX, PRO e GENG. Observa-se que todos os grupos associados ao Ca(OH)_2 foram semelhantes entre si.

Na 3ª coleta, também foi verificada semelhança entre os grupos que contém Ca(OH)_2 (Ca(OH)_2 , Ca(OH)_2 + CLX, Ca(OH)_2 + PRO, Ca(OH)_2 + GENG), sendo que estes grupos foram semelhantes ao PRO. O grupo do Ca(OH)_2 foi diferente estatisticamente dos grupos CLX e GENG. Entretanto, estes grupos foram semelhantes entre si e ao grupo Salina.

Tabela 7 - Percentuais de alteração obtidos nas 1^a, 2^a e 3^a coletas em relação a coleta de confirmação: média, desvio-padrão, mediana e representação dos grupos homogêneos (2^a e 3^a coletas) referente às alterações da quantidade de endotoxinas (EU/ml)

Grupos	1 ^a coleta X confirmação			2 ^a coleta X confirmação			3 ^a coleta X confirmação		
	Média±DP*	Mediana		Média±DP*	Mediana	GH**	Média±DP*	Mediana	GH**
Ca(OH) ₂	98,670 ± 1,098	98,782		99,997 ± 0,003	100	A	99,996 ± 0,005	100	A
CLX	98,151 ± 2,521	98,874		93,450 ± 9,570	97,900	C	87,660 ± 18,430	95,200	C
CLX + Ca(OH) ₂	98,991 ± 0,897	99,157		99,972 ± 0,040	99,991	A B	99,959 ± 0,048	99,971	A B
PRO	82,700 ± 53,500	99,300		99,755 ± 0,440	99,860	B C	98,781 ± 3,300	99,934	A B C
PRO + Ca(OH) ₂	96,730 ± 6,350	99,350		99,994 ± 0,011	99,999	A B	99,992 ± 0,018	99,998	A
GENG	99,238 ± 0,964	99,532		99,814 ± 0,227	99,900	A B C	99,384 ± 0,745	99,698	B C
GENG + Ca(OH) ₂	88,810 ± 28,310	98,470		99,925 ± 0,158	99,997	A B	99,947 ± 0,089	99,991	A B
Salina	48,300 ± 104,500	92,200		67,000 ± 67,700	90,800	C	-22,800 ± 128,400	34,800	C

*DP: desvio padrão

**GH: grupos homogêneos, letras diferentes significam diferença estatisticamente significantes

6 DISCUSSÃO

6.1 Da metodologia

A utilização de dentes humanos para pesquisas *in vitro* enfrenta algumas dificuldades como: obtenção dos dentes e padronização da amostra. Para esta pesquisa foram obtidos dentes de pacientes que foram indicados para exodontia, na maior parte dos casos por problemas periodontais. Apesar das dificuldades como idade do dente e variações anatômicas, no presente estudo foram utilizados dentes unirradiculados, que tiveram suas coroas seccionadas, padronizando o tamanho dos espécimes em $16\pm 0,5\text{mm}$ (Menezes et al., 2004). Além disto, os canais radiculares foram previamente instrumentados até a lima Kerr K30 para padronização do diâmetro do canal radicular antes da contaminação dos mesmos. Foi realizado o vedamento dos ápices das radiculares com resina fotopolimerizável e posterior impermeabilização das raízes com resina epóxi para garantir o vedamento de possíveis ramificações do canal radicular e forame apical, impossibilitando assim, a saída dos microrganismos e solução salina, utilizada durante a instrumentação, para a superfície externa do dente.

As raízes foram distribuídas aleatoriamente e fixadas com resina acrílica quimicamente ativada em placas de cultura de células de 24 poços, a fim de facilitar a instrumentação, evitando a manipulação e consequente contaminação dos canais radiculares (Oliveira et al., 2007). Em seguida, as placas contendo os espécimes e todo material a ser utilizado na pesquisa foram esterilizados com radiação gama cobalto 60,

pela Empresa Brasileira de Radiação (EMBRARAD). Esta radiação é capaz de neutralizar pirógenos, provavelmente, devido a destruição da porção polissacarídica e alteração do lipídeo A (Csako et al., 1983).

Quanto aos microrganismos utilizados neste estudo, é conhecido que as infecções endodônticas são consideradas polimicrobianas, sendo que *C. albicans* e *E. faecalis* estão entre os microrganismos freqüentemente isolados em canais radiculares com necrose pulpar e presença de lesão periapical (Waltimo et al., 1997; Peciulienė et al., 2001; Sunde et al., 2002; Pinheiro et al., 2003).

Apesar de *E. coli* não ser uma bactéria comumente encontrada no interior de canais radiculares com polpa necrosada, estudos de Siqueira et al. (2001), Peciulienė et al. (2001) e Geibel et al. (2005) identificaram sua presença nos canais de dentes com necrose pulpar e presença de lesões periapicais. Além disso, sua endotoxina apresenta a estrutura básica do componente lipídico, que representa o centro ativo responsável pela toxicidade do LPS. A escolha da *E. coli* neste estudo foi devido as várias pesquisas encontradas na literatura utilizando sua endotoxina para verificação da indução de lesões periapicais (Barthel et al., 1997; Mattison et al., 1987; Haight-Ponce et al., 1995; Nelson-Filho et al., 2002).

Os canais foram contaminados com *C. albicans*, *E. faecalis* e *E. coli* por 28 dias e após iniciou-se o preparo biomecânico. Para definição deste período, foi realizado um estudo prévio onde os canais foram contaminados por 21 e 28 dias e em seguida analisados por MEV para verificar a penetração dos microrganismos nos túbulos dentinários. Foi observada penetração intensa da bactéria no interior dos túbulos dentinários somente após 28 dias, sendo portanto, esse período o tempo necessário para a contaminação da massa dentinária.

No preparo biomecânico dos canais radiculares, foi utilizada solução salina fisiológica, pois esta solução não possui atividade antimicrobiana e o estudo teve como objetivo avaliar somente a ação das medicações intracanaís. Em relação ao volume da solução salina utilizada a cada troca de lima, Leonardo (1998) recomenda a utilização de, no mínimo, 2,4 ml de solução irrigadora, após o uso de cada instrumento. Dessa forma, neste estudo, optou-se pela utilização de 3 ml de solução salina fisiológica, a cada troca de instrumento.

Com relação às medicações intracanaís, o hidróxido de cálcio é o curativo de demora mais utilizado. Além de todas as suas propriedades como antimicrobiana (Bystrom et al., 1985), neutralizadora do pH ácido e indutora de mineralização (Leonardo et al., 2002), o hidróxido de cálcio tem ação sobre endotoxinas (Barthel et al., 1997; Safavi e Nichols, 1993; Safavi e Nichols, 1994; Tanomaru et al., 2003). Entretanto, a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio deve ser complementada associando-o a outra substância química a fim de aumentar o espectro de ação no interior dos canais radiculares. A clorexidina vem ganhando espaço para ser utilizada associada ao hidróxido de cálcio, uma vez que a clorexidina atua contra bactérias aeróbias e anaeróbias, fungos e especialmente *C. albicans* e *E. faecalis*, que são os microrganismos mais resistentes à ação do hidróxido de cálcio (Menezes et al., 2004; Ercan et al., 2006; Gomes et al., 2006). Desta forma, no presente estudo utilizou-se o hidróxido de cálcio puro e associado a clorexidina gel 2%. Estudos têm mostrado que esta associação apresenta satisfatória atividade antimicrobiana (Menezes et al., 2004; Soares et al., 2006; Vianna et al., 2008), além da efetividade sobre endotoxinas presentes no canal radicular (Maekawa et al., 2010; Valera et al., 2010).

A clorexidina utilizada neste estudo foi manipulada na Farmácia de manipulação Byofórmula (São José dos Campos, SP, Brasil)

na concentração de 2% em gel de natrosol 0,8%. Nesta formulação, a clorexidina gel se torna menos viscosa, facilitando assim sua utilização nos canais radiculares.

A escolha dos extratos naturais foi devido às propriedades já conhecidas da própolis como atividades antiinflamatória, analgésica e antimicrobiana (Grange & Davey, 1990; Paulino et al., 1996; Burdock, 1998; Koo et al., 2000; Lotufo et al., 2005; Silva et al., 2004) e pelas propriedades antiinflamatória, antimicrobiana e analgésica do gengibre (Grégio et al., 2006; Ojewole, 2006; Zhou et al., 2006; Aimbire et al., 2007, Ali et al., 2008). Estudos prévios (Caires et al., 2008; Shygei et al., 2008; Valera et al., 2010), também mostraram resultados satisfatórios utilizando estes extratos sobre microrganismos em canais radiculares, sendo necessária a continuidade de pesquisas com estas substâncias.

Os extratos naturais foram manipulados pela empresa Apis Flora. Utilizou-se a concentração de 12% para a própolis pois, de acordo com o fabricante, esta concentração do extrato de própolis é considerada padrão da empresa, sendo ideal para manter as suas propriedades benéficas. O extrato de gengibre foi utilizado na concentração de 20% pois, de acordo com estudo de Shygei et al. (2008), o extrato glicólico de gengibre na concentração de 10% não foi tão efetivo.

O período de 14 dias de ação da medicação intracanal foi devido ao hidróxido de cálcio necessitar desse tempo para difundir-se nas áreas de propagação microbiana e desta forma ter ação satisfatória (Nerwich et al., 1993; Takahashi et al., 1996). Leonardo et al. (2002) verificaram em um estudo *in vivo*, que os melhores resultados histopatológicos após utilização do hidróxido de cálcio como medicação intracanal, ocorreram de 15 a 30 dias. Além disto, Gomes et al. (2003)

verificaram que o tempo ideal para a clorexidina gel 2% exercer sua atividade antimicrobiana sobre *E. faecalis* foi de 1 a 15 dias.

No presente estudo não foi realizada a neutralização das medicações intracanaís testadas antes da coleta microbiológica. Optou-se pela não neutralização, pois não se conhece um neutralizador para os extratos naturais testados. Além disto, antes da coleta do canal radicular, os canais foram irrigados com 10 ml de solução salina para remoção da medicação intracanal, evitando-se assim, o transporte do medicamento para os testes realizados. Ainda, previamente ao estudo, foram realizados testes iniciais com todas as substâncias testadas para verificar a ocorrência de alguma alteração no teste da endotoxina e observou-se que estas soluções não alteraram a reação do teste lisado de amebócito de *Limulus*.

O Lisado do amebócito *Limulus* (LAL) é utilizado para detecção de endotoxinas presente em bactérias Gram-negativas. Este lisado é preparado a partir do amebócito circulante do caranguejo-ferradura *Limulus polyphemus*.

Alguns estudos utilizam o teste Gel Clot (Lisado do amebócito de *Limulus*) para detecção de endotoxinas (Oliveira et al., 2005; Oliveira et al., 2007). Este método é mais acessível e de menor custo por não necessitar do leitor cinético para detectar endotoxina. Neste método, são colocadas amostras dos canais radiculares juntamente com o reagente do LAL em tubos apirogênicos. Esses tubos são levemente agitados, permanecendo em banho-maria a 37° C durante 1 hora. Após esse período é verificada a formação ou não do gel inclinando-se os tubos (análise qualitativa).

O teste utilizado neste estudo foi o teste cromogênico do lisado do amebócito de *Limulus*, que é o método mais sensível para a detecção de endotoxinas, permitindo quantificar a endotoxina com maior

precisão. Neste teste, o leitor cinético acoplado a um microcomputador com *software* Wink QCL específico (Cambrex Bio Ciência Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) realiza o gerenciamento, execução e emissão de relatórios. Este *software* calcula automaticamente os parâmetros da curva-padrão e os valores da quantidade de endotoxina das amostras dos canais radiculares. Este teste também foi utilizado por outros autores (Schein & Schilder, 1975; Nissan et al., 1995; Khabazz et al. 2000; Jacinto et al., 2005; Maekawa et al., 2010; Valera et al., 2010).

6.2 Dos resultados

A análise microbiológica referente à primeira coleta (imediatamente após o preparo biomecânico com solução salina) mostrou que ocorreu redução dos microrganismos testados. Esta redução refere-se a ação mecânica dos instrumentos e dos meios físicos (irrigação, aspiração, inundação) do preparo biomecânico, uma vez que a solução salina fisiológica não possui atividade antimicrobiana. Byström and Sudqvist (1981) também verificaram que o preparo biomecânico utilizando solução salina reduziu consideravelmente o número de bactérias dentro do canal radicular. Entretanto, citam a importância da utilização de substâncias químicas auxiliares com atividade antimicrobiana para a remoção adequada das bactérias do canal radicular.

Entretanto, após a aplicação da medicação intracanal (2ª coleta) verificou-se que apenas o grupo hidróxido de cálcio não foi capaz de eliminar completamente *C. albicans* e *E. faecalis* dos canais radiculares, com *média* de percentual de redução de 90,64% para *C. albicans* e 96,81% para *E. faecalis*, em relação à coleta de confirmação. Estes resultados estão de acordo com outros autores que também

verificaram a resistência destes microrganismos ao hidróxido de cálcio (Bystrom et al., 1985; Haapasalo e Orstavik, 1987; Orstavik e Haapasalo, 1990; Siqueira et al., 1996; Sirén et al., 1997; Waltimo et al., 1999; Valera et al., 2010). Todas as outras medicações testadas foram eficazes na eliminação de *C. albicans*, *E. faecalis* e *E. coli*.

Esta resistência de *E. faecalis* ao hidróxido de cálcio em pH igual ou menor que 11,1 é devido à presença de uma bomba de prótons em sua parede celular. Esta bomba de prótons tem a capacidade de acidificar o citoplasma, fazendo com que este microrganismo sobreviva mesmo em pH alcalino. Entretanto, quando o pH alcança valores iguais ou maiores que 11,5, não há a ativação desta bomba de prótons, ocorrendo assim a morte do microrganismo (Evans et al., 2002; McHugh et al., 2004). Além disto, *E. faecalis* é capaz de penetrar rapidamente e em profundidade nos túbulos dentinários, sendo de difícil remoção após o preparo biomecânico (Orstavik e Haapasalo, 1990). Ainda, os valores de pH na massa dentinária podem não atingir o pH ideal para eliminação deste microrganismo, devido ao efeito tampão da dentina sobre alcalinidade do hidróxido de cálcio (Tronstad et al., 1981; Haapasalo et al., 2000).

Assim, a capacidade de *E. faecalis* de invadir os túbulos dentinários, permanecer viável no seu interior e aderir-se ao colágeno na presença do soro humano, faz com que *E. faecalis* seja um patógeno responsável pela persistência de infecção nos canais radiculares e manutenção de alterações crônicas de dentes tratados endodonticamente (Love, 2001).

A resistência de *C. albicans* pode estar relacionada a sua capacidade de se adaptar a diversas condições ambientais. Esta levedura tem habilidade em sobreviver como comensal adaptando-se tanto em pH ácido como básico (Siqueira e Sen, 2004). Além disto, *C. albicans* possui

capacidade de sofrer transição morfológica, mudança de forma de levedura para a forma de hifas, representando uma mudança do estado comensal para o patogênico, possuindo a habilidade de invadir o tecido do hospedeiro e escapar da fagocitose pelos macrófagos; *C. albicans* ainda possui a capacidade de formação de biofilmes em diferentes superfícies, podendo se tornar mais resistente às medicações sistêmicas comumente utilizados como fluconazol e anfotericina B.

Analisando a 3ª coleta (7 dias após a ação da medicação intracanal), os microrganismos *C. albicans* e *E. faecalis* continuavam presente nos canais radiculares no grupo Ca(OH)_2 , sendo que em alguns espécimes houve até aumento destes microrganismos da 2ª para a 3ª coleta. Além disto, o grupo Ca(OH)_2 foi estatisticamente semelhante ao grupo salina, comprovando que este medicamento sozinho não é eficaz na eliminação de *C. albicans* e *E. faecalis* em canais radiculares, sendo importante a associação do hidróxido de cálcio com outra substância, ampliando assim seu espectro de ação.

Em relação às demais medicações testadas, verificou-se que todas foram capazes de eliminar completamente os microrganismos nos canais radiculares. Neste estudo a clorexidina gel 2% utilizada como medicação intracanal foi eficaz na eliminação dos microrganismos testados, concordando com estudos prévios com metodologia semelhante, que verificaram que a CLX gel 2% foi eficaz na eliminação de *C. albicans* e *E. faecalis* em canais radiculares (Gomes et al., 2003; Salvia et al., 2007; Valera et al., 2009) e outros estudos (Ferraz et al., 2001; Dametto et al., 2005; Ercan et al., 2006; Gomes et al., 2009) que também verificaram a ação da CLX sobre *C. albicans* e *E. faecalis* e outros microrganismos como *Actinomyces viscosus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella nigrescens*, *Clostridium perfringens* e *Bacteroides fragilis* (Ferreira et al., 2002; Gomes et al., 2009).

A ação da clorexidina ocorre devido sua molécula apresentar-se carregada positivamente, e a parede celular do microrganismos estar carregada negativamente, ocorrendo interação eletrostática e alteração no equilíbrio osmótico da célula. O aumento na permeabilidade da parede celular, permite que a molécula da clorexidina penetre dentro da bactéria. Quando a clorexidina é utilizada em alta concentração (2%), ocorre a precipitação do citoplasma, com consequente morte do microrganismo (Gomes et al., 2003).

A atividade antimicrobiana do extrato de própolis já foi verificada por outros autores (Koo et al., 2000; Ferreira et al., 2007). Onçag et al. (2006) também verificaram a efetividade da própolis sobre *E. faecalis* como medicação intracanal durante 10 dias e, Awawdeh et al. (2008), verificaram que a própolis foi significativamente mais efetiva que o hidróxido de cálcio após pequeno tempo de exposição (1 e 2 dias).

Molina (2008) e Valera et al. (2010) utilizando o extrato glicólico da própolis 12% como solução irrigadora durante o preparo biomecânico, verificaram, *in vitro*, a completa eliminação de *E. coli* inoculados em canais radiculares. Utilizando este mesmo extrato de própolis, Molina et al. (2008) verificaram que sua atividade antifúngica para todas as cepas clínicas de *C. albicans* avaliadas.

Entretanto, apesar de vários autores verificarem que a própolis possui atividade antimicrobiana, o real mecanismo da ação antimicrobiana parece ser complexo e ainda não é completamente entendido (Koo et al., 2000). Isto deve ao fato da composição da própolis depender da flora da região onde é produzida. De acordo com o fabricante, o extrato de própolis utilizado neste estudo contém própolis verde e marrom, não sendo possível especificar exatamente a composição deste extrato. Ainda, a empresa fabricante realiza uma avaliação prévia das própolis de várias regiões do Brasil, existindo uma

fórmula padrão interna com quantidade mínima de flavonóides totais na sua composição final (5,0 mg/ml). Alguns autores atribuem aos flavonóides à maior capacidade de atuarem como agentes antimicrobianos (Grange e Davey, 1990; Burdock, 1998; Koo et al., 2000). O extrato de própolis utilizado neste estudo continha 5,63 mg/ml de flavonóides totais sendo eficaz sobre os microrganismos testados, confirmando assim, sua atividade antimicrobiana.

O extrato de gengibre utilizado neste estudo também foi fornecido pela empresa Apis Flora. De acordo com o certificado de análise deste extrato, para o seu preparo foi utilizado o rizoma desidratado do *Zingiber officinale Roscoe*, contendo 1,79 mg/ml de flavonóides totais, sendo a quantidade mínima padrão para todo o extrato 1,50 mg/ml. Assim, foi verificado que este extrato foi eficaz na eliminação dos microrganismos. No entanto, quando este foi utilizado como substância química auxiliar ao preparo biomecânico, foi verificada eliminação total de *C. albicans* do canal radicular, mas não de *E. faecalis* e *E. coli* (Aguiar, 2009), sugerindo que este extrato necessita de um tempo maior nos canais radiculares para que sua atividade antimicrobiana seja satisfatória.

A atividade antimicrobiana do gengibre também já foi elucidada por diversos autores. Park et al. (2008) verificaram esta atividade sobre três bactérias Gram-negativas anaeróbias, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* e *Prevotella intermedia*; Indu et al. (2007) relataram atividade antimicrobiana sobre *E. coli* e Grégio et al. (2006) observaram efetiva ação do extrato glicólico e alcoólico do gengibre sobre *S. mutans*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* e *C. albicans*. Da mesma forma que o extrato de própolis, apesar do extrato de gengibre possuir atividade antimicrobiana, o seu real mecanismo de ação ainda não está elucidado na literatura. Sabe-se apenas que o

gingerol é o principal princípio do gengibre, sendo este o responsável pelas propriedades benéficas deste produto (Park et al., 2008).

Os resultados da associação hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2% sobre *C. albicans* e *E. faecalis* neste estudo concordam com os estudos de Sirén et al. (2004), Ercan et al. (2006), Gomes et al. (2006), Souza-Filho et al. (2008), Gomes et al. (2009), Valera et al. (2009), que também verificaram ação desta medicação sobre os mesmos microrganismos utilizados. Além disto, esta associação é significativamente mais efetiva sobre *E. faecalis* e *C. albicans* do que a pasta de hidróxido de cálcio utilizada sozinha, devido ao efeito sinérgico entre as duas medicações (Evans et al., 2003; Al-Nazhan e Al-Obaida, 2008).

Em relação à quantidade de endotoxinas, após a utilização de medicação intracanal, os resultados mostraram redução significativa da endotoxina com todas as medicações testadas, com valores bem menores quando comparados ao grupo salina, o qual não recebeu nenhuma medicação. Entretanto, as medicações que continham hidróxido de cálcio na sua composição tanto quanto o hidróxido de cálcio sozinho, foram capazes de reduzir significativamente a quantidade de endotoxinas nos canais radiculares, sendo que em alguns espécimes, estas medicações foram capazes de inativar completamente as endotoxinas.

Estudos *in vitro* já mostraram que o hidróxido de cálcio é capaz de inativar endotoxinas. Safavi e Nichols, em 1993, verificaram que o hidróxido de cálcio hidrolisa o lipídeo A, resultando na liberação elevada de ácidos graxos livres. Em 1994, estes mesmos autores identificaram a produção de prostaglandinas E_2 nos sobrenadantes de monócitos estimulados pelo LPS, entretanto não a identificaram naqueles que foram tratados previamente com hidróxido de cálcio. Esses experimentos

sugeriram que a ação biológica do LPS requer a presença de ácidos graxos hidroxilados ligados a junção éster; entretanto, estas ligações são rompidas pelo tratamento com o hidróxido de cálcio. Ainda Barthel et al. (1997), verificaram que o hidróxido de cálcio é capaz de eliminar a capacidade do LPS de induzir a produção de TNF- α em monócitos periféricos do sangue. A redução na produção de IL-1 β foi observada também quando o LPS foi tratado com hidróxido de cálcio em um estudo *in vitro* realizado por Olsen et al. (1999).

Em estudo em cães, Nelson Filho et al. (2002) e Silva et al. (2002), concluíram que a endotoxina causa lesão periapical visível radiograficamente, entretanto quando associada ao hidróxido de cálcio, esta endotoxina fica desprovida de ação tóxica. Os resultados do presente estudo também concordam com os estudos de Nelson Filho et al., (2002) e de Tanomaru et al. (2003) que verificaram que o hidróxido de cálcio foi capaz de inativar os efeitos induzidos pela endotoxina.

Já a clorexidina, o extrato de própolis e o extrato de gengibre apenas reduziram a quantidade de endotoxinas, não sendo capazes de inativá-las completamente em nenhum dos espécimes. Embora a clorexidina seja comumente utilizada na prática endodôntica, este estudo verificou pouca efetividade desta substância sobre endotoxinas. Resultados semelhantes a este também foram encontrados por Oliveira et al. (2007); Tanomaru et al., (2003) e Maekawa et al., (2010).

Os resultados obtidos com o extrato de própolis concorda com o estudo de Valera et al. (2010) que verificaram que o preparo biomecânico realizado com extrato de própolis foi capaz de reduzir a quantidade de endotoxinas dos canais radiculares; no entanto Molina (2008) demonstrou que esta redução não foi significativa. Da mesma forma, os resultados deste trabalho também concordam com o estudo de

Aguiar (2009), que verificou redução significativa das endotoxinas nos canais radiculares, entretanto, este extrato foi utilizado como substância química auxiliar ao preparo biomecânico e não como medicação intracanal.

Neste estudo, verificou-se que todas as substâncias associadas ao hidróxido de cálcio, ou seja, a clorexidina, a própolis ou o gengibre, tanto quanto o hidróxido de cálcio associado à solução salina, foram as medicações intracanaís mais efetivas na neutralização das endotoxinas. Estudos de Maekawa et al. (2010) e Valera et al. (2010) também verificaram que associação hidróxido de cálcio e clorexidina, quando utilizada durante 14 dias, foi capaz de reduzir significativamente a quantidade de endotoxinas em canais radiculares. O mecanismo de ação destas associações sobre endotoxinas parece ser o mesmo mecanismo de ação do hidróxido de cálcio citado anteriormente, além de apresentarem maior ação antimicrobiana pela presença da clorexidina, própolis e gengibre.

Assim, de acordo com os resultados obtidos neste estudo, a associação do extrato de própolis ou de gengibre associados ao hidróxido de cálcio podem ser uma alternativa como medicação intracanal. Entretanto, estudos futuros sobre biocompatibilidade e interação química entre estes produtos, bem como pesquisas *in vivo* devem ser realizadas para permitir a sua utilização na terapia endodôntica.

Resta ainda saber a real significância da endotoxina presente no canal radicular após a eliminação de todos os microrganismos presentes no sistema de canais. Por quanto tempo esta endotoxina teria ação após a morte do microrganismo? Qual a significância clínica desta endotoxina após a morte do microrganismo? Qual a quantidade de endotoxina capaz de induzir ou manter uma lesão

periapical? Estas respostas devem ser objetos de estudo futuros, especialmente estudos clínicos longitudinais para melhor compreensão dos mecanismos de manutenção das lesões periapicais.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- a) Os extratos glicólicos de própolis e de *Zingiber officinale*, a clorexidina gel 2%, as associações hidróxido de cálcio e própolis, hidróxido de cálcio e gengibre e hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2% foram efetivos, sendo capazes de eliminar completamente *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* nos canais radiculares;
- b) A pasta de hidróxido de cálcio não foi capaz de eliminar completamente *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*;
- c) Todas as medicações intracanaais foram capazes de reduzir a quantidade de endotoxinas nos canais radiculares, entretanto, as medicações que possuem hidróxido de cálcio na sua composição foram mais eficazes.

8 REFERÊNCIAS*

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 RA, Sertié JA. Effect of hydroalcoholic extraxt of *Zingiber officinalis* rhizomes on LPS-induced rat airway hyperreactivity and lung inflammation. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2007 Oct-Nov;77(3-4):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.

Almeida RVD, Castro RD, Pereira MSV, Paulo MQ, Santos JP, Padilha WWN. Efeito clínico de solução anti-séptica à base de própolis em crianças cáries ativas. Pesqui Bras Odontoped Clin Integr. 2006 Jan-Abr;6(1):87-92.

Al-Nazhan S, Al-Obaida M. Effectiveness of a 2% chlorhexidine solution mixed with calcium hydroxide against *Candida albicans*. Aust Endod J. 2008 Dec;34(3):133-5.

Al-Shaher A, Wallace J, Agarwal S, Bretz W, Baugh D. Effect of propolis on human fibroblasts from pulp and periodontal ligament. J Endod. 2004 May;30(5):359-61.

* 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 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Awawdeh L, Al-Beitawi M, Hammad M. Effectiveness of propolis and calcium hydroxide as a short-term intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*: a laboratory study. Aust Endod J. 2009 Aug;35(2):52-8.

Ballal V, Kundabala M, Acharya S, Ballal M. Antimicrobial action of calcium hydroxide, chlorhexidine and their combination on endodontic pathogens. Aust Dent J. 2007 Jun;52(2):118-21.

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

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

Basrani B, Ghanem A, Tjaderhane L. Physical and chemical properties of chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medications. J Endod. 2004 Jun;30(6):413-7.

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 Aug;94(2):240-5.

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

Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). Food Chem Toxicol. 1998 Apr;36(4):347-63.

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

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

Caires LP, Aguiar APS, Maekawa LE, Valera MC, Koga-Ito CY. Avaliação *in vitro* da ação do extrato glicólico de gengibre e do hipoclorito de sódio sobre *Candida albicans*. *Braz Oral Res*. 2008 Sept;22(Suppl.1):99.

Carrof M, Karibian D, Cavaillon JM, Cavaillon NH. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes Infect*. 2002 Jul;4(9):915-26.

Csako G, Elin RJ, Hochstein D, Tsai CH. Physical and biological properties of U.S. standard endotoxin EC after exposure to ionizing radiation. *Infect Immun*. 1983 Jul;41(1):190-6.

Dahlén G, Bergenholtz G. Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps. *J Dent Res*. 1980 Jun;59(6):1033-40.

Dahlén G, Magnusson BC, Moller 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.

Dametto FR, Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza Filho FJ. *In vitro* assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005 Jun;99(6):768-72.

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

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

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

Evans MD, Baumgartner C, Khemaleelakul SU, Xia T. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. *J Endod*. 2003 May;29(5):338-9.

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

Ferreira CM, Rosa OPS, Torres AS, Ferreira FBA, Bernardinelli N. Activity of endodontic antibacterial agents against selected anaerobic bacteria. *Braz Dent J*. 2002;13(2):118-22.

Ferreira FBA, Torres SA, Rosa OPS, Ferreira CM, Garcia RB, Marcucci MC, et al. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 Nov;104(5):709-16.

Fouad AF, Zerella J, Barry J, Spangberg LS. Molecular detection of *Enterococcus* species in root canals of the therapy-resistant endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005 Jan;99(1):112-8. Erratum in: *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005 Feb;99(2):254.

Funari CS, Ferro VO, Mathor MB. Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. *J Ethnopharmacol*. 2007 May;111(2):206-12.

Geibel MA, Schu B, Callaway AS, Gleissner C, Willershausen B. Polymerase chain reaction-based simultaneous detection of selected bacterial species associated with closed periapical lesions. *Eur J Med Res*. 2005 Aug;10(8):333-8.

Gomes BP, Montagner F, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, et al. Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. J Dent. 2009 Jan;37(1):76-81.

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

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

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

Grange JM, Davey RW. Antibacterial properties of propolis (bee glue). J R Soc Med. 1990 Mar;83(3):159-60.

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

Haapasalo M, Orstavik D. *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. J Dent Res. 1987 Aug;66(8):1375-9.

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

Haenni S, Schmidlin PR, Mueller B, Sener B, Zehnder M. Chemical and antimicrobial properties of calcium hydroxide mixed with irrigating solutions. Int Endod J. 2003 Feb;36(2):100-5.

Haight-Ponce E, Endo H, Horiuchi H. Endotoxin activity measured by *limulus* assay. *Endod Dent Traumatol*. 1999 Jun;15(3):109-12.

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.

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

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.

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

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

Khabbaz MG, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in caries: association with pulpal pain. *Int Endod J*. 2000 Mar;33(2):132-7.

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

Khan AA, Sun X, Hargreaves KM. Effect of calcium hydroxide on proinflammatory cytokines and neuropeptides. J Endod. 2008 Nov;34(11):1360-3.

Khayyal MT, El-Ghazalv MA, El-Khatib AS. Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract [abstract online]. Drugs Exp Clin Res. 1993;19(5):197-203. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.gov/PubMed>.

Komorowski R, Grad H, Wu XY, Friedman S. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine-treated bovine root dentine. J Endod. 2000 Jun;26(6):315-7.

Koo H, Gomes BPFA, Rosalen PL, Ambrosano GMB, Park YK, Cury JA. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and *Amica Montana* against oral pathogens. Arch Oral Biol. 2000(a) Feb;45(2):141-8.

Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Ambrosano GM, Murata RM, Yatsuda R, et al. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on *mutans Streptococci*. Curr Microbiol. 2000(b) Sep;41(3):129-6.

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

Leonardo MR, Rossi MA, Silva LAB, Ito IY, Bonifácio KC. EM Evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. J Endod. 2002(a) Dec;28(12):815-8.

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

Leonardo MR, Silveira FF, Silva LAB, Tanomaru Filho M, Utrilla LS. Calcium hydroxide root canal dressing. Histopathological evaluation of periapical repair at different time periods. Braz Dent J. 2002(b),13(1):17-22.

Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LAB, Nelson Filho P, Bonifácio KC, Ito IY. *In vivo* antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. J Endod. 1999 Mar;25(3):167-71.

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

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.

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

Lotufo MA. Análise da citotoxicidade *in vitro* da solução de própolis em propilenoglicol [Tese]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (SP): Universidade de São Paulo – USP; 2003.

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

Maekawa LE, Chung A, Valera MC, Oliveira LD, Carvalho CAT, Koga-Ito CY, et al. Ação do extrato de mamona e medicamentos sobre *Escherichia coli* e sua endotoxina em canais radiculares. Braz Oral Res. 2008 Sept;22(Suppl.1):243.

Maekawa LE, Lamping R, Nassri MRG. Identificação e análise dos microorganismos presentes em canais radiculares com mortificação pulpar. Revista Paulista de Odontologia. 2006 Jan-Mar;28(1):38-41.

Maekawa LE, Valera MC, Carvalho CAT, Koga-Ito CY, Jorge AOC. In vitro evaluation of the action of irrigation solutions associated with intracanal medications on *Escherichia coli* and its endotoxins in root canals. J Appl Oral Sci. 2010 (no prelo).

Martin MP, Pillegi R. A quantitative analysis of propolis: a promising new storage media following avulsion. Dent Traumatol. 2004 Apr;20(2):85-89.

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.

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.

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

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

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

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

Molina FP, Majewski M, Perrela FA, Oliveira LD, Junqueira JC, Jorge AOC. Própolis, sálvia, calêndula e mamona – atividade antifúngica de extratos naturais sobre cepas de *Candida albicans*. Cienc Odontol Bras. 2008 Abr./Jun;11(2):86-93.

Molina FP. Associação de *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e *Escherichia coli* em canais radiculares e avaliação dos efeitos de extratos naturais sobre microrganismos e endotoxinas [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista – UNESP; 2008.

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

Najzar-Fleger D, Filipovic D, Prpic G, Kobler D. *Candida* in root canal in accordance with oral ecology [abstract]. Int Endod J. 1992 Jan;25(1):40.

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

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

Nissan R, Segal H, Pashley D, Stevens R, Trowbridge. Ability of bacterial endotoxin to diffuse through human dentin. J Endod. 1995 Feb;21(2):62-4.

Ojewole JAO. Analgesic, antiinflammatory and hypoglycaemic effects of ethanol extract of *Zingiber officinale* (Roscoe) rhizomes (Zingiberaceae) in mice and rats. Phytoter Res. 2006 Sep;20(9):764-72.

Oliveira LD, Carvalho CAT, Valera MC, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Diffusion ability of endotoxin through dentinal tubules. Braz Oral Res. 2005 Jan-Mar;19(1):5-10.

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 MVP, 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. 2005 Feb;33(2):107-14.

Olsen MH, DiFiore PM, Dixit SN, Veis A. The effects of calcium hydroxide inhibition on LPS induced release of IL-1 β from human monocytes in whole blood [abstract OR 30]. J Endod. 1999;25(4) (sp.iss):289.

Onçag O, Cogulu D, Uzel A, Sorkun K. Efficacy of propolis as na intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*. Gen Dent. 2006 Sep-Oct;54(5):319-22.

Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. Endod Dent Traumatol. 1990 Aug;6(4):142-9.

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

Park YK, Koo MH, Abreu JA, Ikegaki M, Cury JA, Rosalen PL. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. Curr Microbiol. 1998 Jan;36(1):24-8.

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

Peciulienė V, Reynaus AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeast and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. Int Endod J. 2001 Sep;34(6):429-34.

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 Ib166]. Pesqui Odontol Bras. 2003;17(Supl.2):76.

Pessa M, Bardeli LS, Pinto CP, Brum R, Caldas DBM, Grégio AMT, et al. Efeito do gel de gengibre e do peróxido de carbamida no processo de reparo de lesões ulceradas de mucosa oral de ratos - Análise histopatológica [resumo Ple192]. Braz Oral Res. 2008; 22(Suppl.1):142.

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

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

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

Podbielski A, Spahr A, Haller B. Additive antimicrobial activity of calcium hydroxide and chlorhexidine on common endodontic bacterial pathogens. J Endod. 2003 May;29(5):340-5.

Poorani S, Miglani R, Srinivasan MR. Comparative evaluation of the surface tension and the pH of calcium hydroxide mixed with five different vehicles: an *in vitro* study. Indian J Dent Res. 2009 Jan-Mar;20(1):17-20.

Rezende GPSR, Costa LRRS, Pimenta FC, Baroni DA. *In vitro* antimicrobial activity of endodontic pastes with propolis extracts and calcium hydroxide: a preliminary study. Braz Dent J. 2008;19(4):301-5.

Sabir A, Tabbu CR, Agustiono P, Sosroseno W. Histological analysis of rat dental pulp tissue capped with propolis. J Oral Sci. 2005 Sep;47(3):135-8.

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

Safavi KE, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. J Endod. 1993 Feb;19(2):76-9.

Sakamoto M, Siqueira JR Jr, Rôças IN, Benno Y. Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. Oral Microbiol Immunol. 2008 Aug;23(4):275-81.

Salvia ACRD, Koga-Ito CY, Maekawa LE, Valera MC, Jorge AOC, Carvalho CAT, et al. Análise da clorexidina gel 2% e medicações intracanaís sobre *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* inoculados em canais radiculares [resumo Ia038]. Braz Oral Res. 2007;21(Suppl.1):65.

Sanchez-Ayala A, Silveira CMM, Santos EB. Adição de própolis ao hidróxido de cálcio e sua influência na ação bacteriana. Cienc Odontol Bras. 2008 Jul-Sep;11(3):81-6.

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

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

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

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

Semenoff TADV, Semenoff Segundo A, Figueiredo JAP. Biocompatibility of different intracanal medications in rat buccal submucosa tissue. J Appl Oral Sci. 2008 Feb;16(1):12-7.

Sen BH, Piskin B, Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. *Endod Dent Traumatol*. 1995 Feb;11(1):6-9.

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

Silva FB, Ameida JM, Sousa, SMG. Natural medicaments in endodontics – a comparative study of anti-inflammatory action. *Braz Oral Res*. 2004 Apr-Jun;18(2):174-9.

Silva LAB, Leonardo MR, Assed S, Tanomaru Filho M. Histological study of the effect of some irrigating solutions on bacterial endotoxin in dogs. *Braz Dent J*. 2004;15(2):109-114.

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

Siqueira JF Jr, Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004 May;97(5):632-41.

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

Siqueira JF, Rôças IN, Lopes HP. Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002 Feb;93(2):174-8.

Siqueira JF, Rôças IN, Souto RS, Uzeda M, Colombo AP. Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001 Oct;92(4):451-7.

Siqueira 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 Jan;97(1):85-94.

Siqueira 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.

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

Sirén EK, Haapasalo MPP, Waltimo TMT, Orstavik D. *In vitro* antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodine on *Enterococcus faecalis*. *Eur J Oral Sci.* 2004 Aug;112(4):326-31.

Sjögren U, Figdor D, Spangberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J.* 1991. May;24(3):119-25.

Soares JA, Leonardo MR, Silva LAB, Tanomaru Filho M, Ito IY. Effect of rotatory instrumentation and of the association of calcium hydroxide and chlorhexidine on the antiseptics of the root canal system in dogs. *Braz Oral Res.* 2006 Apr-Jun;20(2):120-6.

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

Stashenko P. Role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. *Endod Dent Traumatol.* 1990 Jun;6(3):89-96.

Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. *J Endod.* 2002 Apr;28(4):304-10.

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 Oral Radiol Endod.* 1998 Jan;85(1):86-93.

Takahashi G, Hosoya N, Takizawa H, Nakamura J. Periapical environment after applying Ca(OH)_2 into root canals *in vitro* [abstract 276]. *J Dent Res* 1996;75(suppl.):52.

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

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

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 Jan;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, Rosa JA, Maekawa LE, Oliveira LD, Carvalho CA, Koga-Ito CY, et al. Action of propolis and medications against *Escherichia coli* and endotoxin in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010 (no prelo).

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.

Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Feres M, Gomes BPFA. Comparative analysis of endodontic pathogens using checkerboard hybridization in relation to culture. *Oral Microbiol Immunol.* 2008 Aug;23(4):282-90.

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

Waltimo TMT, Orstavik D, Sirén EK, Haapasalo MPP. *In vitro* yeast infection of human dentin. *J Endod*. 2000 Apr;26(4):207-9.

Waltimo TMT, Sirén EK, Orstavik D, Haapasalo PP. Susceptibility of oral *Candida* species to calcium hydroxide *in vitro*. *Int Endod J*. 1999 Mar;32(2):94-8.

Waltimo TMT, Sirén EK, Torkko HLK, Olsen I, Haapasalo MPP. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *Int Endod J*. 1997 Mar;30(2):96-101.

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

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

White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod*. 1997 Apr;23(4):229-31.

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

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

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

APÊNDICE A – Resultados obtidos pela contagem de UFC/ml (log10) nos canais radiculares

Tabela 8: Resultados obtidos: valores de UFC/ml (log10) no grupo Ca(OH)₂ e salina

Dente	Confirmação	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
<i>C. albicans</i>				
1	5,93	4,51	0	2,00
2	6,40	5,90	4,41	4,60
3	5,94	3,47	0	0
4	6,13	4,79	0	2,00
5	6,34	3,60	0	3,93
6	6,23	3,00	0	0
7	6,79	3,90	0	0
8	6,56	3,90	0	0
9	5,95	4,49	0	0
10	5,50	5,02	0	0
11	5,99	4,61	2,60	0
12	6,22	5,11	0	0
Média	6,16	4,35	0,58	1,04
<i>E. faecalis</i>				
1	6,70	6,40	0	0
2	6,50	6,17	2,49	4,24
3	7,17	5,51	0	0
4	6,95	6,19	0	3,44
5	7,08	4,84	0	3,38
6	7,59	5,68	0	0
7	7,49	5,56	0	2,46
8	7,20	5,65	0	0
9	7,19	5,25	0	0
10	7,16	5,57	0	3,68
11	6,32	5,73	0	0
12	7,18	4,90	0	0
Média	7,04	5,62	0,20	1,43
<i>E. coli</i>				
1	5,63	5,02	0	0
2	6,73	6,41	0	0
3	6,67	5,24	0	0
4	6,58	5,30	0	0
5	5,98	5,32	0	0
6	5,56	4,66	0	0
7	5,64	4,79	0	0
8	7,39	6,13	0	0
9	6,31	4,79	0	0
10	6,96	5,20	0	0
11	7,02	5,40	0	0
12	5,69	5,11	0	0
Média	6,34	5,28	0	0

Tabela 9: Resultados obtidos: valores de UFC/ml (log10) no grupo CLX

Dente	Confirmação	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
<i>C. albicans</i>				
1	6,94	4,44	0	0
2	6,72	4,34	0	0
3	6,88	4,38	0	0
4	6,79	4,07	0	0
5	6,51	3,30	0	0
6	6,62	3,00	0	0
7	6,41	0	0	0
8	5,39	3,90	0	0
9	6,51	3,30	0	0
10	6,38	4,04	0	0
11	6,14	4,04	0	0
12	5,93	3,00	0	0
Média	6,43	3,48	0	0
<i>E. faecalis</i>				
1	7,04	6,04	0	0
2	6,74	5,87	0	0
3	7,12	5,79	0	0
4	6,97	5,25	0	0
5	6,83	5,96	0	0
6	7,05	5,07	0	0
7	7,07	5,34	0	0
8	6,35	4,14	0	0
9	6,86	4,73	0	0
10	6,78	5,00	0	0
11	6,50	4,53	0	0
12	6,66	4,23	0	0
Média	6,83	5,16	0	0
<i>E. coli</i>				
1	6,98	6,35	0	0
2	6,49	5,38	0	0
3	7,07	4,50	0	0
4	7,64	4,66	0	0
5	5,32	5,20	0	0
6	6,01	5,40	0	0
7	7,05	5,13	0	0
8	7,23	4,57	0	0
9	7,53	4,92	0	0
10	7,12	4,94	0	0
11	7,74	3,69	0	0
12	4,63	3,95	0	0
Média	6,73	4,89	0	0

Tabela 10: Resultados obtidos: valores de UFC/ml (log10) no grupo Ca(OH)_2 + CLX

Dente	Confirmação	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
<i>C. albicans</i>				
1	4,64	3,38	0	0
2	5,92	2,69	0	0
3	4,69	3,00	0	0
4	5,80	0	0	0
5	6,18	2,90	0	0
6	6,21	2,95	0	0
7	6,40	4,21	0	0
8	4,99	2,90	0	0
9	6,20	3,86	0	0
10	6,21	4,11	0	0
11	6,26	4,62	0	0
12	6,15	3,87	0	0
Média	5,80	3,20	0	0
<i>E. faecalis</i>				
1	7,31	4,72	0	0
2	7,04	4,77	0	0
3	7,11	4,04	0	0
4	7,44	4,60	0	0
5	7,62	4,64	0	0
6	7,35	4,34	0	0
7	7,57	4,70	0	0
8	6,41	5,17	0	0
9	7,56	4,90	0	0
10	7,25	5,20	0	0
11	7,54	4,90	0	0
12	7,63	5,44	0	0
Média	7,31	4,78	0	0
<i>E. coli</i>				
1	3,66	2,26	0	0
2	7,48	6,11	0	0
3	6,80	5,24	0	0
4	6,88	5,65	0	0
5	7,78	5,62	0	0
6	7,26	5,79	0	0
7	7,92	5,59	0	0
8	7,72	6,54	0	0
9	6,98	6,42	0	0
10	7,08	6,65	0	0
11	6,89	6,57	0	0
12	7,60	6,62	0	0
Média	7,04	5,75	0	0

Tabela 11: Resultados obtidos: valores de UFC/ml (log10) no grupo PRO

Dente	Confirmação	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
<i>C. albicans</i>				
1	7,58	5,02	0	0
2	7,28	0	0	0
3	7,44	4,66	0	0
4	7,02	3,43	0	0
5	7,13	5,13	0	0
6	6,98	2,84	0	0
7	7,21	5,25	0	0
8	6,97	2,60	0	0
9	7,27	2,00	0	0
10	7,15	3,84	0	0
11	6,97	0	0	0
12	6,73	4,17	0	0
Média	7,14	3,24	0	0
<i>E. faecalis</i>				
1	6,72	5,14	0	0
2	7,03	3,00	0	0
3	7,03	4,69	0	0
4	6,81	3,90	0	0
5	7,03	4,90	0	0
6	7,02	4,30	0	0
7	7,23	5,00	0	0
8	6,83	4,38	0	0
9	7,08	4,17	0	0
10	7,18	4,90	0	0
11	7,19	4,25	0	0
12	6,77	5,11	0	0
Média	6,99	4,47	0	0
<i>E. coli</i>				
1	7,51	5,52	0	0
2	7,39	4,41	0	0
3	7,49	4,50	0	0
4	7,07	4,51	0	0
5	7,52	5,67	0	0
6	6,00	3,04	0	0
7	5,66	3,44	0	0
8	7,44	4,60	0	0
9	7,35	5,47	0	0
10	7,40	5,45	0	0
11	7,22	3,83	0	0
12	7,05	5,52	0	0
Média	7,09	4,66	0	0

Tabela 12: Resultados obtidos: valores de UFC/ml (log10) no grupo PRO + Ca(OH)₂

Dente	Confirmação	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
<i>C. albicans</i>				
1	4,27	0	0	0
2	6,08	0	0	0
3	7,20	4,56	0	0
4	6,65	3,68	0	0
5	7,20	5,35	0	0
6	7,28	3,50	0	0
7	6,96	2,00	0	0
8	6,80	5,13	0	0
9	6,70	3,65	0	0
10	7,19	5,42	0	0
11	6,00	2,00	0	0
12	3,96	2,00	0	0
Média	6,35	3,10	0	0
<i>E. faecalis</i>				
1	4,69	4,00	0	0
2	7,76	4,17	0	0
3	6,68	4,84	0	0
4	6,90	5,14	0	0
5	6,87	5,11	0	0
6	6,88	5,07	0	0
7	6,88	4,43	0	0
8	6,77	5,36	0	0
9	6,32	4,25	0	0
10	6,99	5,74	0	0
11	5,27	4,00	0	0
12	4,83	4,39	0	0
Média	6,40	4,70	0	0
<i>E. coli</i>				
1	4,00	2,60	0	0
2	7,35	3,38	0	0
3	7,10	5,48	0	0
4	7,16	5,22	0	0
5	5,96	5,42	0	0
6	5,96	5,42	0	0
7	7,02	3,88	0	0
8	7,26	5,64	0	0
9	7,35	3,44	0	0
10	7,47	5,29	0	0
11	5,89	5,26	0	0
12	4,90	4,80	0	0
Média	6,45	4,65	0	0

Tabela 13: Resultados obtidos: valores de UFC/ml (log10) no grupo GENG

Dente	Confirmação	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
<i>C. albicans</i>				
1	7,47	5,14	0	0
2	7,51	4,79	0	0
3	7,57	4,07	0	0
4	7,29	3,44	0	0
5	7,02	2,60	0	0
6	7,31	3,71	0	0
7	6,86	2,90	0	0
8	5,34	3,56	0	0
9	6,86	2,77	0	0
10	7,39	4,65	0	0
11	7,34	4,53	0	0
12	7,45	4,38	0	0
Média	7,11	3,87	0	0
<i>E. faecalis</i>				
1	6,63	5,25	0	0
2	7,20	5,14	0	0
3	7,07	4,04	0	0
4	6,94	3,69	0	0
5	6,66	5,14	0	0
6	7,27	4,00	0	0
7	6,69	3,47	0	0
8	7,01	3,47	0	0
9	6,66	4,30	0	0
10	6,76	4,30	0	0
11	7,22	4,90	0	0
12	6,99	5,55	0	0
Média	6,92	4,43	0	0
<i>E. coli</i>				
1	5,95	4,76	0	0
2	7,38	5,10	0	0
3	5,77	5,00	0	0
4	6,21	5,16	0	0
5	5,20	4,94	0	0
6	3,32	0	0	0
7	6,83	6,01	0	0
8	7,39	3,69	0	0
9	7,04	5,89	0	0
10	7,13	5,31	0	0
11	6,67	5,25	0	0
12	5,23	4,44	0	0
Média	6,17	4,62	0	0

Tabela 14: Resultados obtidos: valores de UFC/ml (log10) no grupo GENG + Ca(OH)

Dente	Confirmação	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
<i>C. albicans</i>				
1	7,43	4,89	0	0
2	7,45	5,31	0	0
3	7,59	5,51	0	0
4	7,08	3,20	0	0
5	7,29	5,16	0	0
6	7,04	2,69	0	0
7	7,59	5,44	0	0
8	6,98	5,45	0	0
9	7,36	4,93	0	0
10	7,22	5,33	0	0
11	7,32	3,86	0	0
12	6,93	2,69	0	0
Média	7,27	4,53	0	0
<i>E. faecalis</i>				
1	6,83	4,83	0	0
2	7,30	4,99	0	0
3	6,83	5,08	0	0
4	6,69	4,84	0	0
5	7,20	4,93	0	0
6	6,81	4,77	0	0
7	7,36	5,17	0	0
8	6,57	4,55	0	0
9	7,07	4,76	0	0
10	6,89	5,07	0	0
11	6,44	4,62	0	0
12	5,51	4,50	0	0
Média	6,79	4,84	0	0
<i>E. coli</i>				
1	7,51	5,27	0	0
2	7,49	5,13	0	0
3	6,85	5,14	0	0
4	6,63	5,36	0	0
5	6,47	5,11	0	0
6	7,29	3,74	0	0
7	7,38	5,18	0	0
8	7,36	5,37	0	0
9	7,08	5,17	0	0
10	7,30	5,33	0	0
11	6,77	5,33	0	0
12	7,48	5,45	0	0
Média	7,13	5,13	0	0

Tabela 15: Resultados obtidos: valores de UFC/ml (log10) no grupo Salina

Dente	Confirmação	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
<i>C. albicans</i>				
1	5,80	3,60	3,60	4,77
2	5,69	0	2,60	4,39
3	6,38	4,04	3,56	5,16
4	6,04	4,90	2,95	5,30
5	6,17	3,90	4,20	4,07
6	6,14	3,95	3,07	4,95
7	6,41	4,44	2,69	4,87
8	5,17	4,25	2,00	3,30
9	5,60	4,14	2,69	4,91
10	5,77	4,11	3,14	3,77
11	5,47	0	4,56	5,85
12	6,07	4,55	3,84	4,32
Média	5,89	3,49	3,24	4,63
<i>E. faecalis</i>				
1	6,98	4,47	5,07	5,58
2	6,74	4,46	3,69	5,67
3	7,33	5,55	4,64	5,60
4	6,74	4,77	4,20	5,32
5	7,32	4,95	3,69	5,13
6	7,08	5,39	4,25	5,37
7	7,46	4,60	4,27	5,38
8	5,90	5,07	4,34	3,88
9	6,73	5,11	4,90	4,52
10	6,75	5,47	5,07	5,13
11	6,56	4,50	3,74	5,24
12	6,90	4,93	4,60	4,81
Média	6,87	4,93	4,37	5,13
<i>E. coli</i>				
1	7,46	4,88	4,44	5,71
2	7,45	4,84	4,89	5,90
3	7,54	5,25	5,08	5,77
4	7,54	5,20	4,39	5,65
5	7,59	4,53	4,36	5,72
6	7,07	4,92	4,15	5,83
7	7,43	4,81	4,14	5,77
8	7,26	4,36	4,47	5,32
9	6,92	4,89	5,55	5,81
10	7,62	5,80	5,32	5,67
11	6,85	4,59	4,50	5,86
12	7,29	4,66	4,00	5,71
Média	7,33	4,89	4,60	5,72

APÊNDICE B – Resultados obtidos pelo teste de quantificação de endotoxinas nos canais radiculares e percentuais de alteração obtidos em relação a coleta de confirmação

Tabela 16 – Resultados obtidos: quantidade de endotoxinas de *E. coli* (EU/ml) no grupo Ca(OH)_2 + Salina

Dente	Confirmação	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
1	53500	646	0,00	8,63
2	533000	14700	20,5	27,2
3	215000	7580	0,00	0,00
4	260000	3500	7,74	0,00
5	285000	1070	8,37	27,7
6	457000	481	0,00	0,00
7	88700	1230	0,00	11,8
8	119000	474	12,6	7,36
9	61000	749	0,00	0,00
10	162000	746	0,00	0,00
11	31900	841	0,00	0,00
12	172000	918	17,1	0,00
Média	203175	2745	5,53	6,89

Tabela 17 – Percentuais de alteração obtidos na 1ª, 2ª e 3ª coletas em relação a coleta de confirmação da quantidade de endotoxinas (EU/ml) no grupo Ca(OH)_2 + Salina

Dente	1ª col. X conf.	2ª col. X conf.	3ª col. X conf.
1	98,793	100,000	99,984
2	97,242	99,996	99,995
3	96,474	100,000	100,000
4	98,654	99,997	100,000
5	99,625	99,997	99,990
6	99,895	100,000	100,000
7	98,613	100,000	99,987
8	99,602	99,989	99,994
9	98,772	100,000	100,000
10	99,540	100,000	100,000
11	97,364	100,000	100,000
12	99,466	99,990	100,000
Média	98,670	99,997	99,996

Tabela 18 – Resultados obtidos: quantidade de endotoxinas de *E. coli* (EU/ml) no grupo CLX

Dente	Confirmação	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
1	35400	126	370	211
2	82600	331	1100	2420
3	120000	1420	1070	592
4	32200	297	7100	11600
5	34400	358	9770	1630
6	26300	170	127	30,2
7	20100	229	410	3210
8	34400	568	879	1670
9	86200	1860	1870	1660
10	32900	366	341	2660
11	10300	995	1470	6320
12	2670	51,1	62,1	294
Média	43123	564	2047	2691

Tabela 19 – Percentuais de alteração obtidos na 1ª, 2ª e 3ª coletas em relação a coleta de confirmação da quantidade de endotoxinas (EU/ml) no grupo CLX

Dente	1ª col. X conf.	2ª col. X conf.	3ª col. X conf.
1	99,644	98,955	99,404
2	99,599	98,668	97,070
3	98,817	99,108	99,507
4	99,078	77,950	63,975
5	98,959	71,599	95,262
6	99,354	99,517	99,885
7	98,861	97,960	84,030
8	98,349	97,445	95,145
9	97,842	97,831	98,074
10	98,888	98,964	91,915
11	90,340	85,728	38,641
12	98,086	97,674	88,989
Média	98,151	93,450	87,660

Tabela 20 – Resultados obtidos: quantidade de endotoxinas de *E. coli* (EU/ml) no grupo Ca(OH)_2 + CLX

Dente	Confirmação	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
1	33500	468	43,6	40,7
2	251000	2200	0,00	0,00
3	71000	171	13,3	60,2
4	500000	222	49,8	147
5	500000	713	35,0	138
6	213000	749	15,0	63,2
7	362000	2930	0,00	0,00
8	18300	492	14,7	26,0
9	160000	1860	86,1	19,2
10	800000	1430	27,7	29,8
11	255000	5410	64,4	93,3
12	373000	7790	0,00	0,00
Média	294733	2036	29,13	51,5

Tabela 21 – Percentuais de alteração obtidos na 1ª, 2ª e 3ª coletas em relação a coleta de confirmação da quantidade de endotoxinas (EU/ml) no grupo Ca(OH)_2 + CLX

Dente	1ª col. X conf.	2ª col. X conf.	3ª col. X conf.
1	98,603	99,870	99,879
2	99,124	100,000	100,000
3	99,759	99,981	99,915
4	99,956	99,990	99,971
5	99,857	99,993	99,972
6	99,648	99,993	99,970
7	99,191	100,000	100,000
8	97,311	99,920	99,858
9	98,838	99,946	99,988
10	99,821	99,997	99,996
11	97,878	99,975	99,963
12	97,912	100,000	100,000
Média	98,991	99,972	99,959

Tabela 22 – Resultados obtidos: quantidade de endotoxinas de *E. coli* (EU/ml) no grupo PRO

Dente	Confirmação	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
1	500000	9370	815	2690
2	500000	196	1170	2400
3	500000	19400	729	796
4	51500	5860	132	825
5	14400	26900	231	1670
6	66100	316	20,9	8,77
7	500000	420	68,9	61,3
8	500000	1000	136	242
9	500000	160	87,1	130
10	500000	3870	98,9	149
11	94300	1180	126	79,3
12	500000	2810	1450	196
Média	352192	5957	422	771

Tabela 23 – Percentuais de alteração obtidos na 1ª, 2ª e 3ª coletas em relação a coleta de confirmação da quantidade de endotoxinas (EU/ml) no grupo PRO

Dente	1ª col. X conf.	2ª col. X conf.	3ª col. X conf.
1	98,126	99,837	99,462
2	99,961	99,766	99,520
3	96,120	99,854	99,841
4	88,621	99,744	98,398
5	-86,806	98,396	88,403
6	99,522	99,968	99,987
7	99,916	99,986	99,988
8	99,800	99,973	99,952
9	99,968	99,983	99,974
10	99,226	99,980	99,970
11	98,749	99,866	99,916
12	99,438	99,710	99,961
Média	82,700	99,755	98,781

Tabela 24 – Resultados obtidos: quantidade de endotoxinas de *E. coli* (EU/ml) no grupo PRO + Ca(OH)₂

Dente	Confirmação	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
1	500000	588	29,3	24,2
2	500000	1530	0,00	7,42
3	500000	4120	16,0	15,9
4	130000	565	44,8	14,9
5	500000	3960	13,2	11,9
6	500000	1670	6,39	19,0
7	500000	2580	0,00	0,00
8	59700	13100	16,9	38,5
9	32000	746	0,00	0,00
10	500000	43200	0,00	0,00
11	500000	14500	8,35	11,5
12	72400	94,8	0,00	0,00
Média	357842	7221	11,24	11,94

Tabela 25 – Percentuais de alteração obtidos na 1ª, 2ª e 3ª coletas em relação a coleta de confirmação da quantidade de endotoxinas (EU/ml) no grupo PRO + Ca(OH)₂

Dente	1ª col. X conf.	2ª col. X conf.	3ª col. X conf.
1	99,882	99,994	99,995
2	99,694	100,000	99,999
3	99,176	99,997	99,997
4	99,565	99,966	99,989
5	99,208	99,997	99,998
6	99,666	99,999	99,996
7	99,484	100,000	100,000
8	78,057	99,972	99,936
9	97,669	100,000	100,000
10	91,360	100,000	100,000
11	97,100	99,998	99,998
12	99,869	100,000	100,000
Média	96,730	99,994	99,992

Tabela 26 – Resultados obtidos: quantidade de endotoxinas de *E. coli* (EU/ml) no grupo GENG

Dente	Confirmação	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
1	500000	4570	494	300
2	50000	1470	399	979
3	50000	1280	196	754
4	500000	499	43,7	154
5	272000	1540	224	449
6	500000	394	1380	1490
7	500000	2200	835	9630
8	500000	206	19,9	73,6
9	500000	964	293	1530
10	166000	517	167	838
11	500000	2540	20,0	40,8
12	500000	2480	1190	3090
Média	378167	1555	438	1611

Tabela 27 – Percentuais de alteração obtidos na 1ª, 2ª e 3ª coletas em relação a coleta de confirmação da quantidade de endotoxinas (EU/ml) no grupo GENG

Dente	1ª col. X conf.	2ª col. X conf.	3ª col. X conf.
1	99,086	99,901	99,940
2	97,060	99,202	98,042
3	97,440	99,608	98,492
4	99,900	99,991	99,969
5	99,434	99,918	99,835
6	99,921	99,724	99,702
7	99,560	99,833	98,074
8	99,959	99,996	99,985
9	99,807	99,941	99,694
10	99,689	99,899	99,495
11	99,492	99,996	99,992
12	99,504	99,762	99,382
Média	99,238	99,814	99,384

Tabela 28 – Resultados obtidos: quantidade de endotoxinas de *E. coli* (EU/ml) no grupo GENG + Ca(OH)₂

Dente	Confirmação	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
1	83300	551	61,9	117
2	500000	7240	0,00	0,00
3	81600	1320	0,00	0,00
4	17400	2880	90,9	39,6
5	349000	6530	19,5	32,0
6	5410	5410	13,4	12,0
7	312000	4290	0,00	0,00
8	86200	4070	37,0	13,9
9	76900	1070	0,00	7,07
10	110000	2900	0,00	0,00
11	189000	2020	16,5	20,4
12	114000	1080	0,00	0,00
Média	160401	3280	19,93	20,16

Tabela 29 – Percentuais de alteração obtidos na 1ª, 2ª e 3ª coletas em relação a coleta de confirmação da quantidade de endotoxinas (EU/ml) no grupo GENG + Ca(OH)₂

Dente	1ª col. X conf.	2ª col. X conf.	3ª col. X conf.
1	99,339	99,926	99,860
2	98,552	100,000	100,000
3	98,382	100,000	100,000
4	83,448	99,478	99,772
5	98,129	99,994	99,991
6	0,000	99,752	99,778
7	98,625	100,000	100,000
8	95,278	99,957	99,984
9	98,609	100,000	99,991
10	97,364	100,000	100,000
11	98,931	99,991	99,989
12	99,053	100,000	100,000
Média	88,810	99,925	99,947

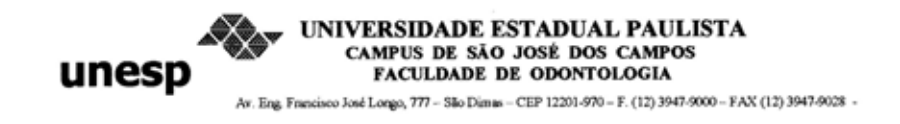
Tabela 30 – Resultados obtidos: quantidade de endotoxinas de *E. coli* (EU/ml) no grupo solução salina

Dente	Confirmação	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
1	52000	3950	24200	78000
2	32500	1510	710	23400
3	104000	8320	7060	43100
4	93300	3800	3640	23000
5	55200	1390	5030	32200
6	38600	3950	5610	19700
7	100000	2990	7480	13800
8	1930	5310	4710	7700
9	20200	3420	5480	73000
10	41700	4680	9630	55900
11	24300	403	2240	9300
12	49000	135000	1050	63300
Média	51061	14560	6403	36867

Tabela 31 – Percentuais de alteração obtidos na 1ª, 2ª e 3ª coletas em relação a coleta de confirmação da quantidade de endotoxinas (EU/ml) no grupo solução salina

Dente	1ª col. X conf.	2ª col. X conf.	3ª col. X conf.
1	92,404	53,462	-50,000
2	95,354	97,815	28,000
3	92,000	93,212	58,558
4	95,927	96,099	75,348
5	97,482	90,888	41,667
6	89,767	85,466	48,964
7	97,010	92,520	86,200
8	-175,130	-144,041	-298,964
9	83,069	72,871	-261,386
10	88,777	76,906	-34,053
11	98,342	90,782	61,728
12	-175,510	97,857	-29,184
Média	48,300	67,000	-22,800

Anexo A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa


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

São José dos Campos, 18 de maio de 2010

Ofício nº 035/10-CEP

Prezado(a) Sr.(a)	LILIAN EIKO MAEKAWA
Projeto	Avaliação in vitro da ação de medicações intracanaís sobre <i>Cândida albicans</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> e sua endotoxina em canais radiculares
PARECER	
Por solicitação da Pesquisadora Responsável, foi alterado o título do Projeto acima mencionado, para "Avaliação dos extratos de própolis e de gengibre como medicação intracanal sobre microrganismos e endotoxinas em canais radiculares!" Convalidando dessa forma o Protocolo nº 06/2008-PH/CEP de 28/03/2008	

Atenciosamente,


Profa. Adjunto JANETE DIAS ALMEIDA
Coordenadora

Maekawa LE. *Evaluation of propolis and ginger extracts used as intracanal medications on microorganisms and endotoxins in root canals [doctorate thesis].* São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2010.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the effectiveness of glycolic propolis and ginger extracts, calcium hydroxide, chlorhexidine gel and associations as intracanal medication (ICM) on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and endotoxins in root canals. Ninety-six roots of single-rooted teeth were contaminated with suspensions of the microorganisms for 28 days. After the confirmation collection, the canals were instrumented with saline and divided according to the intracanal medication used: calcium hydroxide [Ca(OH)₂] + saline; 2% chlorhexidine gel (CLX); Ca(OH)₂ + CLX; propolis (PRO); PRO + Ca(OH)₂; ginger (GENG); GENG + Ca(OH)₂; saline. Samples of the root canal content were performed in the following periods: confirmation collection (after 28 days of contamination), 1st collection (immediately after instrumentation), 2nd collection (immediately after 14 days of the action of ICM), 3rd collection (7 days after removal of the ICM). All samples were analyzed according to the following parameters: a) antimicrobial activity, b) quantification of endotoxins by the chromogenic *Limulus amoebocyte* lysate assay. The results were statistically analyzed by the Kruskal-Wallis and Dunn tests (5%). It was verified that all ICM were able to eliminate the microorganisms from the root canals; however, the Ca(OH)₂ was not able to completely eliminate *C. albicans* and *E. faecalis*. It was verified that ICM containing Ca(OH)₂ were able to significantly decrease endotoxins from the root canals, being similar to each other and to the saline group. The medications CLX, PRO, GENG and saline were similar to each other. It was concluded that all ICM were able to eliminate the microorganisms from the root canal and reduce the amount of endotoxins from the root canals. However, the ICM containing calcium hydroxide were more effective in neutralizing endotoxins.

Keywords: Propolis. Ginger. Calcium hydroxide. Chlorhexidine. *Candida albicans*. *Enterococcus faecalis*. *Escherichia coli*. Endotoxins.