



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"

Campus de São José dos Campos
Faculdade de Odontologia

EMANUELE GONÇALVES BRITO

EFEITOS *IN VITRO* DE EXTRATOS NATURAIS SOBRE
***Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*,**
***Escherichia coli* E ENDOTOXINAS EM CANAIS**
RADICULARES



2010

EMANUELE GONÇALVES BRITO

**EFEITOS *IN VITRO* DE EXTRATOS NATURAIS SOBRE *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* E ENDOTOXINAS
EM CANAIS RADICULARES**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós- Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Microbiologia / Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira

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

B777e Brito, Emanuele Gonçalves.
Efeitos *in vitro* de extratos naturais sobre *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e endotoxinas em canais radiculares / Emanuele Gonçalves Brito. __ São José dos Campos : [s.n.], 2010.
130f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2010.
Orientador: Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira.

1. Extratos naturais. 2. Irrigantes do canal radicular. 3. Microrganismos. 4. Endotoxinas. 5. Citocinas I. Oliveira, Luciane Dias de. II. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. III. Título

tD24

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

AUTORIZAÇÃO

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

São José dos Campos, 25 março de 2010 .

Assinatura :

E-mail: emanuele.brito@yahoo.com.br

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira (Orientadora)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

Universidade Estadual Paulista - UNESP

Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

Universidade Estadual Paulista - UNESP

Profa. Mariella Vieira Pereira Leão

Instituto Básico de Biociências

Universidade de Taubaté - UNITAU

São José dos Campos, 03 de maio de 2010.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Manoel e Gipsi, que com imensa bondade e altruísmo dedicaram suas vidas aos meus irmãos e a mim, para que pudéssemos ter sempre os melhores exemplos de uma vida familiar equilibrada, e as melhores condições de nos desenvolvermos em todos os aspectos das nossas vidas, manifestando sempre em seus atos amor e bondade.

Ao meu noivo, Rodrigo, que está sempre presente em minha vida, com muita amizade, companheirismo, compreensão, e que desde o início têm me apoiado, e me ajudado a transpor os obstáculos e enfrentar os desafios com coragem.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira, minha orientadora, que me ensinou precisamente e cuidadosamente toda a técnica para que eu pudesse desenvolver o meu trabalho, e que com muita amizade, otimismo, paciência e disposição, me acompanhou em todos os momentos desta caminhada. Agradeço pela confiança que a todo momento demonstrou ter em mim, e porque pude contar com sua ajuda sempre que precisei.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. Dr. José Roberto Rodrigues e do vice-diretor Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli, por me receberem como aluna de Pós-Graduação.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal.

Ao Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge, pela imensa ajuda nas decisões, dada graças à imensa experiência, clareza de raciocínio e facilidade em lidar com os problemas. Obrigada por ter sempre sido tão solícito e disposto a me ajudar e pela sempre presente compreensão.

À Profa. Juliana Campos Junqueira pelo agradável convívio no laboratório, e por ter me ajudado todas as vezes que tive dúvidas sobre qualquer procedimento durante a minha fase experimental.

Ao Prof. Claudio Antonio Talge Carvalho pela amizade e convívio.

À Profa. Dra. Rosilene Fernandes da Rocha por todo o apoio e pela amizade.

À Profa. Dra. Raquel Regia Duarte Moreira e Profa. Dra. Vera Lúcia Borges Isaac pela colaboração, e, sobretudo pela paciente ajuda no entendimento da preparação das formulações.

Ao Sérgio e ao Domingos que, dia após dia, me ajudaram em detalhes indispensáveis para a adequada realização do trabalho.

Aos colegas da Pós-Graduação Simone, Ana Carolina S., Daniel, Guilherme, Ana Carolina C., Vanessa, Jonatas, Polyana, Marta, Flavio, Rose, Edna, Graziella, Bruno, Fernanda pelo agradável convívio no laboratório e por compartilharmos todos os nossos bons e maus momentos.

Às secretárias da Seção de Pós-Graduação Rosemary de Fátima Salgado, Erena Michie Hasegawa, Lílian Faria das Graças e Maria Aparecida Consiglio de Souza.

Ao Professor Ivan Balducci pela colaboração na realização da análise estatística.

À CAPES pela concessão de bolsa.

Aos meus irmãos Maria Tereza, Renata, Manoel Carlos e Manoel Luiz por terem sempre participado avidamente do meu crescimento com tanto carinho e sempre transbordando alegria. O nosso convívio sempre foi para mim uma fonte de energia.

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará
ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Escherichia coli</i> em canais radiculares.....	17
2.2 Endotoxina em canais radiculares.....	23
2.3 Irrigantes no tratamento de canais radiculares.....	28
2.4 Atividade antimicrobiana de extratos naturais.....	32
2.4.1 Própolis.....	33
2.4.2 Alcaçuz (<i>Glycyrrhiza</i> sp.).....	36
2.4.3 Barbatimão (<i>Stryphnodendron adstringens</i> Mart.).....	38
2.4.4 Romã (<i>Punica granatum</i> L.).....	40
2.4.5 Cavalinha (<i>Equisetum arvense</i> L.).....	42
3 PROPOSIÇÃO.....	44
4 MATERIAL E MÉTODO.....	45
4.1 Preparo dos espécimes.....	45
4.2 Obtenção dos extratos.....	48
4.3 Contaminação dos espécimes.....	50
4.4 Grupos experimentais.....	53
4.5 Coletas do conteúdo do canal radicular.....	55
4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	56
4.7 Quantificação de endotoxinas – teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de <i>Limulus</i> (LAL).	56
4.8 Avaliação dos efeitos citotóxicos do conteúdo do canal radicular – produção de TNF- α e IL-1 β por macrófagos.....	59

4.8.1	Cultura celular.....	59
4.8.2	Viabilidade da cultura de células.....	60
4.8.3	Ativação celular.....	62
4.8.4	Teste imunoenzimático (ELISA) para quantificar TNF- α e IL-1 β	62
4.9	Análise Estatística.....	65
5	RESULTADOS.....	66
5.1	Análise microbiológica.....	66
5.1.1	<i>Enterococcus faecalis</i>	67
5.1.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	70
5.1.3	<i>Escherichia coli</i>	74
5.2	Quantificação de endotoxinas.....	77
5.3	Produção de citocinas.....	80
5.3.1	Produção de IL-1 β	80
5.3.2	Produção de TNF- α	82
6	DISCUSSÃO.....	83
6.1	Da metodologia.....	83
6.2	Dos resultados.....	87
6.2.1	Análise microbiológica.....	87
6.2.2	Neutralização de endotoxinas.....	96
6.2.3	Produção de citocinas em cultura de macrófagos.....	98
7	CONCLUSÕES.....	101
8	REFERÊNCIAS.....	103
	APÊNDICE	120
	ANEXO.....	128

Brito, EG. Efeitos *in vitro* de extratos naturais sobre *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e endotoxinas em canais radiculares [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ. Estadual Paulista; 2010.

RESUMO

A proposta deste trabalho foi avaliar a efetividade de extratos naturais, como soluções irrigadoras, sobre *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. coli*, e endotoxinas (LPS) em canais radiculares. Foi avaliado também o efeito citotóxico do conteúdo do canal, após os tratamentos, pela produção de TNF- α e IL-1 β em cultura de macrófagos. Foram utilizados 84 dentes unirradiculados, contaminados com associação dos três microrganismos por 28 dias. Após, foram divididos em 7 grupos (n=12), de acordo com o irrigante utilizado: G1) solução fisiológica (controle); G2) solução de clorexidina 2%; G3) extrato glicólico de própolis 12%; G4) extrato glicólico de alcaçuz 20%; G5) extrato glicólico de barbatimão 20%; G6) extrato glicólico de romã 20%; G7) extrato glicólico de cavalinha 20%. Foram realizadas 2 coletas do conteúdo do canal radicular: imediatamente após a instrumentação e após 7 dias da instrumentação. Para todas as coletas, foi realizada avaliação da atividade antimicrobiana pela contagem de UFC/mL em meios de cultura seletivos, verificação da neutralização de endotoxinas pelo teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (LAL) e avaliação dos efeitos citotóxicos do conteúdo do canal pela produção de IL-1 β e TNF- α por macrófagos. Os resultados foram analisados estatisticamente (ANOVA e teste de Tukey, 5%). Todos os extratos promoveram significativa redução microbiana em relação ao controle na 1ª coleta após instrumentação ($p<0,05$). Com relação *E. faecalis*, os extratos de própolis (G3), barbatimão (G5), romã (G6) e cavalinha (G7) promoveram ausência de crescimento microbiano em muitos espécimes, sendo semelhantes a clorexidina e diferentes dos demais grupos ($p<0,05$). Com relação *S. aureus*, os extratos de própolis (G3) e barbatimão (G5) promoveram ausência de crescimento microbiano em todos os espécimes, sendo semelhantes a clorexidina e diferentes dos demais grupos ($p<0,05$). Com relação *E. coli*, os extratos de própolis (G3), romã (G6) e cavalinha (G7) promoveram ausência de crescimento em praticamente todos os espécimes, sendo semelhante a clorexidina (G2) e diferente dos demais ($p<0,05$). Já na 2ª coleta, apenas o extrato de

própolis e clorexidina apresentaram efeito residual sobre *E. faecalis*, *S. aureus* e *E. coli*. Com relação a endotoxinas, nenhum extrato promoveu neutralização significativa nos canais radiculares, sendo que todos os grupos apresentaram altos valores médios, especialmente após a 2ª coleta da instrumentação. Com relação aos efeitos citotóxicos, a produção de TNF- α foi alta em todas as amostras ($p>0,05$). Já a produção de IL-1 β foi mais baixa em todos os casos em relação à produção de TNF- α , demonstrando menor sensibilidade da célula em produzir IL-1 β na presença de diferentes concentrações de endotoxinas (LPS). Assim, pode-se concluir que os extratos naturais (própolis, alcaçuz, barbatimão, romã e cavalinha) apresentaram importante atividade antimicrobiana sobre *E. faecalis*, *S. aureus* e *E. coli*, quando utilizados como agentes irrigantes dos canais radiculares, no entanto, o extrato de própolis foi o mais efetivo, com importante efeito residual. Nenhum extrato promoveu neutralização significativa de endotoxinas e o conteúdo coletado de todos os canais radiculares apresentaram citotoxicidade.

Palavras-chave: Extratos naturais. Irrigantes do canal radicular. Microrganismos. Endotoxinas. Citocinas.

1 INTRODUÇÃO

Agentes biológicos representados pelos microrganismos e seus produtos são os principais responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção das alterações pulpares e periapicais (Takehashi et al., 1965; Sundqvist, 1992; Tanomaru et al., 2003; Jorge, 2007), atingindo o tecido pulpar principalmente devido à presença de cárie, exposição pulpar em procedimentos clínicos e fraturas induzidas por trauma (Nair, 2004; Jorge, 2007; Siqueira Jr.; Rôças, 2007).

Desta forma, microrganismos causadores da cárie e/ou componentes da microbiota bucal indígena ou transitória passam a colonizar o tecido pulpar (Jorge, 2007; Siqueira Jr.; Rôças, 2007). A presença de microrganismos no ambiente pulpar, principalmente de anaeróbios facultativos e aerotolerantes, tem como consequência a inflamação, e posterior necrose pulpar (Jorge, 2007; Nair, 2004).

A necrose pulpar gera o desenvolvimento de um ambiente seletivo, com baixa tensão de O₂, menor disponibilidade de nutrientes e baixo pH, entre outras condições que favorecem a formação de uma microbiota predominantemente anaeróbia (superior a 90%) (Jorge, 2007). O canal radicular passa, então, a ser colonizado por uma pequena parcela dos microrganismos que habitavam a polpa no início da infecção (Nair, 2004).

Cerca de 150 espécies microbianas já foram isoladas de canais radiculares, sendo que um único canal radicular apresenta em média 5 a 7 espécies microbianas infectantes. Desta forma, a infecção dos canais radiculares é polimicrobiana e evolui com a progressão da doença (Gomes et al., 2004).

Muitos microrganismos que participaram inicialmente da infecção podem sobreviver e ganhar, através do canal radicular, acesso aos tecidos periapicais, passando a danificar esta região (Siqueira Jr; Rôças, 2007; Siqueira Jr. et al., 2009).

Além da infecção primária, podem ocorrer infecções secundárias ou persistentes, caracterizando o insucesso do tratamento. Após o preparo biomecânico e a ação da medicação intracanal, podem permanecer microrganismos no sistema de canais radiculares, por vezes devido a propriedades dos agentes antimicrobianos utilizados ou à vulnerabilidade dos microrganismos envolvidos. As infecções secundárias envolvem um número reduzido de espécies microbianas em relação às infecções primárias, e nelas predominam microrganismos Gram-positivos (Pinheiro et al., 2003; Gomes et al., 2004; Molina, 2008). Dentre as espécies mais isoladas nas infecções secundárias destacam-se microrganismos pertencentes aos gêneros *Enterococcus*, *Actinomyces*, *Streptococcus*, *Candida*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus* e *Pseudomonas* (Waltimo et al., 1997; Sundqvist et al., 1998; Gomes et al., 2004).

Todos os microrganismos apresentam seus próprios mecanismos de patogenicidade, que promovem danos diretos ou indiretos aos tecidos do hospedeiro. Uma das causas de dano indireto é a presença de endotoxina, um componente estrutural de bactérias Gram-negativas (Siqueira Jr.; Rôças, 2007).

A endotoxina é um complexo lipopolissacarídeo liberado durante duplicação ou morte celular de bactérias Gram-negativas (Nair, 2004; Oliveira, 2007). É capaz de induzir diversos efeitos biológicos, como ativação de macrófagos/monócitos para a liberação de citocinas, como IL-1 α , IL-1 β , IL-8, TNF- α , de oxigênio reativo, superóxido, óxido nítrico, interferons α , β e γ , fator ativador de plaquetas e prostaglandinas (Miller et al., 1975; Morrison; Ryan, 1987; Safavi; Nichols, 1993; Seltzer; Faber, 1994; Barthel et al., 1997; Matsushita et al., 1999; Hong et al., 2004; Shoji

et al., 2006; Eder et al., 2009), ativação do sistema complemento, indução à formação de osteoclastos (Islam et al., 2007; Siqueira Jr.; Rôças, 2007; Wang; Stashenko, 1993) e ativação policlonal de linfócitos B (Hong et al., 2004; Oliveira et al.; Siqueira Jr.; Rôças, 2007). Sua ação tem, portanto, grande importância no desenvolvimento e manutenção da resposta inflamatória e na reabsorção óssea periapical (Hong et al., 2004; Jacinto et al., 2005; Schein; Schilder, 2006; Oliveira et al., 2007).

Assim, para que haja sucesso do tratamento endodôntico, é necessário não somente a eliminação de microrganismos, mas também a neutralização de endotoxinas (LPS), que são capazes de desencadear ou manter a inflamação periapical (Oliveira et al., 2007; Vianna et al., 2007).

Durante a instrumentação dos canais radiculares, algumas substâncias têm sido utilizadas com o propósito de destruir microrganismos e neutralizar endotoxinas. Atualmente, os produtos químicos mais utilizados como agentes irrigantes são hipoclorito de sódio (NaOCl) e clorexidina (CHX) (Vianna et al., 2007). O hipoclorito de sódio apresenta amplo espectro de ação antimicrobiana e capacidade de dissolver tecidos (Jeansonne; White, 1994). A clorexidina, em gel ou solução, também possui amplo espectro de ação antimicrobiana e a vantagem de apresentar substantividade e ausência de citotoxicidade (Vahdaty et al., 1993; Sena et al., 2006).

No entanto, estes agentes irrigantes utilizados rotineiramente não têm demonstrado capacidade de neutralizar endotoxinas em canais radiculares (Oliveira et al., 2007; Vianna et al., 2007; Martinho; Gomes, 2008; Gomes et al., 2009). Com isto, torna-se importante ampliar os estudos nesta área, a fim de se alcançar um agente irrigante que apresente amplo espectro de ação antimicrobiana, e também capacidade de inativar endotoxinas, além de apresentar substantividade e ausência de citotoxicidade.

Estima-se que exista na Terra entre 250.000 e 500.000 espécies de plantas, e que mais de 10% das espécies sejam utilizadas devido as suas propriedades medicinais (Borris, 1996; Cowan, 1999). A flora brasileira apresenta importante fonte terapêutica. Por muito tempo as plantas têm sido utilizadas para manutenção da saúde, especialmente na última década, quando passaram a ser mais estudadas. Nas plantas já foram encontradas substâncias farmacológicas com diversas atividades biológicas, incluindo atividade antimicrobiana (Nascimento et al., 2000).

A própolis, coletada das plantas e processada pelas abelhas, ganhou popularidade nos últimos anos, e acredita-se ser benéfica à saúde do homem, prevenindo doenças como inflamações, doenças cardíacas, diabetes e até câncer (Bankova et al., 1995). Ao estudar atividade antimicrobiana da própolis sobre patógenos orais, Koru et al. (2007) obtiveram como resultados menores valores de Concentração Inibitória Mínima (MIC) para bactérias Gram-positivas.

Do alcaçuz já foram isoladas diversas substâncias com atividade antimicrobiana, como alcalóides, aminoácidos, cumarinas, óleos essenciais, ácidos graxos, flavonóides, polissacarídeos e taninos (Fukai et al., 2002). O gênero *Glycyrrhiza* apresenta como principais componentes ativos saponinas, flavonóides, isoflavonas e cumarinas (Asl; Hosseinzadeh, 2008). Os diversos flavonóides e isoflavonas que podem ser extraídos e isolados do alcaçuz apresentam importante atividade antimicrobiana (Asl; Hosseinzadeh, 2008).

O barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* Mart. Coville, Família Leguminosae) é uma planta nativa do cerrado brasileiro cujo decocto e infusão da casca do tronco são muito utilizados popularmente para tratar leucorréia, diarreia e infecções ginecológicas. Já foi demonstrado que taninos do barbatimão e compostos relacionados apresentam efeito bactericida, antiviral, moluscida, antielmíntico e protozoaricida além diversas outras atividades biológicas e farmacológicas (Santos et al., 2009).

A atividade antimicrobiana da romã (*Punica granatum* L.) também tem sido bastante investigada (Vasconcelos et al., 2003; Pereira J et al. 2006; Vasconcelos et al., 2006). *Punica granatum* L. (Punicaceae) é citada por Fenner et al. (2006) como planta com grande potencial antifúngico, apresentando também atividade antibacteriana (Prashanth et al.; 2001).

Radulovic et al. (2006) observaram no óleo essencial da cavalinha (*Equisetum arvense* L. - Família Equisetaceae), um amplo espectro de ação e forte atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos. Milovanovic et al. (2007) estudaram a atividade antimicrobiana de extrato hidroalcoólico da cavalinha e observaram atividade antimicrobiana.

Assim, a utilização de extratos naturais como agentes irrigantes dos canais radiculares pode ser uma alternativa viável no tratamento endodôntico (Molina, 2008). No entanto, torna-se necessário ampliar os estudos nesta área a fim de verificar a real atividade destes extratos sobre diferentes microrganismos e endotoxinas presentes em infecções endodônticas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em canais radiculares

O desenvolvimento e manutenção das infecções pulpares e periapicais têm os microrganismos e seus produtos como principais fatores etiológicos (Takehashi et al, 1965; Sundqvist, 1992; Tanomaru et al., 2003; Jorge, 2007). Em 1965, Takehashi estudou o curso das exposições pulpares e periapicais em ratos convencionais e livres de germes. Demonstrou que quando induzida a exposição pulpar em ratos convencionais, ou seja, na presença de microbiota bucal, desenvolveu-se necrose pulpar no 8º dia, e em ratos *germ-free*, além de não ter ocorrido necrose, houve no 14º dia formação de matriz dentinária na superfície pulpar exposta.

A colonização pulpar inicia-se por meio da criação de uma via de entrada de microrganismos bucais em direção à cavidade pulpar. A via de entrada mais importante é resultado de exposição pulpar direta, que pode ocorrer devido ao rompimento da barreira de tecido duro dentário resultante de cáries, procedimentos clínicos, ou fraturas e trincas induzidas por trauma (Nair, 2004; Jorge, 2007). No entanto, a infecção pulpar pode também ocorrer através de outras vias. Em 1967, Grossman sugeriu que os microrganismos poderiam adentrar a cavidade pulpar através do rompimento de vasos sanguíneos do ligamento periodontal. Em 1990, Kobayashi et al. observaram a microbiota da bolsa periodontal e do canal radicular, e concluíram que bolsas periodontais profundas podem ser fonte de infecção de canais radiculares. Poderiam também

atingir o tecido pulpar por via linfática, ou seja, através de túbulos dentinários expostos por falhas na cobertura de cimento da superfície radicular, ou por via hematogênica, na qual microrganismos presentes na corrente sanguínea atingem o tecido pulpar por anacorese (Nair, 2004; Jorge, 2007).

Cerca de 150 espécies microbianas já foram isoladas de canais radiculares. No entanto, estudos baseados em técnicas de cultura microbiana mostraram predomínio de um grupo mais restrito, com 7 a 30 espécies, consideradas principais patógenos endodônticos (Jorge, 2007; Gomes et al., 2004), sendo que um único canal radicular apresenta em média 5 a 7 espécies microbianas infectantes (Gomes et al., 2004).

Inicialmente, a polpa dentária infectada é colonizada por microrganismos oriundos da cavidade bucal. Predominam nesta fase microrganismos anaeróbios facultativos e aerotolerantes componentes da microbiota autógena (Nair, 2004). Os primeiros colonizadores desencadeiam uma série de eventos inflamatórios que culminam na necrose pulpar. A necrose pulpar, por sua vez, propicia a invasão microbiana na direção do periápice, que se torna um ambiente seletivo para uma microbiota mista predominantemente anaeróbia (superior a 90%), permitindo a colonização por uma pequena parcela dos microrganismos que colonizavam a polpa no início da infecção (Nair, 2004; Jorge, 2007; Figdor; Sundqvist, 2007). Desta forma, a infecção dos canais radiculares é polimicrobiana e evolui com a progressão da doença (Gomes et al., 2004).

A difusão das bactérias e de seus produtos em direção à polpa induz a inflamação pulpar. Quando a polpa é exposta, esta é diretamente colonizada pelos microrganismos e desenvolve-se uma reação inflamatória bastante severa, resultando em necrose pulpar. Os microrganismos presentes na cavidade pulpar primeiramente aderem-se às paredes dentinárias e colonizam sua superfície, formando biofilmes.

Desta forma é criado, gradativamente, acesso aos microrganismos em direção ao periápice (Siqueira Jr., Rôças, 2007).

Os microrganismos e seus produtos presentes no sistema de canais radiculares com polpa necrosada invadem os tecidos periapicais e, em conjunto com diversos mecanismos de defesa do hospedeiro, promovem destruição tecidual, resultando no desenvolvimento de lesões periapicais (Nair, 2004; Siqueira Jr.; Rôças, 2007; Siqueira Jr. et al., 2009).

Dentre os gêneros mais freqüentemente detectados por meio de técnicas moleculares em canais radiculares infectados, estão *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas* (Gomes et al., 2004; Sakamoto et al., 2006; Jacinto et al., 2007; Siqueira Jr. et al., 2009), *Treponema* (Baumgartner et al., 2003; Sakamoto et al., 2009), *Olsenella* (Jacinto et al., 2007; Siqueira Jr. et al., 2009), *Diallister* (Sakamoto et al., 2007, Jacinto et al., 2007), *Bacteroidetes*, *Synergistes*, *Pseudoramibacter* (Siqueira Jr.; Rôças, 2007; Siqueira Jr. et al., 2009), *Campylobacter*, *Tannerella*, *Treponema*, *Peptostreptococcus*, *Actinomyces*, *Eubacterium* (Baumgartner et al., 2003; Jorge, 2007), *Enterococcus* e *Streptococcus* (Pinheiro et al., 2003; Gomes et al., 2004; Siqueira Jr. et al., 2009).

A microbiota de canais radiculares com infecção primária é diferente da microbiota da infecção secundária. Na infecção secundária a microbiota é mista, predominantemente anaeróbia, e composta por mais de 3 espécies microbianas, podendo estar presentes tanto bactérias Gram-positivas como Gram-negativas (Gomes et al., 2004). Nestas infecções, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* são microrganismos encontrados com freqüência (Waltimo et al., 1997; Peculienne et al., 2001; Siqueira Jr.; Sen, 2004; Stuart et al., 2006).

Enterococcus faecalis são cocos Gram-positivos, que podem ocorrer em pares ou em cadeias curtas. Podem sobreviver na presença ou ausência de oxigênio, sendo anaeróbios facultativos. Podem

sobreviver em ambientes de pH extremamente alcalino (pH=9,6) e em altas concentrações de sal. Crescem em meios de cultura sólidos em colônias discóides de 1 a 2 milímetros de diâmetro. São resistentes a sais biliares, detergentes, metais pesados. Podem crescer em temperaturas de 10°C a 45°C, e sobrevivem a 60°C por 30 minutos. Fazem parte da microbiota entérica normal e é bactéria integrante da microbiota bucal (Jawetz, 2009; Jorge, 2007).

Em canais radiculares, estudos indicaram que a prevalência de *E. faecalis* é maior em infecções secundárias do que em infecções primárias, e está mais associado a infecções assintomáticas. Embora possua diversos fatores de virulência, sua capacidade de causar lesões periapicais se dá devido a sua capacidade de sobreviver ao tratamento endodôntico, e persistir como patógeno nos canais radiculares e nos túbulos dentinários (Stuart et al., 2006).

Em infecções primárias, *E. faecalis* mais associado a infecções perirradiculares crônicas assintomáticas do que a infecções agudas ou abscessos. É encontrado, em infecções primárias, em 4 a 40% dos casos. Em lesões periapicais persistentes a frequência é mais alta, de 24 a 77%. Quando são utilizados métodos de detecção por PCR (reação em cadeia da polimerase), as porcentagens encontradas são ainda mais altas (Gomes et al., 2004; Rôças et al., 2004; Stuart et al., 2006).

E. faecalis possui diversos fatores de virulência, como enzimas líticas, citolisinas, ácido lipoteicóico e capacidade de agregação de substâncias. Apresenta capacidade de aderência a células do hospedeiro e de expressão de proteínas que permitem competição com outras células bacterianas e alteração da resposta do hospedeiro. É capaz de suprimir a ação de linfócitos, contribuindo fortemente para o insucesso do tratamento endodôntico (Stuart et al., 2006). O mais importante em relação a sua resistência é a capacidade de sobreviver e de persistir como patógeno nos canais radiculares (Stuart et al., 2006).

Em 2008, Sakamoto et al. observaram presença de *E. faecalis* em canais radiculares associados a casos de insucesso do tratamento endodôntico, por meio de análise molecular da microbiota do canal radicular. Segundo Gomes et al. (2004) a presença de *E. faecalis* em casos de insucesso do tratamento endodôntico está relacionada a sua habilidade em manter a capacidade de invasão dos túbulos dentinários e de aderência ao colágeno na presença do soro humano. É ainda um microrganismo que pode sobreviver em ambiente extremamente escasso de nutrientes (Love, 2001; Gomes et al., 2004).

Escherichia coli, pertencente à família Enterobacteriaceae, é um coco bacilo Gram-negativo curto, habitante natural do trato intestinal de humanos e animais. Cresce em aerobiose ou anaerobiose, sendo um microrganismo anaeróbio facultativo (Jawetz, 2009; Jorge, 2007). Um importante fator de virulência deste microrganismo é a presença de endotoxinas (LPS) em sua parede celular (Rietschel et al., 1994; Seltzer e Faber, 1994). Em 2001, Siqueira Jr. et al. encontraram *E. coli* em 3,7% dos casos de abscesso perirradicular agudo, por meio de PCR. Peculien et al. (2001) identificaram *E. coli* em cerca de 10% dos canais radiculares de dentes com periodontite apical crônica, por meio de cultura microbiana.

Apesar de *E. coli* não ser uma bactéria encontrada com alta frequência no interior de canais radiculares com polpa necrosada, sua endotoxina apresenta o lipídeo A, que representa o centro ativo responsável pela toxicidade do LPS (Csako et al., 1983). Desta forma, este microrganismo é utilizado em diversos estudos que visam avaliar métodos de neutralização de endotoxinas (Rietschel et al., 1994; Petsch; Anspach, 2000; Oliveira et al., 2005; Maekawa, 2007; Oliveira et al., 2007; Molina, 2008).

Staphylococcus aureus é uma bactéria esférica Gram-positiva, que se arranja em forma de cachos irregulares. Crescem na maioria dos meios bacteriológicos, em condições aeróbias ou

microaerófilas, formando colônias acinzentadas a amarelo-dourado intenso, redondas, lisas, elevadas e brilhantes (Jawetz, 2009). Algumas cepas possuem cápsulas, protegendo a célula da fagocitose por leucócitos polimorfonucleares. *S. aureus* sobrevive em ambientes salinos, e 40 a 50% dos seres humanos são portadores nasais desta bactéria (Jawetz, 2009; Thomas, 1988 apud Gould; Chamberlaine, 1995).

É uma bactéria que tem representado um desafio global por apresentar frequentemente resistência a antibióticos, representando um grande problema de saúde pública, gerando altos custos adicionais (Woodford; Livermore, 2009). Principalmente as cepas resistentes de *S. aureus* estão associadas a infecções nosocomiais (Gould; Chamberlaine, 1995). Foi em meados dos anos 50 que os Estafilococos tornaram-se responsáveis pelo aumento do número de infecções hospitalares, principalmente quando da presença de ferimentos cirúrgicos ou traumáticos (McDermott, 1956; Gould; Chamberlaine, 1995). Segundo Gould e Chamberlaine (1995), já havia se tornado impossível que muitos sorotipos do microrganismo fossem eliminados com penicilina, além de muitos já se mostrarem resistentes a uma série de antibióticos sintéticos.

Foi identificada a presença de *S. aureus*, por meio de PCR, em 11,1% dos canais radiculares de dentes com abscesso periodontal agudo (Siqueira Jr. et al., 2001). Em análise por PCR realizada por Jacinto et al. (2007), foi verificada a presença de *S. aureus* em 2 amostras entre 5, de canais radiculares.

Assim, sabendo-se que a infecção dos canais radiculares é polimicrobiana e que microrganismos mais resistentes podem sobreviver ao tratamento endodôntico e promover infecção secundária/persistente, predispondo o caso ao insucesso, torna-se importante ampliar os estudos que avaliam soluções irrigadoras no combate aos microrganismos e seus produtos visando ampliar a terapia endodôntica, tornando-a cada vez mais eficiente.

2.2 Endotoxina em canais radiculares

Há mais de 100 anos, Richard Pfeifer (1858-1945) identificou a presença de uma toxina termo-estável, supondo estar presente na estrutura celular de bactérias Gram-negativas, distinguindo estas estruturas, hoje denominadas endotoxinas, das exotoxinas (Petsch; Anspach, 2000; Rietschel; Cavaillon, 2003; Siqueira Jr.; Rôças, 2007).

Na atualidade, a detecção de endotoxinas é realizada com frequência através do método cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (LAL) (Vianna, 2007; Maekawa, 2007; Molina, 2008; Martinho; Gomes, 2008). O *Limulus* é constituído por um lisado dos amebócitos circulantes de caranguejos-ferradura que, quando expostos a quantidades pequenas de endotoxinas, aumenta sua opacidade bem como sua viscosidade, tornando-se um gel duro (Levin; Bang, 1968). Estes autores demonstraram que a formação do coágulo era resultado de uma reação enzimática entre a endotoxina e uma proteína coagulável presente na circulação dos amebócitos de *Limulus*. Assim, pelo método QCL cinético do LAL, a endotoxina da bactéria Gram-negativa catalisa a ativação de uma pré-enzima em enzima. A enzima ativada catalisa a clivagem do substrato sintético Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNa em peptídeo (Ac-Ile-Glu-Ala-Arg) e p-nitroanilina (pNa), de coloração amarela. A pNa transformada durante a reação é medida fotometricamente a 405 nm, continuamente, durante o período de incubação (37°C). A concentração de endotoxina da amostra é calculada a partir de seu tempo de reação por comparação ao tempo de reação das soluções-padrão contendo quantidades conhecidas de endotoxina.

As bactérias mais freqüentemente encontradas nos canais radiculares infectados de dentes com polpa necrótica são anaeróbias Gram-negativas (Schein; Schilder, 1975; Sundqvist, 1992; Seltzer; Faber, 1994; Siqueira Jr et al., 2007). Um dos principais fatores

de virulência destas bactérias é a presença de endotoxinas (Rietschel et al.; Seltzer; Faber, 1994).

As endotoxinas são complexos lipopolissacarídeos presentes na membrana celular externa das bactérias Gram-negativas (Rietschel; Brade, 1992; Petsch; Anspach, 2000). Embora ancorados na membrana celular, são continuamente liberadas, não só durante a morte celular, mas também durante crescimento e duplicação da bactéria (Schein; Schilder, 1975; Reitchel et al., 1994; Barthel et al., 1997; Petsch; Anspach, 2000). Sua estrutura química é composta de três partes, quimicamente, biologicamente, geneticamente e sorologicamente distintas, que são o lipídeo A (componente lipídico apolar de arranjo hexagonal), o oligossacarídeo central (cerne do lipopolissacarídeo) e o Antígeno-O (antígeno de superfície heteropolissacarídico) (Csako et al., 1983; Rietschel et al., 1994; Petsch; Anspach, 2000). O antígeno O e o cerne da molécula compõem um polissacarídeo hidrofílico. O lipídeo A é embutido na membrana celular externa, enquanto o antígeno O e o cerne localizam-se externamente à superfície bacteriana. (Siqueira Jr.; Rôças, 2007). A massa molar de LPS varia entre 10 e 20 kDa, devido a variação da cadeia do oligossacarídeo central (Petsch; Anspach, 2000).

A molécula de LPS pode agregar-se em arranjos lamelares, cúbicos, hexagonais, em forma de micélios ou vesículas. O Lipídeo A, por meio de interações apolares, é o maior responsável por esta variação morfológica (Petsch; Anspach, 2000). O Lipídeo A é também o fragmento da molécula responsável pelos efeitos tóxicos aos tecidos do hospedeiro (Siqueira Jr.; Rôças, 2007).

Referido como endotoxina, LPS é responsável pela indução de diversos efeitos biológicos importantes que resultam na amplificação da reação inflamatória. Atualmente, o mecanismo de ação da molécula já é compreendido. As endotoxinas, por meio do Lipídeo A, não atuam diretamente nas células ou no tecido, mas através da ativação do sistema imunológico (Rietchel et al.; Seltzer; Faber, 1994; Petsch;

Anspach, 2000). Em estudo realizado por Eder et al. (2009), observou-se que a molécula é crucial na ativação do macrófago para liberação imediata de TNF- α . O antígeno O, segundo estes autores, é responsável por inibir a fagocitose, permitindo a evasão do sistema imunológico. As endotoxinas ativam diversos tipos celulares do hospedeiro, como células mononucleares, endoteliais, musculares lisas, polimorfonucleares, granulócitos, trombócitos e principalmente monócitos e macrófagos (Rietchel et al., 1994; Seltzer; Faber, 1994; Petsch; Anspach, 2000).

No sangue, a endotoxina liga-se à molécula de LBP (*lipopolysaccharide binding protein*), que interage com o receptor CD14 da superfície de macrófagos. LPS estimula macrófagos a liberarem proteínas como IL-1, IL-6 e IL-8, TNF- α , oxigênio reativo, superóxido, óxido nítrico, interferons α , β e γ , fator ativador de plaquetas e prostaglandinas (Safavi; Nichols, 1993; Seltzer; Faber, 1994; Barthel et al., 1997; Matsushita et al., 1999; Hong et al., 2004; Shoji et al., 2006; Eder et al., 2009).

LPS também induz o desencadeamento de reações de Schwartzman localizadas e generalizadas (Schein; Schilder, 1975), ativação policlonal de linfócitos B, citotoxicidade, modificações hemodinâmicas, indução de febre e quimiotaxia de osteoclastos (Morse, 1981; Wang; Stashenko, 1993; Oliveira et al., 2005).

LPS induz a diferenciação de células precursoras em osteoclastos, células responsáveis pela reabsorção de osso calcificado, por meio de um mecanismo bastante complexo, envolvendo a indução da liberação de Prostaglandina E₂ (Shoji et al., 2006; Islam et al., 2007). O mecanismo celular e molecular preciso da indução da perda óssea induzida por LPS ainda permanece controverso, embora em estudo recente de Liu et al. (2009) sobre mecanismos moleculares do LPS na osteoclastogênese tenha ficado clara a existência de uma complexa dualidade na ação do LPS na presença de certas substâncias.

As endotoxinas são capazes de ativar o complemento através da via alternativa, independente de anticorpos, ou através da via

da properdina. A ativação do complemento resulta na formação de anafilatoxinas (C3a e C5a), potentes vasodilatadores e contratores da musculatura lisa, além de serem moléculas quimiotáticas para neutrófilos e células mononucleares (Seltzer; Farber, 1994). Além disto, estas moléculas são capazes de ativar plaquetas, mastócitos, basófilos e células endoteliais. O complemento também está envolvido na formação de cininas, importantes mediadores inflamatórios (Morrison; Ryan, 1987; Seltzer; Farber, 1994).

As endotoxinas podem contribuir para aumento de substâncias vasoativas e neurotransmissoras em terminações nervosas do tecido periapical inflamado (Seltzer; Farber, 1994). Endotoxinas são capazes de ativar o Fator de Hageman, que leva a produção de bradicinina, um potente mediador da dor. A produção de bradicinina também é aumentada diretamente quando os leucócitos humanos são expostos a endotoxinas (Miller et al., 1975; Seltzer; Farber, 1994).

Em 1975, Schein e Schilder quantificaram endotoxinas de dentes que necessitavam de tratamento endodôntico, e concluíram que dentes não vitais, com sintomatologia dolorosa e com lesões periapicais visíveis radiograficamente, apresentaram maiores quantidades de endotoxina. Jacinto et al. (2005) e Martinho e Gomes (2008) demonstraram que há uma associação positiva entre a concentração de endotoxina em dentes com necrose pulpar e a presença de sinais e sintomas endodônticos, como dor espontânea, sensibilidade à percussão, dor à palpação e formação de exsudato.

Dahlén e Hofstad observaram, em 1977, que se desenvolvia reação inflamatória e quimiotaxia para leucócitos na pele de coelhos quando se injetava preparados de LPS intracutaneamente. Segundo Dahlén e Bergenholtz (1980), pode-se dizer que há participação de LPS de bactérias Gram-negativas em infecções endodônticas, nas respostas inflamatória e imunológica de tecidos periapicais.

A endotoxina é capaz de se difundir pelos túbulos dentinários em direção ao cimento em 24 horas (Oliveira et al., 2005). Segundo estudo realizado por Dahlén et al. (1981), LPS pode ficar retido no canal radicular, incorporado ao cimento por longo período de tempo.

Segundo Jacinto et al. (2005), embora outros fatores, além da endotoxina, possam estar envolvidos na patogênese das periapicopatias, a concentração de endotoxina em canais radiculares com polpa necrosada e em casos de dentes com dor espontânea, dor à palpação, sensibilidade à percussão e presença de exsudato purulento indicam que LPS é um importante fator biológico para o desenvolvimento da inflamação periapical aguda. Até mesmo pequenas quantidades de endotoxinas podem induzir resposta inflamatória periapical (Seltzer; Farber, 1994). Além disto, microrganismos e seus produtos na região do periápice podem disseminar-se sistemicamente, resultando na ativação ou exacerbação de uma desordem sistêmica ou dano a um tecido distante. O tratamento do canal radicular, portanto, deve não apenas promover a morte das bactérias, mas também remover células mortas e promover inativação do lipídeo A, porção tóxica da endotoxina (Vianna et al., 2007).

Como as infecções dos canais radiculares são polimicrobianas, causadas por microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, destaca-se a importância do uso, durante o tratamento endodôntico, de substâncias com ampla atividade antimicrobiana, e que ainda sejam capazes de neutralizar produtos bacterianos como endotoxinas (Jacinto et al.; Oliveira et al., 2005; Vianna et al., 2007).

2.3 Irrigantes no tratamento de canais radiculares

A irrigação dos canais radiculares tem importante função na eliminação de microrganismos dos canais radiculares infectados ou com necrose pulpar. Para que ocorra um bom prognóstico e sucesso no tratamento endodôntico é necessário que haja eliminação ou ao menos redução bastante significativa de microrganismos e seus produtos, de modo a proporcionar condições para que ocorra reparação dos tecidos periapicais (Siqueira Jr. et al., 2007).

A irrigação e instrumentação agem nos canais principais na primeira fase do tratamento endodôntico, proporcionando grande redução de microrganismos. O auxílio de um agente irrigante com atividade antimicrobiana neste processo é de grande importância, pois reduz a contaminação com maior eficiência (Bystron; Sundqvist, 1981; Sakamoto et al.; Siqueira Jr. et al., 2007). Segundo Mohammadi (2008) não há evidência na literatura de que a instrumentação mecânica por si só resulte na total eliminação de microrganismos dos canais radiculares. Portanto, a irrigação é necessária para remover remanescentes teciduais e eliminar microrganismos (Bystron; Sundqvist, 1981).

Existem na literatura muitos trabalhos avaliando a eficácia de diversas substâncias irrigantes. Entre elas estão o hipoclorito de sódio em concentrações de 0,5% a 5,25% e a clorexidina em gel ou solução, principalmente a 2% (Bystron e Sundqvist, 1981; Sakamoto et al.; Siqueira Jr. et al.; Vianna et al.; Oliveira et al., 2007; Martinho e Gomes, 2008).

Jeansonne e White, em 1994, estudaram a atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio a 5,25%, da solução de clorexidina a 2% e de solução salina (controle), como irrigantes, durante o preparo biomecânico. Foram utilizados dentes humanos extraídos, que após limpos e preparados, foram contaminados com microrganismos. Os

resultados mostraram grande redução de microrganismos nos dois grupos de estudo, sendo que a atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio a 5,25% foi estatisticamente semelhante a da solução de clorexidina 2%. No grupo controle houve redução discreta de microrganismos, causada pela limpeza mecânica dos canais radiculares.

Gomes et al. (2003) estudaram, em dentes bovinos extraídos, a atividade antimicrobiana de clorexidina gel 2%, hidróxido de cálcio + propilenoglicol, hidróxido de cálcio + clorexidina gel 2% sobre *E. faecalis*. Concluíram que a melhor atividade foi da clorexidina gel 2%, que demonstrou atividade antimicrobiana em 1, 2, 7 e 15 dias.

Vianna et al. (2006) compararam os efeitos antimicrobianos da clorexidina gel 2% e hipoclorito de sódio 2,5% como irrigantes em canais radiculares de dentes humanos com polpa necrosada, e concluíram que o hipoclorito de sódio não apenas demonstrou melhor atividade antimicrobiana, mas também maior capacidade em remover células do canal radicular.

Em 2007, Ferraz et al. avaliaram a atividade antimicrobiana de clorexidina gel 0,2%, 1% e 2%, solução de clorexidina gel 0,2%, 1% e 2% e hipoclorito de sódio 0,5%, 1%, 2,5%, 4% e 5,25% contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus*, *Actinomyces naeslundii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella denticola*, por meio do método de difusão em ágar. Observaram que os maiores halos de inibição foram produzidos pela clorexidina gel 2%. Os halos de inibição produzidos pelo hipoclorito de sódio a 5,25% foram equivalentes aos halos produzidos pela clorexidina a 0,2%.

Em 2009, Gomes et al. avaliaram a atividade antimicrobiana pela formação de zonas de inibição de crescimento microbiano de clorexidina gel 2%, hidróxido de cálcio + clorexidina gel 2%, hidróxido de cálcio + clorexidina gel + óxido de zinco e hidróxido de cálcio + solução salina como medicações intracanal contra *E. faecalis*, *Candida*

albicans, *Actinomyces viscosus* e *P. gingivalis*. A clorexidina gel 2% demonstrou maior atividade antimicrobiana e maior capacidade de difusão através dos túbulos dentinários.

Pappen et al. (2010) observaram que a eficácia do hipoclorito de sódio em estudos *in vitro* foi maior do que em estudos *in vivo*. Estudaram, então, a atividade antimicrobiana *in vitro* de hipoclorito de sódio de 0,03% a 2% na ausência e na presença de soro albumina bovina contra *E. faecalis*, *C. albicans*, *Staphylococcus epidermidis* e *E. coli*. As soluções puras de hipoclorito de sódio em todas as concentrações foram capazes de eliminar todos os microrganismos. Seus resultados demonstraram que a presença de soro albumina bovina em maiores concentrações influenciou, reduzindo a atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio.

Porém, para que haja sucesso no tratamento endodôntico é necessário não somente a eliminação de microrganismos do sistema de canais radiculares, mas também a neutralização de endotoxinas, que são prejudiciais aos tecidos periapicais (Tanomaru et al., 2003; Oliveira et al.; Vianna et al., 2007).

Em 2003, Tanomaru et al. verificaram que o preparo biomecânico com a utilização de substâncias irrigantes como hipoclorito de sódio 1%, 2,5% e 5%, solução de clorexidina 2%, e solução fisiológica (controle) não foram efetivos na neutralização de endotoxinas em canais radiculares.

Oliveira et al. (2007) avaliaram NaOCl 2,5% e 5,25%, solução de clorexidina 2%, água de cal (CaOH_2 0,14%) e polimixina B na neutralização de endotoxinas em canais radiculares, e observaram que NaOCl 2,5%, NaOCl 5% e clorexidina 2% não apresentaram efeitos sobre neutralização de endotoxinas, e que água de cal e polimixina B foram efetivas. Estes autores verificaram que a utilização de água de cal ou polimixina B diminuiu significativamente os efeitos da endotoxina em promover ativação policlonal de linfócitos B.

Vianna et al. (2007) quantificaram endotoxinas em canais radiculares antes e após o preparo biomecânico utilizando clorexidina gel 2% como irrigante, e obtiveram como resultado uma redução de 44,4% de endotoxina nos canais radiculares, enquanto a redução microbiana foi de 99,96%. A redução de endotoxina com o uso de clorexidina gel 2% foi parcial e, segundo os autores, foi mais relacionada à remoção pelo ato de irrigar e aspirar do que à atividade antimicrobiana da clorexidina.

Em 2008, Martinho e Gomes estudaram a atividade antimicrobiana e a capacidade de neutralização de endotoxinas de hipoclorito de sódio 2,5% como irrigante em canais radiculares. Seus resultados mostraram eliminação total de microrganismos, porém persistente presença de endotoxina em 100% dos dentes após preparo biomecânico.

Gomes et al. (2009) compararam clinicamente hipoclorito de sódio 2,5% e clorexidina gel 2% em dentes com infecção endodôntica primária quanto à atividade antimicrobiana e capacidade em neutralizar endotoxinas. Concluíram que tanto o hipoclorito de sódio 2,5% como a clorexidina gel 2% possuem atividade antimicrobiana, porém não possuem capacidade de neutralizar endotoxinas. Embora tenha havido redução de endotoxinas após o preparo biomecânico em relação ao início do tratamento, atribuem o fato à ação mecânica do tratamento.

Assim, sabendo-se da importância da endotoxina na infecção endodôntica, torna-se importante sua neutralização durante o tratamento dos canais radiculares.

2.4 Atividade antimicrobiana de extratos naturais

Devido à presença de espécies bacterianas resistentes ao tratamento endodôntico convencional e à ineficácia dos agentes irrigantes mais utilizados na neutralização de endotoxinas, torna-se útil o estudo de outras diferentes substâncias com esta finalidade. A diversidade da flora brasileira abre a possibilidade de estudo de extratos naturais como irrigantes na terapia endodôntica. Em 2008, Murray et al. estudaram suco de morango (*Morinda citrifolia*) como irrigante em canais radiculares, e concluíram, com base neste estudo, ser uma alternativa ao uso do hipoclorito de sódio como irrigante em canais radiculares.

Diversas plantas medicinais existentes na flora brasileira constituem importante fonte terapêutica (Nascimento et al., 2000). Desta forma, a utilização de extratos naturais tem sido alvo de estudos em diferentes áreas, incluindo odontologia, o que torna interessante avaliar a ação de extratos naturais sobre microrganismos e endotoxinas presentes nas infecções primárias e secundárias dos canais radiculares, com a finalidade de ampliar a terapia endodôntica, tornando-a cada vez mais eficiente na eliminação de microrganismos e seus produtos.

Além de extratos naturais de origem vegetal, a própolis é um extrato natural de origem animal, também muito utilizado, que possui diversas propriedades medicinais. É produzida pelas abelhas, insetos que coletam e processam compostos de determinadas espécies de plantas. As propriedades destes compostos variam de acordo com a espécie da qual foi realizada coleta, com a época do ano, o local de coleta, entre outros fatores. (Ghisalberti, 1979; Monti et al, 1983; Burdock., 1998; Koo et al., 2000; Banskota et al., 2001; Koru et al., 2007).

As plantas possuem habilidade quase ilimitada em sintetizar substâncias com atividades farmacológicas. A maioria dos

compostos é produzida como metabólitos secundários, e em muitos casos, estas substâncias contribuem para o mecanismo de defesa das plantas contra predação de microrganismos, insetos e herbívoros (Cowan, 1999).

Existem diversas classes de fitoquímicos antimicrobianos, como fenóis e polifenóis - classe em que se incluem flavonas, flavonóides e flavonóis, taninos e cumarinas - terpenóides e óleos essenciais, alcalóides, lectinas e polipeptídeos, entre diversos outros (Cowan, 1999). A extração dos princípios ativos é realizada através da solubilização dos componentes em água, álcool ou outros solventes, selecionados de acordo com a polaridade da substância de interesse (Cowan, 1999).

2.4.1 Própolis

A própolis é um produto natural de origem animal, coletado da colméia pelo homem. É uma substância resinosa fortemente adesiva, com coloração de marrom escura a amarela, dependendo de sua origem (Burdock, 1998).

As abelhas da espécie *Apis mellifera* coletam uma resina em fraturas dos galhos e gomos das folhas das árvores (Koo et al., 2000; Banskota et al., 2001; Castaldo et al., 2002, Koru et al., 2007). Esta resina é triturada, enzimas salivares são adicionadas, e o material parcialmente digerido é misturado à cera e utilizado na colméia (Ghisalberti, 1979; Burdock, 1998). Entende-se que as abelhas coletam a própolis para selar a colméia e prevenir a decomposição de invasores mortos. Considera-se a própolis, assim, uma substância com atividade antimicrobiana (Banskota et al., 2001). A palavra própolis é derivada do grego, onde “pró” = defesa e “polis” = cidade (Ghisalberti, 1979; Burdock, 1998).

Nos últimos anos a própolis ganhou popularidade, e acredita-se ser benéfica à saúde do homem, prevenindo doenças como inflamações, doenças cardíacas, diabetes e até câncer. Devido esta grande variedade de atividades biológicas, há um crescente interesse no estudo dos componentes da própolis e de suas atividades biológicas (Bankova et al., 1995).

Muitos estudos demonstram que a própolis possui atividade antimicrobiana, antiinflamatória, hepatoprotetora (Ghisalberti, 1979; Burdock, 1998; Banskota et al., 2001; Koru et al., 2007), antioxidante, estimulante do sistema imunológico através de diversas vias biológicas (Koru et al., 2007). É utilizada pelo homem e na medicina popular desde pelo menos 300 a. C. (Banskota et al., 2001), devido a suas propriedades antimicrobianas (Castaldo; Capasso, 2002). A própolis pode agir contra uma grande variedade de bactérias, fungos, vírus e larvas de insetos (Koru et al., 2007).

Mais de 300 substâncias já foram encontradas na própolis (Bankova et al., 1995). A composição varia com a região em que foi coletada (Monti et al., 1983; Koru et al., 2007). Em geral é composta por 50% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de diversas outras substâncias, incluindo debris orgânicos (Burdock, 1998).

A ação da própolis é devida principalmente a flavonóides (Burdock, 1998). Segundo Koru et al. (2007), além dos flavonóides (como flavonas, flavonóis e flavononas), os ácidos aromáticos e compostos fenólicos também são importantes princípios ativos. Os principais compostos antimicrobianos ativos são os flavonóides pinocembrina, galangina e sakuranetina (Koo et al., 2000).

Ao estudar atividade antimicrobiana da própolis sobre patógenos orais, Koru et al. (2007) obtiveram como resultados menores valores de MIC (Concentração Inibitória Mínima) para bactérias Gram-positivas. Este estudo confirmou os resultados de Grange et al. (1990),

que demonstraram que o extrato etanólico de própolis é mais efetivo contra bactérias Gram-positivas.

Em 2009, Cardoso et al. avaliaram a atividade antimicrobiana de própolis extraída em etanol (70% de etanol e 30% de própolis bruta) no Rio Grande do Sul (Santa Catarina, Brasil), através da avaliação das concentrações bactericida e fungicida mínimas (MBC e MFC) contra *S. aureus* e *S. intermedius* e contra *Malassezia pachydermatis* isolados de otite canina. Neste estudo a própolis demonstrou atividade antibacteriana e antifúngica.

Estudando a atividade antimicrobiana e inibição da formação do biofilme *in vitro*, Koo et al. (2000) concluíram que própolis é capaz de prevenir cárie e doença periodontal. Em 2009, Awawdeh et al. estudaram o efeito antimicrobiano da própolis e do hidróxido de cálcio em discos de dentina contaminados com *E. faecalis*, e verificaram que a própolis foi significativamente mais efetiva que o hidróxido de cálcio, eliminando rapidamente o microrganismo.

O mecanismo de atividade antimicrobiana da própolis parece complexo, e ainda não completamente compreendido. Sua atividade contra microrganismos é mais relacionada aos efeitos sinérgicos dos flavonóides e de outros fenólicos do que individualmente de cada componente (Amoros et al. 1994; Koo et al., 2000). Havsteen (1983) dividiu o mecanismo de ação em quatro categorias:

- a) afinidade na ligação a polímeros biológicos,
- b) ligação a íons de metais pesados, c) catálise do eletro-transporte,
- c) habilidade em ligar-se a radicais livres (Havsteen, 1983; Burdock, 1998).

Takaisi-Kikuni e Schilcher (1994) observaram que a atividade antimicrobiana contra *Streptococcus agalactiae* foi complexa, envolvendo diversos mecanismos, como formação de estreptococos pseudomulticelulares, desorganização do citoplasma, da membrana

citoplasmática e da parede celular, lise bacteriana e inibição da síntese proteica. Os autores concluíram que não se pode fazer uma simples analogia do mecanismo de ação da própolis com antibióticos comuns (Takaisi-Kikuni; Schilcher, 1994; Koo et al., 2002).

2.4.2 Alcaçuz (*Glycyrrhiza* sp.)

O alcaçuz é uma planta medicinal tradicional, nativa da região Mediterrânea, que cresce em diversas regiões do mundo (Gupta et al., 2008; Asl; Hosseinzadeh, 2008), especialmente em regiões de clima temperado (Mitscher et al., 1980). É uma árvore robusta, ou um arbusto, que cresce verticalmente até 2 metros de altura. Suas raízes são longas, cilíndricas, estreitas e ramificadas (Gupta et al., 2008).

Possui como principal componente a glicirrizina, presente na raiz da planta, e 50 vezes mais doce do que a sacarose. Possui efeitos semelhantes à cortisona, e apresenta diversas propriedades, como antiinflamatória, expectorante, controladora de tosse, além de possuir efeitos hormonais, desintoxicar e proteger o fígado. É também utilizada na medicina contra Doença de Addison, asma, bronquite, úlcera péptica, artrite, reações alérgicas, eczema e herpes. É contra-indicada na gravidez e para pacientes hipertensos (Fukai et al., 2002; Ates e Erdogrul, 2003; Gupta et al., 2008). Extratos de alcaçuz também são utilizados para tratamento de gastrite, úlcera duodenal, preventivo contra efeitos colaterais de outras drogas, hemorróida e melanoma (Fukai et al., 2002).

O gênero *Glycyrrhiza* (família Fabaceae) como planta medicinal, apresenta como componentes ativos saponinas, flavonóides, isoflavonas e cumarinas (Asl; Hosseinzadeh, 2008). Os diversos flavonóides e isoflavonas que podem ser extraídos do alcaçuz e isolados apresentam importante atividade antimicrobiana (Asl; Hosseinzadeh,

2008). Já foram isolados alcalóides, aminoácidos, cumarinas, óleo essencial, ácidos graxos, flavonóides, polissacarídeos e taninos de extratos de alcaçuz (Fukai et al., 2002). A glabridina, uma isoflavona (Asl; Hosseinzadeh, 2008), tem sido descrita como a substância de maior atividade antimicrobiana, além de apresentar outras propriedades biológicas (Fukai et al., 2002; Gupta et al., 2008). Em 2002, Fukai et al. avaliaram a atividade antimicrobiana de glabridina e glabreno (isoflavonas isoladas de *Glycyrrhiza glabra*), contra cepas resistentes e sensíveis de *S. aureus*, sendo que a glabridina foi eficaz contra todas as cepas de *S. aureus*.

Em seu estudo, Ates e Erdogrul (2003) avaliaram a atividade antimicrobiana de extrato alcoólico, clorofórmico, cetônico e em acetato de etila da raiz de alcaçuz, em diversas espécies de microrganismos, e pelo menos um dos tipos de extrato mostrou atividade antimicrobiana contra 12 dos 13 microrganismos testados. Em estudo de Motsei et al. (2003), o extrato aquoso do rizoma de *G. glabra* foi altamente efetivo contra 3 cepas de *C. albicans* testadas. Os extratos preparados com solventes orgânicos também demonstraram boa atividade antimicrobiana contra as mesmas cepas, no entanto os autores consideram o extrato aquoso mais viável devido à facilidade de preparo para uso caseiro em candidoses. A presença de saponinas foi identificada no extrato aquoso de *G. glabra*, no entanto, este extrato é instável e perde a atividade em apenas um dia de armazenagem (Motsei et al., 2003). Em 2009, Wittscher et al. observaram que o extrato aquoso da raiz de alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*) inibiu a adesão *in situ* de *Helicobacter pylori* no tecido de estômago humano, embora não tenha demonstrado efeito citotóxico direto sobre o microrganismo, e concluíram desta forma que o extrato aquoso e polissacarídeos isolados da raiz do alcaçuz possui forte propriedade antiadesiva.

Quanto a questões taxonômicas, segundo Funch e Barroso (1999), Taubert (1894), *Periandra dulcis* Mart. foi considerada,

por Taubert, sinônimo de *Glycyrrhiza mediterrânea* Vell., legitimando o que Bentham (1837) já havia legitimado.

Em 2000, Pereira BMR et al. estudaram a atividade anti-inflamatória e imunológica de polissacarídeos de alcaçuz (*Periandra mediterrânea* Taub. Syn.: *Periandra dulcis* Mart., Família Leguminosae) e observaram que dois dos três polissacarídeos estudados demonstraram propriedade imunoestimulatória e antiinflamatória em ratos.

Muitas plantas contendo saponinas têm demonstrado atividade antimicrobiana (Saleem et al., 2010). Em 1983, Hashimoto et al. relataram a presença de periandrina I, uma saponina, no alcaçuz (*Periandra dulcis* Mart.). Em 1991, Ikeda et al. encontraram outras três novas saponinas no alcaçuz (*Periandra dulcis* Mart.): as periandradulcinas A, B e C. Em 1993 Suttisri et al. isolaram da *Periandra dulcis* Mart. a saponina Periandrina V.

2.4.3 Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* Mart.)

Stryphnodendron adstringens Mart. (família Leguminosae), conhecida como barbatimão, é uma planta nativa do cerrado brasileiro. O decocto e a infusão da casca do tronco de barbatimão são muito utilizados popularmente para tratar leucorréia, diarreia e infecções ginecológicas. O barbatimão possui propriedades cicatrizantes, antiinflamatória, analgésica e protetora da mucosa gástrica (Audi et al., 1999; Holletz et al., 2005; Santos et al., 2009).

Já foi demonstrado que taninos do barbatimão e compostos relacionados possuem efeito bactericida, antiviral, moluscida, antielmíntico e protozoaricida além de outras diversas atividades biológicas e farmacológicas (Santos et al., 2009). Três hipóteses podem explicar a atividade antimicrobiana dos taninos: a inibição da atividade

enzimática, ação direta no metabolismo celular, através da inibição da fosforilação oxidativa e mecanismos envolvendo a complexação de taninos com íons metabólicos, diminuindo a disponibilidade destes íons para o metabolismo do microrganismo (Santos et al., 2009).

Santos et al. (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos aquoso e etanólico de barbatimão contra os seguintes microrganismos orais: *S. mutans*, *S. aureus*, *Actinobacillus actinomicetemcomitans* e *C. albicans*. O extrato etanólico de barbatimão foi o mais eficiente, embora o extrato aquoso também tenha demonstrado atividade antimicrobiana, porém com maiores valores de MIC. Os constituintes ativos do barbatimão ainda não são bem conhecidos, porém, sabe-se que os taninos podem ser as substâncias mais relevantes, por estarem presentes em grande quantidade (10 a 37% dos constituintes), dependendo do local e da estação da colheita (Mello et al., 1996; Santos et al., 2009).

Ishida et al. (2009) estudaram a ação de taninos, extraídos da casca do tronco do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* Mart.), no crescimento, tamanho da cápsula e pigmentação do fungo *Cryptococcus neoformans*. Observaram que os taninos influenciaram nestes três importantes fatores de virulência do microrganismo.

É muito provável que o etanol exerça um papel muito importante na extração dos compostos ativos do barbatimão, devido à sua capacidade de solubilização das moléculas ativas, pois o extrato etanólico mostrou maior atividade tanto bactericida como fungicida (Santos et al. 2009).

2.4.4 Romã (*Punica granatum* L.)

A *Punica granatum* L., da família Punicaceae, é um arbusto ou uma pequena árvore originária da região mediterrânea (Negi e Jayprakash, 2003), principalmente Irã e Afeganistão (Jafri et al., 2000), onde diversas partes da planta têm sido utilizadas devido a suas propriedades adstringente, hemostática, antihelmíntica, contra bronquite, afecções biliares, diarreias e disenterias crônicas infantis, e como remédio para diabetes (Das et al., 1999; Jafri et al., 2000; Machado et al., 2002).

A atividade antimicrobiana da *P. granatum* L. tem sido bastante investigada (Vasconcelos et al., 2003; Pereira J et al. 2006; Vasconcelos et al., 2006). Diversos estudos, incluindo alguns relacionados à inibição da aderência, sugerem que o uso fitoterápico pode ser uma opção viável ao controle de diferentes espécies microbianas. *P. granatum* L. é citada por Fenner et al. (2006) como planta com potencial antifúngico, sendo que as partes utilizadas são as flores e a casca do fruto.

Haidari et al. (2009) observaram que polifenóis purificados extraídos da *P. granatum* L. inibiu a replicação e demonstrou efeito sinérgico ao antiviral oseltamivir contra o vírus da Influenza A. Os principais componentes do extrato do fruto da *P. granatum* L. são taninos e polifenóis, detectados em estudos de prospecção fitoquímica de pós de algumas espécies de plantas, entre elas *P. granatum* L. (Haslam, 1996; Vasconcelos et al., 2006). Há um crescente interesse no uso de taninos como agente antimicrobiano na prevenção da cárie.

Machado et al. (2002) descreveram o isolamento e a identificação do tanino responsável pela atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, concluindo que o responsável por esta atividade é o elagitanino punicalagina, e esta seria a substância química de escolha para o desenvolvimento de um fitofarmacêutico.

A ação dos taninos contra bactérias e leveduras pode ser estabelecida por uma relação entre as suas estruturas moleculares, toxicidade e propriedades adstringentes dos taninos, ou mesmo através de outros mecanismos. Considera-se que o efeito dos taninos no metabolismo celular seja estabelecido por sua ação na membrana. Estes podem atravessar a parede celular bacteriana, composta por diversos lipopolissacarídeos e proteínas, ligando-se às suas superfícies (Vasconcelos et al., 2006).

A romã é muito utilizada na Índia como tempero. Das et al. (1999) estudaram a atividade antimicrobiana de extrato alcoólico de sementes de frutos frescos, obtidos no mercado local, contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (*Bacillus subtilis*, *E. coli* e *Saccharomices cerevisiae*), e observaram potente atividade antimicrobiana, tanto antibacteriana como antifúngica. A razão provável para isto, segundo os autores, é a presença de ácido punícico.

Prashanth et al. (2001) estudaram a atividade antimicrobiana *in vitro*, por meio das técnicas de diluição em ágar de extrato etanólico, clorofórmico, metanólico e aquoso de *P. granatum* L. sobre *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *B. subtilis* e *Salmonella typhi*, e concluíram que todos os extratos mostraram eficiente atividade antimicrobiana, dando suporte ao uso da romã na medicina tradicional. Os autores verificaram que o extrato de maior atividade antimicrobiana foi o extrato metanólico.

Negi e Jayaprakasha (2003) estudaram a atividade antimicrobiana de extratos cetônico, metanólico e alcoólico da casca de romã (*P. granatum* L.) contra *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Bacillus coagulans*, *S. aureus*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, e observaram atividade antimicrobiana em todos os grupos, sendo que o extrato cetônico foi o mais efetivo contra todos os microrganismos.

No estudo de Vasconcelos et al. (2006), sobre a atividade antimicrobiana e inibição da aderência bacteriana da *P. granatum* L., foi

verificado que o gel do extrato desta planta foi capaz de inibir a aderência de cepas de *C. albicans*. Nesta situação, a MIC (Concentração Inibitória Mínima) do miconazol foi menor que a do extrato de romã. No caso da associação de microrganismos (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* e *C. albicans*), *P. granatum* foi eficiente em inibir a aderência, e o miconazol não mostrou atividade inibitória.

Pereira J et al. (2006) demonstraram atividade antibacteriana da *P. granatum* L. sobre o biofilme bacteriano, causando distúrbio na síntese de glicanos, agindo nos mecanismos de aderência de microrganismos à superfície dentária. Este estudo mostrou a capacidade de inibição da aderência de um gel derivado de *P. granatum*, rico em taninos e polifenólicos, e os resultados indicaram que a síntese de glicano e a ação antimicrobiana do gel proporcionaram controle do biofilme já formado.

Pereira M et al. (2006) investigaram a atividade antimicrobiana de extratos alcoólicos (5%) do fruto e da casca do fruto de *P. granatum* L. sobre cepas de *S. aureus*, *E. coli*, e *Enterobacter gergoviae*. O extrato a 5% demonstrou atividade antimicrobiana tanto do fruto como da casca do fruto.

2.4.5 Cavalinha (*Equisetum arvense*)

Equisetum arvense L. (família Equisetaceae), conhecido como cavalinha, é um arbusto bastante presente e bem distribuído no hemisfério norte do planeta (Radulovic et al., 2006). É uma planta muito utilizada na medicina de diversos países, devido seus efeitos antioxidante, antinociceptivo e anti-inflamatório. (Trouillas et al.; Do Monte et al., 2004; Radulovic et al., 2006). Radulovic et al. (2006) estudaram o efeito antimicrobiano do óleo essencial das partes aéreas de *E. arvense* L., por

meio do método de difusão em disco e concluíram que o óleo essencial da cavalinha possui amplo espectro de ação e forte atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos, como a bactéria Gram-positiva *S. aureus* e as Gram-negativas *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *Salmonella enteritidis*, e fungos como *Aspergillus niger* e *C. albicans*. Os autores avaliaram ainda a composição da planta, sugerindo que a natureza antimicrobiana de *E. arvense* L. pode ser atribuída a diversas substâncias, principalmente ao timol e linalol.

Milovanovic et al. (2007) estudaram a atividade antimicrobiana, além de outros efeitos biológicos, de extrato hidroalcoólico de *E. arvense* L. e outras espécies de *Equisetum*. Obtiveram como resultados discreta atividade antimicrobiana, tanto contra *S. aureus* como contra *C. albicans* e *A. niger*, sendo que o microrganismo mais sensível foi *P. aeruginosa*. Em estudo de Dos Santos et al. (2005) que demonstrou atividade sedativa e anticonvulsivante do extrato hidroalcoólico de *E. arvensis*, foi detectada a presença de taninos saponinas, esteróis e flavonóides no referido extrato.

Contudo, pode-se verificar que os estudos que avaliam a atividade antimicrobiana de diferentes extratos naturais ainda são poucos na literatura, e apresentam resultados conflitantes. Assim, esta área de pesquisa precisa ser intensificada a fim de definir o melhor tipo de extrato e seu mecanismo de ação, a melhor concentração, o melhor tempo de contato do produto com os microrganismos dos canais radiculares, e o melhor veículo. Mais especificamente na Odontologia, o uso de extratos naturais pode trazer benefícios à terapia endodôntica, e possivelmente ampliar o espectro de ação das soluções irrigadoras a serem utilizadas como alternativa ao tratamento endodôntico convencional.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste estudo foram:

- a) avaliar a atividade antimicrobiana de extratos naturais (própolis, *Glycyrrhiza glabra* - alcaçuz, *Stryphnodendron adstringens* - barbatimão, *Punica granatum* - romã e *Equisetum arvense* - cavalinha), como soluções irrigadoras, sobre associação de três microrganismos (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*) em canais radiculares;
- b) avaliar a ação de extratos naturais (própolis, romã, alcaçuz, barbatimão e cavalinha) como soluções irrigadoras na neutralização de endotoxinas (LPS) de *E. coli* em canais radiculares;
- c) avaliar os efeitos citotóxicos do conteúdo do canal radicular, após os tratamentos, pela produção de TNF- α e IL-1 β em cultura de macrófagos.

4 MATERIAL E MÉTODO

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (UNESP) (protocolo nº 066/2008-PH-CEP) (Anexo A).

4.1 Preparo dos espécimes

Foram utilizados 84 dentes humanos unirradiculados, recém-extraídos por indicações clínicas diversas e com prévia autorização dos pacientes por meio do consentimento livre e esclarecido. Os dentes foram limpos, imersos em solução fisiológica e mantidos em temperatura ambiente até o momento do uso. A seleção dos dentes foi feita baseada nas dimensões e similaridade morfológica da raiz, sendo os dentes radiografados para comprovação da presença de um único canal reto. As coroas foram seccionadas com disco de carborundum (Carbodont Gysi S.A., Buenos Aires, Argentina), padronizando o tamanho dos espécimes em 16 mm (Figura 1) (Oliveira et al., 2007; Molina, 2008).

A instrumentação inicial dos canais radiculares foi realizada em toda a sua extensão, desde seu diâmetro anatômico até lima tipo Kerr (K) (Maillefer, Michigan, USA) número 30. Os canais foram irrigados com solução de hipoclorito de sódio a 1% a cada troca de instrumento e, após, preenchidos com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA- Iodontec, Porto Alegre, RS) a 17%, o qual foi agitado com uma lima durante 3 min. A irrigação final foi realizada com 10 mL de solução fisiológica. Em seguida, os canais radiculares foram secos com cones de

papel nº 30, foi realizado vedamento da região apical utilizando-se resina composta fotopolimerizável Z-100 (3M, Dental Products, St Paul, USA) e as raízes foram impermeabilizadas externamente com duas camadas de adesivo epóxi Araldite (Brascola, São Paulo, SP, Brasil), exceto a região da abertura cervical (Figura 2).

Todos os espécimes foram colocados em frascos de vidro contendo solução fisiológica e esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. Em seguida, em ambiente estéril (câmara de fluxo laminar), os espécimes foram distribuídos aleatoriamente em 7 placas de cultura celular de 24 poços (TPP, Switzerland), com 12 dentes em cada, fixados com resina acrílica quimicamente ativada (aproximadamente 5 mm de altura) (Figura 3).

Estas placas e todos o material utilizado (limas, pinças, gaze, algodão e ponteiras, entre outros) foram esterilizados por radiação gama com cobalto 60 (20 KGy por 6 horas), pela Empresa Brasileira de Radiação EMBRARAD, para neutralizar endotoxinas pré-existentes (Csako et al., 1983).

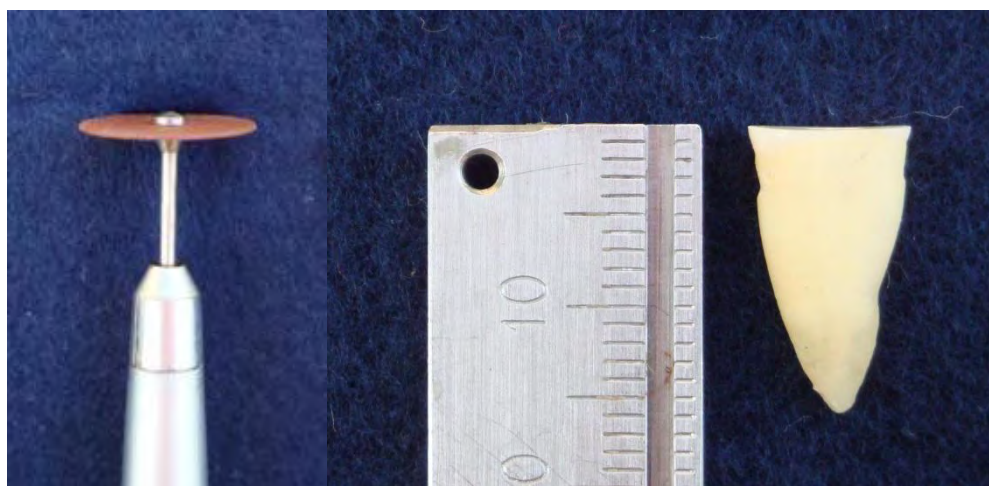


Figura 1 - Dente humano seccionado, com tamanho padronizado em 16 mm.

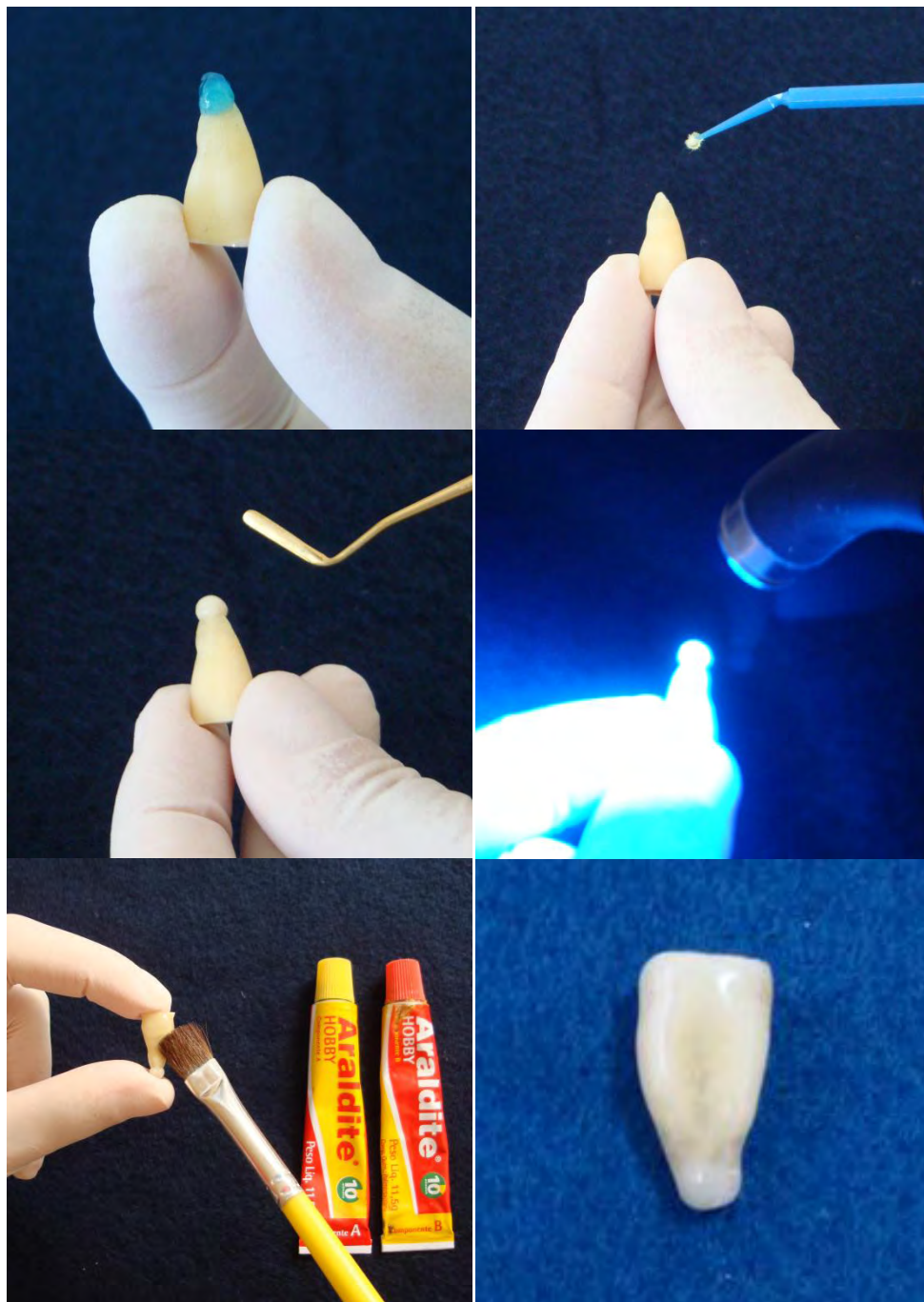


Figura 2 - Vedamento apical (aplicação do ácido, sistema adesivo e resina composta fotopolimerizada) e impermeabilização externa da raiz (adesivo epóxi).

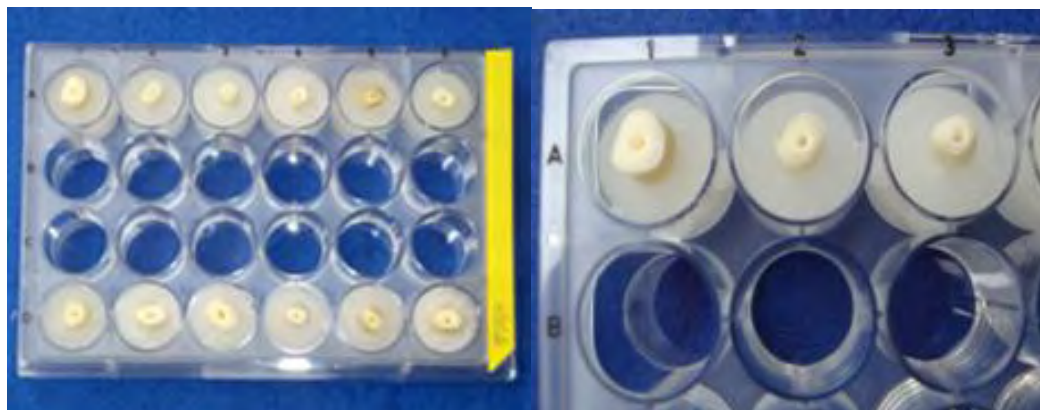


Figura 3 - Distribuição e fixação dos espécimes em placas de cultura celular de 24 poços.

4.2 Obtenção dos extratos

No presente estudo, foram utilizados diferentes extratos glicólicos: própolis, alcaçuz (*Periandra dulcis* Mart., raíz), barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* Mart., casca do tronco), romã (*Punica granatum* L., casca do fruto) e cavalinha (*Equisetum arvense* L., partes aéreas). O extrato glicólico de própolis 12% foi adquirido comercialmente na empresa Apis Flora (Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) (Figura 4).

Os extratos glicólicos de alcaçuz (*Periandra dulcis* Mart.), barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* Mart.), romã (*Punica granatum* L.) e cavalinha (*Equisetum arvense* L.) foram preparados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Câmpus de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho com colaboração da Profa. Dra. Raquel Regina Duarte Moreira (Disciplina de Farmacognosia) e da Profa. Dra. Vera Lúcia Borges Isaac (Disciplina de Cosmetologia).

Para obtenção destes extratos, foram utilizados pós secos das plantas adquiridos da empresa Oficina de Ervas (Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). O extrato hidroetanólico (EH) foi obtido por maceração dos pós durante 7 dias ao abrigo da luz, com agitação ocasional. A proporção

empregada entre a droga vegetal pulverizada e o líquido extrator foi 20% (p/v). A solução extrativa obtida após filtragem em algodão foi concentrada em evaporador rotatório com temperatura máxima de 40°C, obtendo-se assim os extratos brutos. Os extratos brutos foram diluídos em propilenoglicol a uma concentração final de 20%.

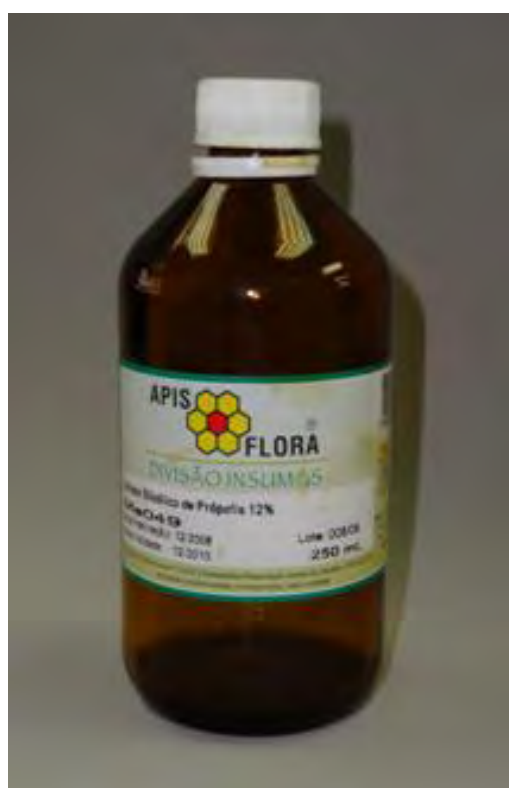


Figura 4 - Frasco contendo extrato glicólico de própolis 12% - Apis Flora.

4.3 Contaminação dos espécimes

Em ambiente estéril (câmara de fluxo laminar), os canais radiculares dos 84 espécimes foram primeiramente contaminados com 10 μ L de suspensão contendo *Escherichia coli* (ATCC 25922) (10^6 células/mL) em solução fisiológica apirogênica (Aster Produtos Médicos LTDA, Sorocaba, SP), padronizada com a utilização de espectrofotômetro [comprimento de onda 590 nm e densidade óptica (DO) de $0,324 \pm 0,02$] (Figura 5). Os canais receberam mais 10 μ L de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*, Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) e foram selados com bolinha de algodão apirogênica embebida no caldo BHI. Os espécimes foram mantidos em estufa a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, em umidade relativa, por 7 dias. Após, foram adicionados nos canais radiculares 5 μ L de uma suspensão contendo *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433) (10^6 células/mL - comprimento de onda 760 nm e $\text{DO} = 0,298 \pm 0,02$), 5 μ L de uma suspensão contendo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) (comprimento de onda 490 nm e $\text{DO} = 0,374 \pm 0,02$) e mais 10 μ L de caldo BHI. Os canais foram novamente selados com bolinha de algodão embebida em caldo BHI e mantidos em estufa a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por mais 21 dias, totalizando 28 dias de contaminação (Figura 6) (Molina, 2008). Durante este período, foram adicionados 20 μ L de caldo BHI no interior dos canais radiculares a cada 2 dias.



Figura 5 - Espectrofotômetro utilizado para padronização das suspensões microbianas, contendo 10^6 células/mL.

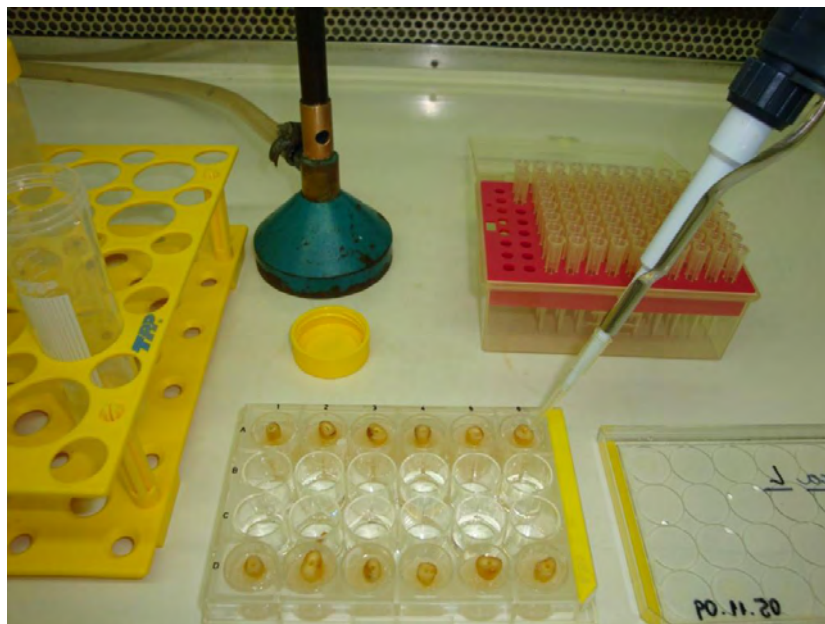


Figura 6 - Contaminação dos canais radiculares com as suspensões microbianas.

Após o período de 28 dias, foi realizada coleta de todos os espécimes para confirmação da contaminação dos canais radiculares. Para tanto, os canais foram preenchidos com solução fisiológica aprotogênica, a qual foi agitada com lima tipo Kerr nº 30, e foram coletados 100 µL do conteúdo do canal radicular (Figura 7), os quais foram transferidos para tubos tipo Eppendorf (Axygen Scientific, CA, USA), aprotogênicos, contendo 900 µL de soro fisiológico (NaCl a 0,9%) aprotogênico (Aster) (Figura 8). Em seguida, foram realizadas diluições, e alíquotas de 100 µL foram semeadas em duplicata em placas contendo ágar m-Enterococcus (Difco, B.D., Le Pont de Claix, França), ágar MacConkey (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) e ágar Manitol (Oxoid, Inglaterra), para analisar a presença de *E. faecalis*, *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente, em todos os espécimes. As placas foram incubadas a $37\pm1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas para verificação do crescimento microbiano.

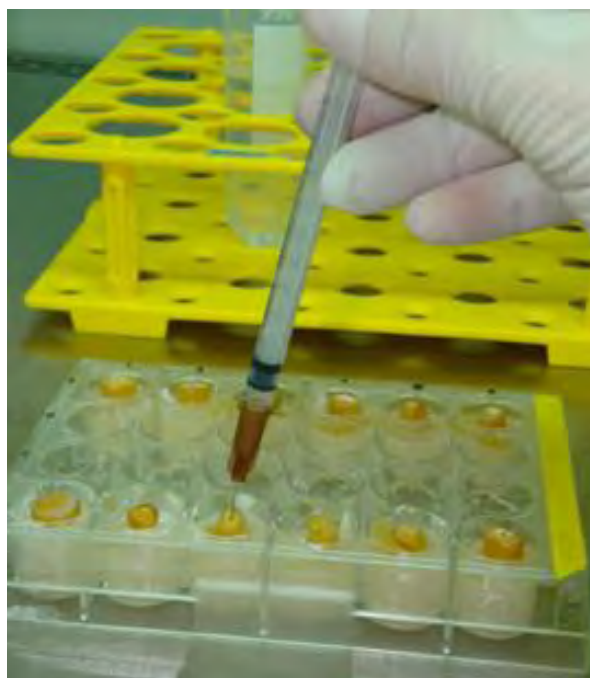


Figura 7 - Coleta do conteúdo do canal radicular.



Figura 8 - Transferência da amostra coleta para microtubos contendo solução fisiológica.

4.4 Grupos experimentais

Após a confirmação da contaminação, todos os espécimes foram instrumentados até a lima tipo K nº 50 (Maillefer, Michigan, USA) e escalonados até a lima K nº 80. Para tanto, os canais radiculares foram preenchidos com o agente irrigante utilizado e, após ação da lima (Figura 9), foram irrigados com 3 mL de solução fisiológica estéril e apirogênia, sendo irrigação e aspiração realizada com auxílio de seringas apirogênicas de 5 mL e agulhas apirogênicas 20 x 5,5 mm (Injex, SP, Brasil) (Figura 10). Este procedimento foi repetido a cada troca de lima. Desta forma, os espécimes foram divididos em 7 grupos experimentais (n=12), de acordo com a solução irrigadora utilizada (Quadro 1).

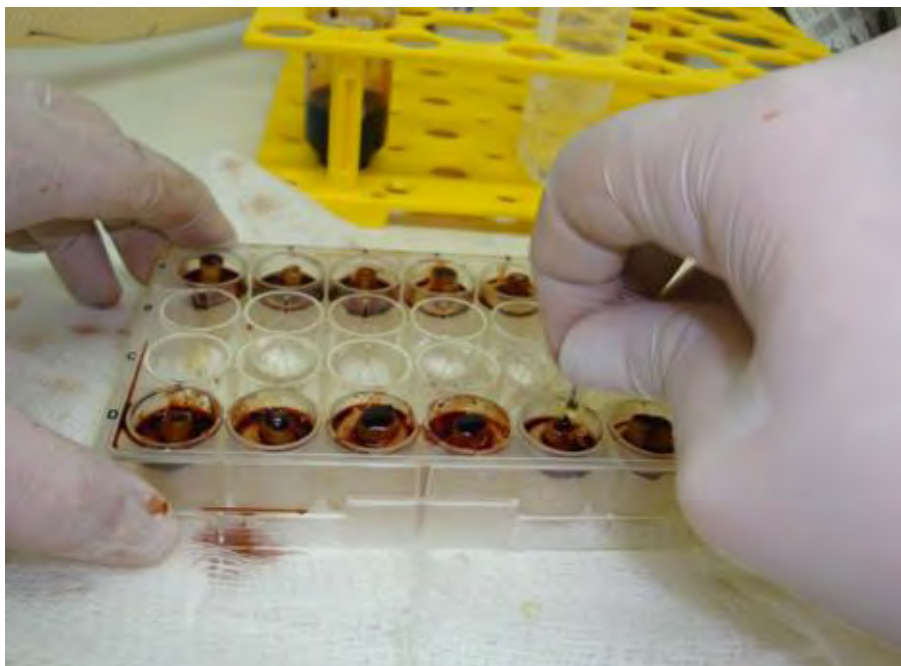


Figura 9 - Instrumentação dos canais radiculares com extrato glicólico de barbatimão.

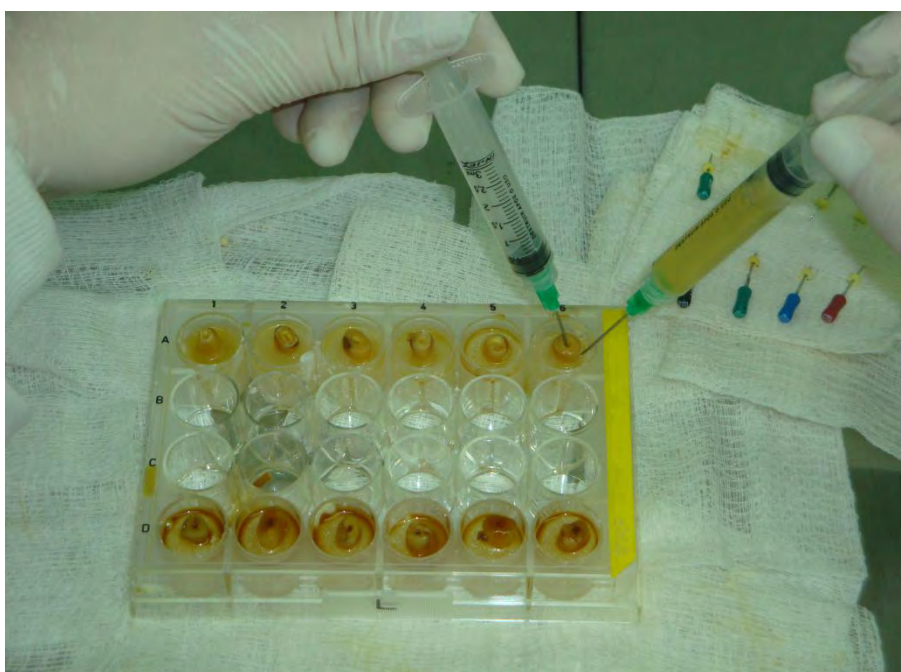


Figura 10 - Irrigação e aspiração dos canais radiculares com solução fisiológica.

Quadro 1 - Distribuição dos espécimes nos 7 grupos experimentais (n=12), de acordo com a solução irrigadora.

Grupos experimentais (n=12)	Solução irrigadora
G1 (controle)	Solução fisiológica apirogênica
G2	Solução de clorexidina a 2%
G3	Extrato glicólico de própolis 12%
G4	Extrato glicólico de alcaçuz 20% (<i>Periandra dulcis</i> Mart.)
G5	Extrato glicólico de barbatimão 20% (<i>Stryphnodendron adstringens</i> Mart.)
G6	Extrato glicólico de romã 20% (<i>Punica granatum</i> L.)
G7	Extrato glicólico de cavalinha 20% (<i>Equisetum arvense</i> L.)

4.5 Coletas do conteúdo do canal radicular

Foram realizadas duas coletas do conteúdo do canal radicular: 1ª) imediatamente após a instrumentação, 2ª) após sete dias da instrumentação. Todas as coletas dos canais radiculares foram realizadas da mesma forma conforme descrito na coleta de confirmação (item 4.3).

Entre a coleta imediata e após sete dias, os dentes foram preenchidos com solução fisiológica apirogênica e selados com bolinha de algodão apirogênica. As placas contendo os espécimes foram fechadas, seladas com fita adesiva e mantidas em estufa a temperatura de $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa 100%.

Para todas as coletas, foram realizados testes microbiológicos, quantificação de endotoxinas e avaliação dos efeitos citotóxicos do conteúdo dos canais radiculares.

4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana

Em todas as coletas, alíquotas (100 µL) das diluições do conteúdo coletado do canal radicular foram semeadas em duplicata em placas contendo meio de cultura seletivo para cada microrganismo. As placas foram mantidas em estufa $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. A atividade antimicrobiana dos agentes irrigantes utilizados foi avaliada pela contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) de *E. faecalis*, *S. aureus* e *E. coli* em ágar m-Enterococcus (Difco, B.D., Le Pont de Claix, França), ágar Manitol (Oxoid, Inglaterra) e ágar MacConkey (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia), respectivamente.

4.7 Quantificação de endotoxinas – teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de Limulus (LAL)

Para todas as coletas dos canais radiculares, foi realizado o teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de Limulus (Figura 11) (análise quantitativa) para verificar a neutralização de endotoxinas nos canais radiculares após os diferentes tratamentos.

Nos dias das coletas, foram realizadas diluições da endotoxina padrão de *E. coli* em diferentes concentrações que representaram os padrões de comparação das amostras (curva-padrão). Para cada amostra, foi realizado um controle positivo (amostra do conteúdo do canal radicular adicionada de uma quantidade conhecida de endotoxina) para verificar possíveis interferentes.

Em uma microplaca apirogênica de 96 poços, foram adicionados 100 µL de água apirogênica (branco da reação), os padrões

de endotoxina, as amostras coletadas do canal radicular e os controles positivos (Figura 12). Os testes foram realizados em quadruplicata. A placa foi incubada no leitor cinético QCL (Cambrex Bio Science, MD, USA) a $37\pm 1^\circ\text{C}$ por 10 minutos (Figura 13), o qual estava acoplado a um microcomputador com *software* WinkQCL específico para gerenciamento, execução e emissão de relatórios. Após, foram adicionados em cada poço da placa 100 μL do reagente cinético cromogênico do LAL (Cambrex Bio Science, MD, USA) (Figura 14), com uma micropipeta de 8 canais e ponteiros apirogênicos. Após o início do ensaio cinético, o *software* da leitora de microplacas monitorou, de forma contínua durante todo o ensaio, a absorbância a 405 nm em cada poço da microplaca. O leitor determinou o tempo necessário para aumentar a absorbância de cada poço a 0,200 unidade de absorbância, que foi o denominado tempo de reação. O *software* WinkQCL automaticamente calculou uma correlação linear log/log do tempo de reação de cada padrão com a concentração de endotoxina correspondente. Os parâmetros da curva-padrão foram impressos no relatório.

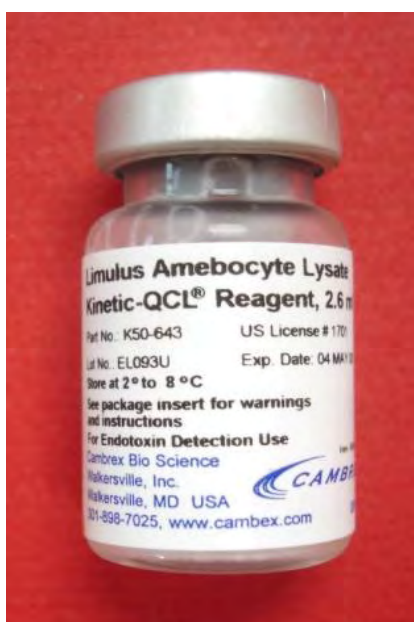


Figura 11 - Lisado de amebócitos de Limulus (LAL) utilizado para quantificar endotoxinas.

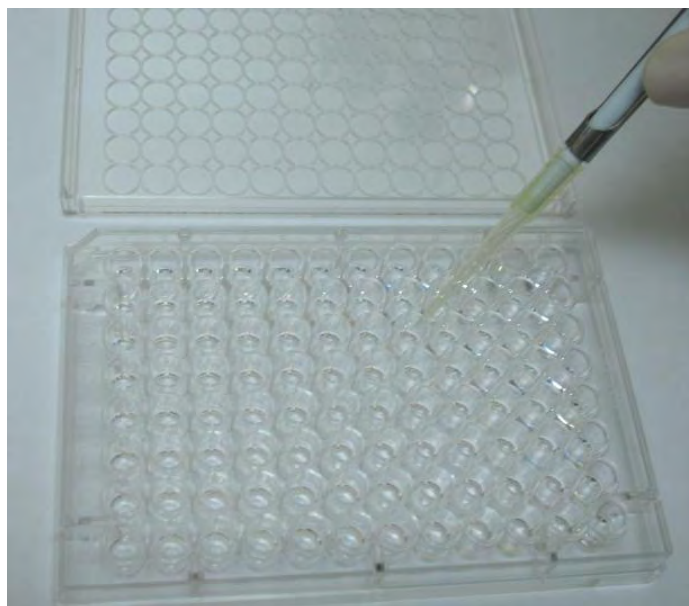


Figura 12 - Distribuição na microplaca dos padrões de endotoxina e das amostras coletadas dos canais radiculares após os tratamentos.



Figura 13 - Leitor cinético utilizado no teste de quantificação de endotoxinas.



Figura 14 - Adição do reagente LAL (Lisado de Amebócito de Limulus) nos poços da microplaca.

4.8 Avaliação dos efeitos citotóxicos do conteúdo do canal radicular – produção de TNF- α e IL-1 β por macrófagos

4.8.1 Cultura Celular

Uma linhagem de macrófagos de camundongos (RAW 264.7) obtida do banco de células da Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM, Rio de Janeiro, RJ) foi mantida em meio DMEM (LGCBio, São Paulo) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen). O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias (Figura 15) e as células foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ (Figura 16).



Figura 15 - Troca do meio de cultura celular.



Figura 16 - Estufa a 37°C e 5% de CO₂ para manutenção da cultura celular.

4.8.2 Viabilidade da cultura de células

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de exclusão utilizando azul de tripan 0,5% e contagem das células viáveis em câmara de Neubauer (Figura 17). Para realização dos testes, foram colocados 10^6

células viáveis em cada poço da placa de polistireno de 24 poços (TPP, Switzerland), acrescentado de meio DMEM enriquecido com soro fetal bovino até obter volume final de 500 μ L (Figura 18).

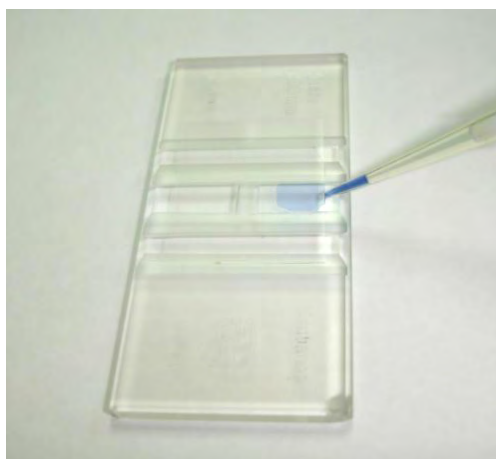


Figura 17 - Câmara de Neubauer utilizada para contagem das células viáveis.

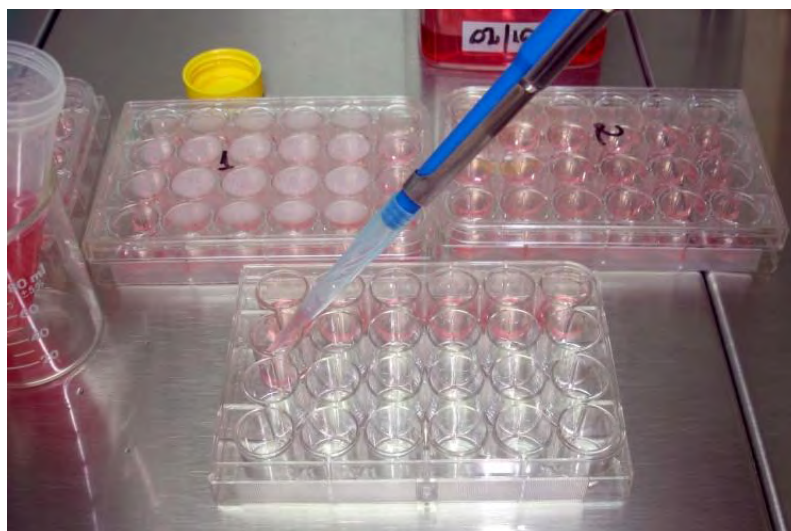


Figura 18 - Distribuição das células nas placas de cultura de células.

4.8.3 Ativação celular

Após distribuição das células nos poços, estas foram ativadas com as amostras coletadas dos canais radiculares (Figura 19). As placas contendo as células ativadas foram mantidas a 37°C (5% de CO₂) e, após 24 horas, os sobrenadantes foram removidos e submetidos à detecção e quantificação de citocinas (TNF- α e IL-1 β) pelo teste imunoenzimático (ELISA).

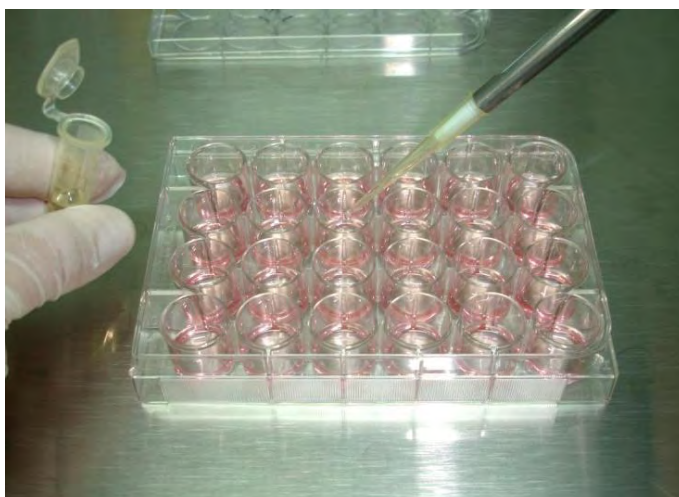


Figura 19 - Ativação celular com conteúdo coletado dos canais radiculares

4.8.4 Teste imunoenzimático (ELISA) para quantificar TNF- α e IL-1 β

Placas de microtitulação de 96 poços (Nunc) foram sensibilizadas com anticorpos de captura anti-TNF- α ou anti-IL-1 β de camundongo (R&D Systems, NE) (Figura 20) (37°C por 2 horas) e mantidas *overnight* em temperatura ambiente. No dia seguinte, as placas

foram lavadas com PBS contendo Tween 20 (PBS-T) e bloqueadas com soro albumina bovina (BSA, 0,1%) por 1 hora. Após, as placas foram lavadas com PBS-T e receberam os sobrenadantes da cultura de células (100 μ L por poço) e os padrões das citocinas com concentrações conhecidas (curva-padrão). Os testes foram realizados em duplicata. Após duas horas, as placas foram lavadas (PBS-T) e foram acrescentados anticorpos de detecção anti-TNF- α ou anti-IL-1 β marcados com biotina. Após 2 horas, a reação foi revelada com solução contendo substrato cromogênico e peróxido de hidrogênio (Figura 21). A reação foi bloqueada após 20 minutos com ácido sulfúrico 2N (Figura 22). As densidades ópticas (DO) foram lidas no leitor de microplacas (Biotek) com comprimento de onda de 450 nm. Após obtenção das densidades ópticas, os níveis de TNF- α e IL-1 β presentes nos sobrenadantes das culturas de macrófagos foram determinados utilizando o programa GraphPad Prism 4.0.



Figura 20 - Kit contendo reagentes (R&D Systems) para detecção de citocinas (IL-1 β e TNF- α) por ELISA.

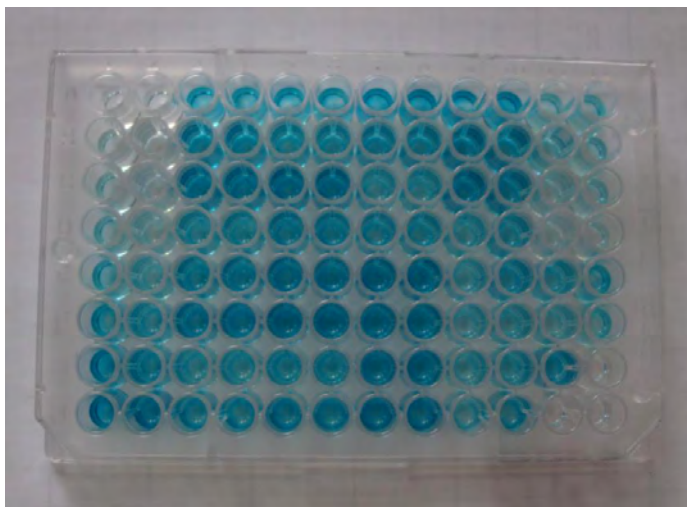


Figura 21- Reação revelada após adição do substrato cromogênico.

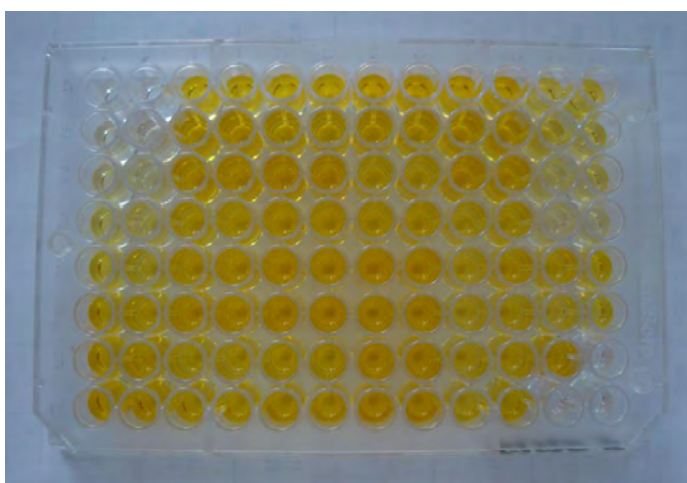


Figura 22 - Reação final após adição do ácido sulfúrico.

4.9 Análise Estatística

Todos os resultados (análise microbiológica, quantificação de endotoxinas e de citocinas) foram analisados estatisticamente pela análise de variância ANOVA e pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Análise Microbiológica

Após coleta de confirmação microbiana, foi observado crescimento de *E. faecalis*, *S. aureus* e *E. coli* em todos os espécimes (Figura 23). Os valores médios de UFC/mL (log10) obtidos por cada espécime dos grupos experimentais na coleta de confirmação, 1ª e 2ª coleta após instrumentação estão demonstrados nas Tabelas 17 a 23 (Apêndice A).

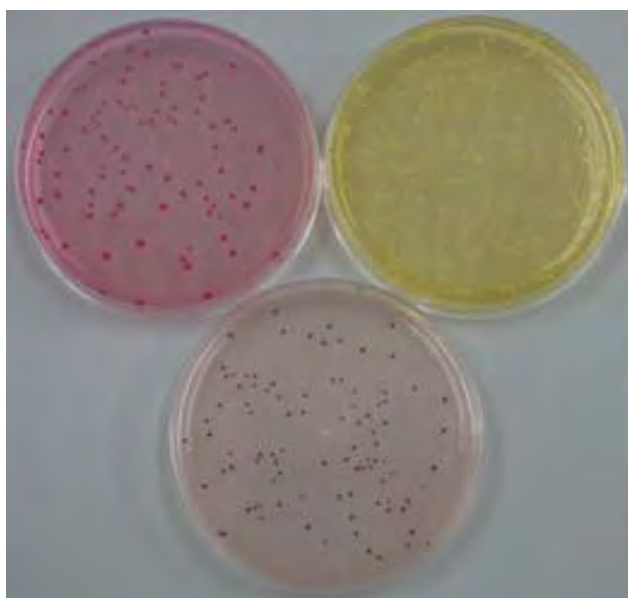


Figura 23 - Crescimento microbiano (*E. coli*, *S. aureus* e *E. faecalis*) na coleta de confirmação de espécime do grupo G6.

5.1.1 *Enterococcus faecalis*

Os valores médios de UFC/mL (log10) de *E. faecalis* obtidos em cada grupo experimental na coleta de confirmação, 1ª e 2ª coleta após instrumentação estão demonstrados nas Tabelas 1, 2 e 3, respectivamente.

Tabela 1 – Valores médios de UFC/mL (log 10) de *E. faecalis* $\pm$ desvio-padrão obtidos por cada grupo experimental (n=12) na coleta de confirmação e formação de grupos homogêneos

	Média $\pm$ desvio-padrão	Grupos homogêneos*
G1	6,84 $\pm$ 0,34	A B
G2	5,90 $\pm$ 1,12	A
G3	6,63 $\pm$ 0,56	A B
G4	7,12 $\pm$ 0,60	B
G5	6,75 $\pm$ 0,39	A B
G6	6,75 $\pm$ 0,44	A B
G7	7,22 $\pm$ 0,32	B

G1 (controle): solução fisiológica; G2: clorexidina; G3: própolis; G4: alcaçuz; G5: barbatimão; G6: romã; G7: cavalinha.

*letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

Tabela 2 – Valores médios de UFC/mL (log 10) de *E. faecalis* $\pm$ desvio-padrão obtidos por cada grupo experimental (n=12) na 1ª coleta e formação de grupos homogêneos

	Média $\pm$ desvio-padrão	Grupos homogêneos*
G1	4,16 $\pm$ 0,51	C
G2	0,00 $\pm$ 0,00	A
G3	0,00 $\pm$ 0,00	A
G4	2,98 $\pm$ 1,67	B
G5	0,00 $\pm$ 0,00	A
G6	0,19 $\pm$ 0,66	A
G7	0,65 $\pm$ 1,23	A

G1 (controle): solução fisiológica; G2: clorexidina; G3: própolis; G4: alcaçuz; G5: barbatimão; G6: romã; G7: cavalinha.

*letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

Tabela 3 – Valores médios de UFC/mL (log 10) de *E. faecalis* $\pm$ desvio-padrão obtidos por cada grupo experimental (n=12) na 2ª coleta e formação de grupos homogêneos

	Média $\pm$ desvio-padrão	Grupos homogêneos*
G1	5,60 $\pm$ 0,25	D
G2	0,34 $\pm$ 0,83	A B
G3	0,00 $\pm$ 0,00	A
G4	3,27 $\pm$ 2,43	C
G5	2,14 $\pm$ 2,34	B C
G6	2,78 $\pm$ 2,08	C
G7	3,40 $\pm$ 2,06	C

G1 (controle): solução fisiológica; G2: clorexidina; G3: própolis; G4: alcaçuz; G5: barbatimão; G6: romã; G7: cavalinha.

*letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

Após análise estatística, pode-se verificar que, na coleta de confirmação, houve crescimento semelhante de *E. faecalis* nos grupos G1, G3, G4, G5, G6 e G7 ($p > 0,05$). O grupo G2 (clorexidina) apresentou valores significativamente menores, sendo diferente de G4 e G7 ($p < 0,05$) e semelhante aos demais grupos ($p > 0,05$).

Já na 1ª coleta após instrumentação, pode-se observar que os grupos G2 (clorexidina), G3 (própolis) e G5 (barbatimão) apresentaram os melhores resultados, com ausência de crescimento microbiano em todos os espécimes. Estes grupos foram semelhantes entre si ($p > 0,05$) e semelhantes aos grupos G6 (romã) e G7 (cavalinha), que apresentaram baixos valores médios de UFC/mL. O grupo G4 (alcaçuz) apresentou valores intermediários de UFC/mL de *E. faecalis*, sendo semelhantes entre si ($p > 0,05$) e diferente dos demais grupos ($p < 0,05$). O grupo G1 (solução fisiológica - controle) apresentou os maiores valores de UFC/mL, sendo diferente de todos os grupos ($p < 0,05$).

Na 2ª coleta após instrumentação, pode-se verificar que o grupo G3 (própolis) apresentou ausência de crescimento microbiano, sendo semelhante ao grupo G2 (clorexidina) ($p > 0,05$) e diferente dos

demais grupos ($p < 0,05$), demonstrando importante efeito residual. O grupo G5 (barbatimão) apresentou valores intermediários de UFC/mL de *E. faecalis*, sendo semelhante aos grupos G2, G4, G6 e G7 ($p > 0,05$) e diferente dos demais grupos. Os grupos G4 (alcaçuz), G6 (romã) e G7 (cavalinha) também apresentaram valores intermediários de UFC/mL, sendo semelhantes entre si, semelhantes a G5 ($p > 0,05$) e diferente dos demais grupos ($p < 0,05$). O grupo G1 (solução fisiológica - controle) apresentou os maiores valores de UFC/mL de *E. faecalis*, sendo diferente de todos os grupos avaliados ($p < 0,05$).

Analisando a diferença entre as coletas de cada grupo experimental, pode-se demonstrar que para todos os grupos, incluindo o controle (G1 - solução fisiológica), houve significativa redução microbiana entre a coleta de confirmação e a 1ª coleta após instrumentação ($p < 0,05$).

Ao comparar a 2ª coleta com a 1ª coleta após a instrumentação, pode-se observar que, no grupo G3 (própolis), a 2ª coleta não apresentou diferença significativa em relação a 1ª coleta ($p > 0,05$), de modo que na 2ª coleta este grupo também apresentou ausência de crescimento microbiano.

O grupo G2 (clorexidina) também apresentou resultados semelhantes entre as duas coletas ($p > 0,05$), demonstrando importante efeito residual. Nos grupos G1 (solução fisiológica), G5 (barbatimão), G6 (romã) e G7 (cavalinha) houve significativo aumento no crescimento microbiano na 2ª coleta em relação a 1ª coleta após instrumentação ($p < 0,05$). O grupo G4 (alcaçuz) apresentou valores semelhantes de crescimento microbiano nas duas coletas, sem diferença significativa ($p > 0,05$).

A Tabela 4 apresenta os valores médios de UFC/mL de *E. faecalis* de cada coleta em todos os grupos avaliados para facilitar a visualização da relação entre as coletas.

Tabela 4 – Valores médios de UFC/mL (log 10) de *E. faecalis* $\pm$ desvio-padrão obtidos por cada grupo experimental (n=12) em todas as coletas

Grupos	Confirmação	1ª coleta	2ª coleta
G1	6,84 $\pm$ 0,34	4,16 $\pm$ 0,51	5,60 $\pm$ 0,25
G2	5,90 $\pm$ 1,12	0,00 $\pm$ 0,00	0,34 $\pm$ 0,83
G3	6,63 $\pm$ 0,56	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
G4	7,12 $\pm$ 0,60	2,98 $\pm$ 1,67	3,27 $\pm$ 2,43
G5	6,75 $\pm$ 0,39	0,00 $\pm$ 0,00	2,14 $\pm$ 2,34
G6	6,75 $\pm$ 0,44	0,19 $\pm$ 0,66	2,78 $\pm$ 2,08
G7	7,22 $\pm$ 0,32	0,65 $\pm$ 1,23	3,40 $\pm$ 2,06

G1 (controle): solução fisiológica; G2: clorexidina; G3: própolis; G4: alcaçuz; G5: barbatimão; G6: romã; G7: cavalinha.

5.1.2 *Staphylococcus aureus*

Os valores médios de UFC/mL (log10) de *S. aureus* obtidos em cada grupo experimental na coleta de confirmação, 1ª e 2ª coleta após instrumentação estão demonstrados nas Tabelas 5, 6 e 7, respectivamente.

Tabela 5 – Valores médios de UFC/mL (log 10) de *S. aureus* $\pm$ desvio-padrão obtidos por cada grupo experimental (n=12) na coleta de confirmação e formação de grupos homogêneos

	Média $\pm$ desvio-padrão	Grupos homogêneos*	
G1	7,78 $\pm$ 0,33	B	
G2	7,07 $\pm$ 0,46	A	
G3	7,36 $\pm$ 0,64	A	B
G4	7,54 $\pm$ 0,33	A	B
G5	7,20 $\pm$ 0,20	A	
G6	7,50 $\pm$ 0,32	A	B
G7	7,73 $\pm$ 0,36	B	

G1 (controle): solução fisiológica; G2: clorexidina; G3: própolis; G4: alcaçuz; G5: barbatimão; G6: romã; G7: cavalinha.

Tabela 6 – Valores médios de UFC/mL (log 10) de *S. aureus* $\pm$ desvio-padrão obtidos por cada grupo experimental (n=12) na 1ª coleta e formação de grupos homogêneos

	Média $\pm$ desvio-padrão	Grupos homogêneos*
G1	4,99 $\pm$ 0,48	C
G2	0,00 $\pm$ 0,00	A
G3	0,00 $\pm$ 0,00	A
G4	2,53 $\pm$ 1,16	B
G5	0,00 $\pm$ 0,00	A
G6	0,85 $\pm$ 1,30	B
G7	0,44 $\pm$ 1,08	B

G1 (controle): solução fisiológica; G2: clorexidina; G3: própolis; G4: alcaçuz; G5: barbatimão; G6: romã; G7: cavalinha.

Tabela 7 – Valores médios de UFC/mL (log 10) de *S. aureus* $\pm$ desvio-padrão obtidos por cada grupo experimental (n=12) na 2ª coleta e formação de grupos homogêneos

	Média $\pm$ desvio-padrão	Grupos homogêneos*
G1	5,40 $\pm$ 0,20	D
G2	0,00 $\pm$ 0,00	A
G3	0,79 $\pm$ 1,84	A
G4	5,18 $\pm$ 0,73	C D
G5	2,06 $\pm$ 2,21	B
G6	3,46 $\pm$ 2,12	B C
G7	2,88 $\pm$ 1,78	B

G1 (controle): solução fisiológica; G2: clorexidina; G3: própolis; G4: alcaçuz; G5: barbatimão; G6: romã; G7: cavalinha.

Após análise estatística, pode-se verificar que, na coleta de confirmação, houve crescimento semelhante de *S. aureus* nos grupos G2, G3, G4, G5 e G6 ($p>0,05$). Os grupos G1 (solução fisiológica) e G7 (cavalinha) apresentaram valores de UFC/mL significativamente maiores, sendo semelhantes entre si ($p>0,05$), semelhantes aos grupos G3 (própolis), G4 (alcaçuz) e G6 (romã) ($p>0,05$) e diferente dos demais grupos ($p<0,05$).

Na 1ª coleta após instrumentação, pode-se observar que os grupos G2 (clorexidina), G3 (própolis) e G5 (barbatimão) apresentaram os melhores resultados, com ausência de crescimento microbiano em todos os espécimes, sendo semelhantes entre si ($p>0,05$) e diferentes dos demais grupos ($p<0,05$). Os grupos G4 (alcaçuz), G6 (romã) e G7 (cavalinha) apresentaram valores intermediários de UFC/mL de *S. aureus*, sendo semelhantes entre si ($p>0,05$) e diferente dos demais grupos ($p<0,05$). O grupo G1 (solução fisiológica - controle) apresentou os maiores valores de UFC/mL, sendo diferente de todos os demais grupos ($p<0,05$).

Na 2ª coleta após instrumentação, pode-se verificar que o grupo G2 (clorexidina) apresentou ausência de crescimento microbiano, sendo semelhante ao grupo G3 (própolis) ($p>0,05$). Os grupos G5 (barbatimão) e G7 (cavalinha) apresentaram valores intermediários de UFC/mL, sendo semelhantes entre si ($p>0,05$), semelhantes ao grupo G6 (romã) ($p>0,05$) e diferentes dos demais grupos ($p<0,05$). O grupo G4 (alcaçuz) apresentou valores altos de UFC/mL de *S. aureus*, sendo semelhante ao grupo G6 (romã) e G1 (solução fisiológica - controle) ($p>0,05$) e diferente dos demais grupos ($p<0,05$).

Analisando a diferença entre as coletas de cada grupo experimental, pode-se demonstrar que para todos os grupos, incluindo o controle (G1 - solução fisiológica), houve significativa redução de *S. aureus* entre a coleta de confirmação e a 1ª coleta após instrumentação ($p<0,05$).

Ao comparar a 2ª coleta com a 1ª coleta após a instrumentação, pode-se observar que, no grupo G2 (clorexidina), a 2ª coleta não apresentou diferença significativa em relação a 1ª coleta ($p>0,05$), de modo que na 2ª coleta este grupo também apresentou ausência de crescimento microbiano. O grupo G3 (própolis) também

apresentou resultados semelhantes entre as duas coletas ($p>0,05$), demonstrando importante efeito residual.

Nos grupos G4 (alcaçuz), G5 (barbatimão), G6 (romã) e G7 (cavalinha) houve significativo aumento no crescimento microbiano na 2ª coleta em relação a 1ª coleta após instrumentação ($p<0,05$).

O grupo G1 (solução fisiológica - controle) apresentou altos valores de UFC/mL de *S. aureus* nas duas coletas após instrumentação, não havendo diferença significativa entre elas ($p>0,05$).

A Tabela 8 apresenta os valores médios de UFC/mL de *S. aureus* de cada coleta em todos os grupos avaliados para facilitar a visualização da relação entre as coletas.

Tabela 8 – Valores médios de UFC/mL (log 10) de *S. aureus* $\pm$ desvio-padrão obtidos por cada grupo experimental (n=12) em todas as coletas

Grupos	Confirmação	1ª coleta	2ª coleta
G1	7,78 $\pm$ 0,33	4,99 $\pm$ 0,48	5,40 $\pm$ 0,20
G2	7,07 $\pm$ 0,46	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
G3	7,36 $\pm$ 0,64	0,00 $\pm$ 0,00	0,79 $\pm$ 1,84
G4	7,54 $\pm$ 0,33	2,53 $\pm$ 1,16	5,18 $\pm$ 0,73
G5	7,20 $\pm$ 0,20	0,00 $\pm$ 0,00	2,06 $\pm$ 2,21
G6	7,50 $\pm$ 0,32	0,85 $\pm$ 1,30	3,46 $\pm$ 2,12
G7	7,73 $\pm$ 0,36	0,44 $\pm$ 1,08	2,88 $\pm$ 1,78

G1 (controle): solução fisiológica; G2: clorexidina; G3: própolis; G4: alcaçuz; G5: barbatimão; G6: romã; G7: cavalinha.

5.1.3 *Escherichia coli*

Os valores médios de UFC/mL (log10) de *E. coli* obtidos em cada grupo experimental na coleta de confirmação, 1ª e 2ª coleta após instrumentação estão demonstrados nas Tabelas 9, 10 e 11, respectivamente.

Tabela 9 – Valores médios de UFC/mL (log 10) de *E. coli* $\pm$ desvio-padrão obtidos por cada grupo experimental (n=12) na coleta de confirmação e formação de grupos homogêneos.

	Média $\pm$ desvio-padrão	Grupos homogêneos*
G1	6,92 $\pm$ 0,66	A
G2	6,91 $\pm$ 0,36	A
G3	6,35 $\pm$ 1,35	A
G4	6,91 $\pm$ 0,94	A
G5	6,30 $\pm$ 0,92	A
G6	6,69 $\pm$ 0,72	A
G7	6,69 $\pm$ 1,03	A

G1 (controle positivo): solução fisiológica; G2 (controle negativo): clorexidina; G3: própolis; G4: alcaçuz; G5: barbatimão; G6: romã; G7: cavalinha.

*letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

Tabela 10 – Valores médios de UFC/mL (log 10) de *E. coli* $\pm$ desvio-padrão obtidos por cada grupo experimental (n=12) na 1ª coleta e formação de grupos homogêneos.

	Média $\pm$ desvio-padrão	Grupos homogêneos*
G1	4,52 $\pm$ 0,78	C
G2	0,00 $\pm$ 0,00	A
G3	0,00 $\pm$ 0,00	A
G4	1,12 $\pm$ 1,66	B
G5	1,65 $\pm$ 1,47	B
G6	0,00 $\pm$ 0,00	A
G7	0,28 $\pm$ 0,97	A

G1 (controle positivo): solução fisiológica; G2 (controle negativo): clorexidina; G3: própolis; G4: alcaçuz; G5: barbatimão; G6: romã; G7: cavalinha.

*letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

Tabela 11 – Valores médios de UFC/mL (log 10) de *E. coli* $\pm$ desvio-padrão obtidos por cada grupo experimental (n=12) na 2ª coleta e formação de grupos homogêneos.

	Média $\pm$ desvio-padrão	Grupos homogêneos*
G1	7,43 $\pm$ 0,67	D
G2	0,31 $\pm$ 1,08	A
G3	0,00 $\pm$ 0,00	A
G4	1,36 $\pm$ 2,15	B
G5	4,73 $\pm$ 1,26	C D
G6	0,86 $\pm$ 1,36	B
G7	1,76 $\pm$ 1,88	B C

G1 (controle positivo): solução fisiológica; G2 (controle negativo): clorexidina; G3: própolis; G4: alcaçuz; G5: barbatimão; G6: romã; G7: cavalinha.

*letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

Após análise estatística, pode-se verificar que, na coleta de confirmação, houve crescimento semelhante de *E. coli* em todos os grupos ($p > 0,05$). Já na 1ª coleta após instrumentação, pode-se observar que os grupos G2 (clorexidina), G3 (própolis) e G6 (romã) apresentaram os melhores resultados, com ausência de crescimento microbiano em

todos os espécimes. Estes grupos foram semelhantes entre si ($p>0,05$) e semelhantes ao grupo G7 (cavalinha), que apresentou baixo valor médio de UFC/mL. Os grupos G4 (alcaçuz) e G5 (barbatimão) apresentaram valores intermediários de UFC/mL de *E. coli*, sendo semelhantes entre si ($p>0,05$) e diferente dos demais grupos ($p<0,05$). O grupo G1 (solução fisiológica - controle) apresentou os maiores valores de UFC/mL, sendo diferente de todos os grupos ($p<0,05$).

Na 2ª coleta após instrumentação, pode-se verificar que o grupo G3 (própolis) apresentou ausência de crescimento microbiano, sendo semelhante ao grupo G2 (clorexidina) ($p>0,05$). Os grupos G4 (alcaçuz) e G6 (romã) apresentaram baixos valores médios de UFC/mL de *E. coli*, sendo semelhantes entre si ($p>0,05$), semelhante ao grupo G7 (cavalinha) ($p>0,05$) e diferente dos demais grupos ($p<0,05$). O grupo G7 (cavalinha) apresentou valores intermediários de UFC/mL, sendo semelhante aos grupos G4, G5 e G6 ($p>0,05$) e diferente dos demais grupos ($p<0,05$). O grupo G5 (barbatimão) apresentou altos valores de UFC/mL, sendo semelhante aos grupos G7 e G1 (controle) ($p>0,05$) e diferente dos demais grupos ($p<0,05$). O grupo G1 (solução fisiológica - controle) apresentou os maiores valores de UFC/mL de *E. coli*, sendo semelhante apenas ao grupo G5 ($p>0,05$).

Analisando a diferença entre as coletas de cada grupo experimental, pode-se demonstrar que para todos os grupos, incluindo o controle (G1 - solução fisiológica), houve significativa redução microbiana entre a coleta de confirmação e a 1ª coleta após instrumentação ($p<0,05$).

Ao comparar a 2ª coleta com a 1ª coleta após a instrumentação, pode-se observar que, no grupo G3 (própolis), a 2ª coleta não apresentou diferença significativa em relação a 1ª coleta ($p>0,05$), de modo que na 2ª coleta este grupo também apresentou ausência de crescimento microbiano.

Os grupos G2 (clorexidina), G6 (romã) e G4 (alcaçuz) também apresentaram resultados semelhantes entre as duas coletas ($p>0,05$). Nos grupos G7 (cavalinha), G5 (barbatimão) e G1 (solução fisiológica) houve significativo crescimento microbiano na 2ª coleta em relação a 1ª coleta após instrumentação ($p<0,05$).

A Tabela 12 apresenta os valores médios de UFC/mL de *E. coli* de cada coleta em todos os grupos avaliados para facilitar a visualização da relação entre as coletas.

Tabela 12 – Valores médios de UFC/mL (log 10) de *E. coli* $\pm$ desvio-padrão obtidos por cada grupo experimental (n=12) em todas as coletas.

Grupos	Confirmação	1ª coleta	2ª coleta
G1	6,92 $\pm$ 0,66	4,52 $\pm$ 0,78	7,43 $\pm$ 0,67
G2	6,91 $\pm$ 0,36	0,00 $\pm$ 0,00	0,31 $\pm$ 1,08
G3	6,35 $\pm$ 1,35	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
G4	6,91 $\pm$ 0,94	1,12 $\pm$ 1,66	1,36 $\pm$ 2,15
G5	6,30 $\pm$ 0,92	1,65 $\pm$ 1,47	4,73 $\pm$ 1,26
G6	6,69 $\pm$ 0,72	0,00 $\pm$ 0,00	0,86 $\pm$ 1,36
G7	6,69 $\pm$ 1,03	0,28 $\pm$ 0,97	1,76 $\pm$ 1,88

G1 (controle): solução fisiológica; G2: clorexidina; G3: própolis; G4: alcaçuz; G5: barbatimão; G6: romã; G7: cavalinha.

5.2 Quantificação de endotoxinas

Os valores médios de endotoxinas de *E. coli* (EU/mL) obtidos em cada espécime dos grupos experimentais na 1ª coleta (imediatamente após a instrumentação) e na 2ª coleta (7 dias após a instrumentação) estão demonstrados nas Tabelas 24 e 25 (Apêndice B).

Os valores médios de endotoxinas de *E. coli* (EU/mL) obtidos em cada grupo experimental na 1ª coleta após instrumentação estão demonstrados na Tabela 13.

Tabela 13 - Valores médios de endotoxinas de *E. coli* (EU/mL), desvio-padrão e formação de grupos homogêneos, obtidos por cada grupo na 1ª coleta após instrumentação

Grupos	Média ± Desvio-padrão	Posto médio	Grupos homogêneos
G1	2177 ± 1096	63,70	B C
G2	842 ± 626	34,75	A B
G3	3286 ± 2100	71,79	C
G4	570 ± 383	26,66	A
G5	443,9 ± 278,8	21,16	A
G6	768 ± 566	33,12	A
G7	1233 ± 766	46,29	A B C

G1 (controle): solução fisiológica; G2: clorexidina; G3: própolis; G4: alcaçuz; G5: barbatimão; G6: romã; G7: cavalinha.

*letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

Analizando os resultados, pode-se verificar que os grupos G4 (alcaçuz), G5 (barbatimão) e G6 (romã) apresentaram os menores valores médios de endotoxinas, sendo semelhantes entre si, semelhantes ao grupo G2 (clorexidina) ($p > 0,05$) e diferentes dos demais grupos ($p < 0,05$). O grupo G2 (clorexidina) apresentou valores intermediários de endotoxinas, sendo semelhante aos grupos G1, G4, G5, G6 e G7 ($p > 0,05$) e diferente apenas de G3 (própolis) ($p < 0,05$). O grupo G7 (cavalinha) também apresentou valores intermediários de endotoxinas, sendo semelhante a todos os grupos ($p > 0,05$). O grupo G1 (controle) apresentou altos valores de endotoxinas, sendo semelhante ao grupo G2 (clorexidina) e G3 (própolis) ($p > 0,05$) e diferente dos demais grupos ($p < 0,05$). O grupo G3 (própolis) apresentou os maiores valores médios de

endotoxinas, sendo semelhante ao grupo G1 (controle) e diferente dos demais grupos ($p < 0,05$).

Os valores médios de endotoxinas de *E. coli* (EU/mL) obtidos em cada grupo experimental na 2ª coleta após instrumentação estão demonstrados na Tabela 14.

Tabela 14 - Valores médios de endotoxinas de *E. coli* (EU/mL), desvio-padrão e formação de grupos homogêneos, obtidos por cada grupo na 2ª coleta após instrumentação

Grupos	Média $\pm$ Desvio-padrão	Posto médio	Grupos homogêneos
G1	50000 $\pm$ 0,00	74,50	B
G2	4551 $\pm$ 3335	29,12	A
G3	5284 $\pm$ 2289	38,45	A
G4	3428 $\pm$ 4733	19,83	A
G5	39233 $\pm$ 16167	70,00	B
G6	4777 $\pm$ 3798	29,75	A
G7	6497 $\pm$ 4795	35,83	A

G1 (controle): solução fisiológica; G2: clorexidina; G3: própolis; G4: alcaçuz; G5: barbatimão; G6: romã; G7: cavalinha.

*letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

Analisando os resultados, pode-se verificar que houve aumento de endotoxinas em todos os grupos em relação à primeira coleta após instrumentação. Os grupos G2 (clorexidina), G3 (própolis), G4 (alcaçuz), G6 (romã) e G7 (cavalinha) apresentaram os menores valores de endotoxinas, sendo semelhantes entre si ($p > 0,05$) e diferentes dos grupos G1 e G5 ($p < 0,05$). Os grupos G1 (controle) e G5 (barbatimão) apresentaram altos valores de endotoxinas, sendo semelhantes entre si ($p > 0,05$) e diferente dos demais grupos ($p < 0,05$).

5.3 Produção de citocinas (IL-1 β e TNF- α)

5.3.1 Produção de IL-1 β

Os valores médios da quantidade de IL-1 β (pg/mL) obtidos nos sobrenadantes das culturas celulares após ativação pelo conteúdo coletado dos canais radiculares de cada grupo experimental (n=12) na 1ª coleta após a instrumentação, desvios-padrão e formação de grupos homogêneos estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 – Valores médios de IL-1 β (pg/mL) $\pm$ desvio-padrão obtidos por cada grupo experimental (n=12) na 1ª coleta após instrumentação e formação de grupos homogêneos.

Grupos (n=12)	Irrigação	Média $\pm$ Desvio-padrão	Grupos homogêneos*
G1	Solução fisiológica	550,80 $\pm$ 554,74	B
G2	Clorexidina	3,86 $\pm$ 4,32	A
G3	Própolis	11,66 $\pm$ 19,28	A
G4	Alcaçuz	277,07 $\pm$ 469,41	A B
G5	Barbatimão	38,17 $\pm$ 129,71	A
G6	Romã	1,67 $\pm$ 5,81	A
G7	Cavalinha	94,97 $\pm$ 322,81	A

*letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

Analisando-se os resultados, pode-se observar que, na 1ª coleta após instrumentação, os grupos G2 (clorexidina), G3 (própolis) e G6 (romã) apresentaram os menores valores médios de IL-1 β , sendo semelhantes entre si ($p>0,05$), semelhantes aos grupos G5 (barbatimão) e G7 (cavalinha) ($p>0,05$), que também apresentaram baixos valores de IL-1 β , e diferentes do grupo G1 ($p<0,05$). O grupo G4 (alcaçuz)

apresentou valores intermediários de IL-1 β , sendo semelhantes a todos os grupos avaliados ($p>0,05$). O grupo G1 (solução fisiológica – controle) apresentou os maiores valores de IL-1 β , sendo semelhante a G4 ($p>0,05$) e diferente dos demais grupos ($p<0,05$).

Os valores médios da quantidade de IL-1 β (pg/mL) obtidos nos sobrenadantes das culturas celulares após ativação pelo conteúdo coletado dos canais radiculares de cada grupo experimental ($n=12$) na 2ª coleta após a instrumentação, desvios-padrão e formação de grupos homogêneos estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 – Valores médios de IL-1 β (pg/mL) $\pm$ desvio-padrão obtidos por cada grupo experimental ($n=12$) na 2ª coleta após instrumentação e formação de grupos homogêneos.

Grupos (n=12)	Irrigação	Média $\pm$ Desvio-padrão	Grupos homogêneos*
G1	Solução fisiológica	762,13 $\pm$ 230,91	C
G2	Clorexidina	12,76 $\pm$ 11,69	A
G3	Própolis	11,21 $\pm$ 10,24	A
G4	Alcaçuz	256,65 $\pm$ 394,84	A B
G5	Barbatimão	753,30 $\pm$ 502,92	C
G6	Romã	73,75 $\pm$ 235,19	A
G7	Cavalinha	615,81 $\pm$ 503,66	B C

*letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

Analisando-se os resultados, pode-se observar que, na 2ª coleta após instrumentação, os grupos G2 (clorexidina), G3 (própolis) e G6 (romã) apresentaram os menores valores médios de IL-1 β , sendo semelhantes entre si ($p>0,05$), semelhantes ao grupo G4 (alcaçuz) e diferentes dos demais grupos ($p<0,05$). O grupo G4 (alcaçuz) apresentou valores intermediários de IL-1 β , sendo semelhante aos grupos G2, G3, G6 e G7 (cavalinha) ($p>0,05$) e diferente de G1 (controle) e G5

(barbatimão). O grupo G7 (cavalinha) apresentou altos valores de IL-1 β , sendo semelhante a G1, G4 e G5 ($p>0,05$) e diferente dos demais grupos ($p<0,05$). Os grupos G1 (controle) e G5 (barbatimão) apresentaram os maiores valores de IL-1 β , sendo diferentes dos demais grupos ($p<0,05$).

5.3.2 Produção de TNF- α

Os valores médios da quantidade de TNF- α (pg/mL) obtidos nos sobrenadantes das culturas celulares após ativação pelo conteúdo coletado dos canais radiculares foram superiores a 2000 pg/mL em todos os grupos avaliados, tanto na 1ª como na 2ª coleta, não havendo diferença significativa entre eles.

6 DISCUSSÃO

6.1 Da metodologia

A utilização de dentes humanos em pesquisas *in vitro* enfrenta dificuldades em relação à questão ética, à dificuldade de obtenção dos mesmos e à padronização da amostra. Quanto à ética, utilizou-se nesta pesquisa dentes extraídos em clínicas odontológicas particulares, por motivos diversos e com prévia autorização dos pacientes por meio do consentimento livre e esclarecido. Referente à padronização da amostra, as coroas foram seccionadas padronizando-se o tamanho da raiz em 16 mm e os espécimes foram inicialmente instrumentados até lima Kerr nº 30 para padronizar o diâmetro inicial do canal radicular. Foi realizada vedação da região apical com resina composta fotopolimerizável para impossibilitar a saída dos microrganismos e suas endotoxinas, e também dos agentes irrigantes durante a instrumentação e medicações intracanaais (Oliveira et al., 2007). A raiz foi impermeabilizada externamente com resina epóxi para garantir perfeito vedamento (Oliveira et al., 2007).

Os espécimes e todo material utilizado na pesquisa como dentes, limas, algodão, gaze e ponteiros foram detoxificados pela radiação gama cobalto 60. Csako et al. (1983) verificaram que a radiação gama com cobalto 60 neutraliza pirógenos e que esta detoxificação é provavelmente devido a múltiplos efeitos da radiação sobre LPS, envolvendo destruição da porção polissacarídica e alteração do lipídio A, responsável pela toxicidade do LPS. Assim, para eliminar endotoxinas

pré-existent, todo material usado na pesquisa foi submetido à radiação pela empresa EMBRARAD (Empresa Brasileira de Radiação).

Foram selecionadas nesta pesquisa duas bactérias Gram-positivas (*E. faecalis* e *S. aureus*), que estão geralmente associadas aos casos de insucesso do tratamento endodôntico. A prevalência de *E. faecalis* é maior em infecções secundárias do que em infecções primárias, estando presente entre 24 a 77% dos casos de lesões periapicais persistentes, especialmente assintomáticas (Peculene et al., 2001; Siqueira Jr.; Gomes et al., 2004; Rôças et al., 2004; Sen, 2004; Stuart et al., 2006; Sakamoto et al., 2008). *S. aureus* também é uma bactéria que oferece grande resistência ao tratamento endodôntico, estando presente tanto em infecções primárias como nas infecções persistentes dos canais radiculares (Siqueira Jr. et al., 2001; Jacinto et al., 2007; Tanomaru et al., 2008; Tirali et al., 2009).

Como as infecções dos canais radiculares são polimicrobianas, causadas por microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, destaca-se a importância do uso, durante o tratamento endodôntico, de substâncias com ampla atividade antimicrobiana e que ainda sejam capazes de neutralizar produtos bacterianos como endotoxinas (Jacinto et al.; Oliveira et al., 2005; Vianna et al., 2007). Assim, foi também acrescentado neste estudo *E. coli*, um coco bacilo Gram-negativo, que possui LPS na membrana externa da parede celular, representando importante fator de virulência deste microrganismo. *E. coli* não é encontrado com alta frequência no interior de canais radiculares com polpa necrosada, no entanto, alguns autores encontraram *E. coli* em 3,7% dos casos de abscesso perirradicular agudo e em 10% dos casos de periodontite apical crônica (Siqueira Jr., 2001; Peculene et al., 2001). Apesar de não ser uma bactéria encontrada com alta frequência no interior de canais radiculares com polpa necrosada, sua endotoxina apresenta o lipídeo A, que representa o centro ativo responsável pela toxicidade do LPS. Desta forma, este microrganismo é utilizado em

diversos estudos que visam avaliar métodos de neutralização de endotoxinas (Rietschel et al., 1994; Petsch; Anspach, 2000, Oliveira et al., 2005; Maekawa, 2007; Oliveira et al., 2007, Molina, 2008).

O tempo de contaminação foi estabelecido em 28 dias para *E. coli* e 21 dias para *E. faecalis* e *S. aureus*, pois para associar *E. coli* aos demais microrganismos foi necessária sua inoculação nos canais radiculares 7 dias antes dos demais microrganismos, de acordo com estudo piloto. No estudo de Molina (2008), *E. coli* foi associada com *E. faecalis* e *C. albicans* e, no atual estudo, a associação foi de *E. coli* com *E. faecalis* e *S. aureus*. Como nos últimos anos houve um crescente interesse na utilização de extratos naturais em diferentes áreas biológicas, como métodos alternativos de tratamento, a utilização destes extratos na odontologia, como agentes irrigantes dos canais radiculares, representa importante área de pesquisa (Molina, 2008). Como os estudos que avaliam a atividade antimicrobiana de extratos naturais são poucos diante da grande diversidade de plantas existentes na flora brasileira, foram selecionados, na presente pesquisa, cinco diferentes extratos glicólicos (própolis, alcaçuz, barbatimão, romã e cavalinha), baseado em alguns resultados apresentados na literatura, no uso popular e nas propriedades terapêuticas.

Na presente pesquisa, foi utilizado o teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (LAL- QCL) para quantificar endotoxinas em canais radiculares. O *Limulus* é constituído por um lisado dos amebócitos circulantes de caranguejo ferradura (*Limulus polyphemus*) que, quando exposto a quantidades pequenas de endotoxinas, aumenta sua opacidade bem como sua viscosidade, tornando-se um gel duro (Levin; Bang, 1968). Estes autores demonstraram que a formação do coágulo era resultado de uma reação enzimática entre a endotoxina e uma proteína coagulável presente na circulação do amebócito de *Limulus*. Assim, pelo método QCL cinético do LAL, a endotoxina da bactéria Gram-negativa catalisa a ativação de uma

pré-enzima em enzima. A enzima ativada catalisa a clivagem do substrato sintético Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNa em peptídeo (Ac-Ile-Glu-Ala-Arg) e p-nitroanilina (pNa), de coloração amarela. A pNa transformada durante a reação é medida fotometricamente a 405 nm, continuamente, durante o período de incubação (37°C). Assim, utilizando-se concentrações conhecidas de endotoxinas (curva-padrão) foi possível determinar numericamente a quantidade de endotoxinas presentes nas amostras coletadas dos canais radiculares.

Este método é muito sensível e apresenta capacidade para detectar a partir de 0,005 unidades de endotoxinas, possibilitando maior precisão na determinação da quantidade de endotoxina presente nos canais radiculares. Apesar deste método ser muito confiável no monitoramento de endotoxina, muitas substâncias ou alterações bruscas no pH podem causar alterações no teste e interferir nos resultados. Assim, para identificar possíveis interferentes da reação nas amostras coletadas dos canais radiculares, todos os testes foram realizados em quadruplicata para cada amostra, sendo que uma duplicata foi usada como controle positivo, ou seja, foi contaminada com uma concentração conhecida de endotoxina padrão de *E. coli*, de modo que o resultado deste controle positivo indicava se a amostra possuía ou não interferentes. Nenhuma das amostras apresentou interferentes da reação, de modo que todos os resultados obtidos foram válidos.

Para avaliar os efeitos citotóxicos do conteúdo coletado dos canais radiculares, foi utilizada a linhagem de macrófagos de camundongo RAW 264.7, pois estes macrófagos são freqüentemente utilizados em pesquisa para avaliar os efeitos de LPS e produção de citocinas e outros mediadores da resposta inflamatória (Jiang et al., 2003, Refai et al., 2004; Gao et al., 2007; Lee et al., 2007; Xu et al., 2007). Para quantificar as citocinas (IL-1 β e TNF- α), foram utilizados os kits para reação de ELISA da R & D, pois vários estudos publicados em periódicos internacionais com seletiva política editorial utilizam os kits do fabricante R

& D para dosar citocinas (Hong et al., 2004; Bostanci et al., 2007; Lee et al., 2008; Youn et al., 2008).

6.2 Dos Resultados

6.2.1 Análise Microbiológica

Os resultados da presente pesquisa concordaram com o estudo de Byström e Sundqvist (1981), pois houve redução significativa dos 3 microrganismos entre a coleta de confirmação e a 1ª coleta após instrumentação, independente do agente irrigante utilizado, incluindo solução fisiológica, o que demonstrou que o ato de irrigar, limar e aspirar remove uma parte dos microrganismos presentes nos canais radiculares. No entanto, esta remoção parcial não é suficiente, pois os microrganismos remanescentes podem proliferar no interior dos canais radiculares e túbulos dentinários, levando o tratamento endodôntico ao insucesso. Com isso, faz-se necessária a utilização de agentes irrigantes com atividade antimicrobiana a fim de eliminar o maior número de microrganismos presentes no sistema de canais radiculares. No atual estudo, todos os extratos avaliados (própolis, alcaçuz, barbatimão, romã e cavalinha) apresentaram ação antimicrobiana sobre *E. faecalis*, *S. aureus* e *E. coli*, promovendo significativa redução de microrganismos em relação ao grupo controle (solução fisiológica), contudo, alguns extratos foram mais efetivos que outros.

O extrato glicólico de própolis 12% foi o agente irrigante que apresentou os melhores resultados sobre os três microrganismos avaliados, apresentando eliminação total nas duas coletas após instrumentação, o que demonstrou efetiva ação antimicrobiana e

importante efeito residual. Estes resultados concordaram com o estudo de Molina (2008), que utilizou extrato glicólico de própolis sobre *C. albicans*, *E. faecalis* e *E. coli* em canais radiculares. Outros estudos também demonstraram ação efetiva do extrato de própolis sobre diferentes microrganismos, no entanto, a maioria dos estudos na literatura utilizou extrato alcoólico de própolis e não glicólico (Koo et al., 2000; Ferreira et al., 2007; Cardoso et al., 2009).

A ação antimicrobiana da própolis é devida principalmente a presença de flavonóides (Burdock, 1998), especialmente pinocembrina, galangina e sakuranetina (Koo et al., 2000). Segundo Koru et al. (2007), além dos flavonóides, os ácidos aromáticos e compostos fenólicos também são importantes princípios ativos. Alguns estudos têm sugerido que a atividade da própolis contra microrganismos está mais relacionada aos efeitos sinérgicos dos flavonóides e de outros compostos fenólicos do que de cada componente individualmente (Amoros et al. 1994; Koo et al., 2000). Mais de 300 substâncias já foram encontradas na própolis (Bankova et al., 1995), sendo que a composição varia de acordo com a região em que foi coletada (Monti et al., 1983; Koru et al., 2007).

Segundo Ferreira et al. (2007), a própolis brasileira é caracterizada por uma baixa concentração de flavonóides e ésteres de ácidos fenólicos, que são compostos antimicrobianos típicos de regiões temperadas, por outro lado, possui alta concentração de ácido dihidrocinâmico, acetofenonas feniladas e terpenóides específicos, que também apresentam atividade antimicrobiana. De acordo com seu estudo, Ferreira et al. sugeriram que o ácido 3,5-diprenil-4-dihidroxicinâmico deve ser o principal constituinte antimicrobiano da própolis brasileira. De acordo com o fabricante (Apis flora), o extrato glicólico de própolis utilizado neste estudo apresentou 6,54 mg/mL de flavonóides totais e 2,07% de fenóis totais, dentre outros compostos. Geralmente a própolis é composta por 50% de resina e bálsamo vegetal, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de várias outras substâncias, incluindo

restos orgânicos dependendo do local e tempo da coleta. Assim, os componentes da própolis variam muito de acordo com clima, estação, local e ano (Molina, 2008). Na presente pesquisa foi avaliada a ação antimicrobiana do extrato glicólico de própolis como um todo, e pode-se verificar que este extrato, produzido em Dezembro de 2008 pela empresa ApisFlora (Lote:008/08) apresentou efetiva ação antimicrobiana tanto sobre *E. faecalis* e *S. aureus* como *E. coli* quando utilizado como agente irrigante nos canais radiculares, demonstrando inclusive importante efeito residual, pois houve eliminação total dos microrganismos tanto na 1ª como na 2ª coleta após instrumentação.

Estes resultados concordaram com o estudo de Molina (2008), que verificou que o extrato glicólico de própolis foi efetivo sobre *E. faecalis*, *E. coli* e *C. albicans* quando utilizado como solução irrigadora em canais radiculares. Os resultados da presente pesquisa também concordaram com diferentes estudos, que, utilizando diferentes metodologias, verificaram que o extrato alcoólico de própolis apresentou importante atividade antimicrobiana sobre vários microrganismos, incluindo *C. albicans*, *E. faecalis*, *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *Prevotella denticola*, *A. naeslundii*, *Malassezia pachydermatis*, *S. intermedius* e *S. aureus* (Koo et al., 2000; Cardoso et al., 2009). Alguns estudos demonstraram que o extrato etanólico de própolis é mais efetivo contra bactérias Gram-positivas (Grange et al., 1990; Koru et al., 2007), no entanto, o atual estudo não demonstrou diferença na ação antimicrobiana do extrato glicólico sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Em 2006, Onçaag et al. verificaram que a própolis apresentou atividade antibacteriana sobre *E. faecalis* em canais radiculares, sugerindo seu uso como medicamento intracanal alternativo. Em 2009, Awawdeh et al. estudaram o efeito antimicrobiano da própolis e do hidróxido de cálcio em discos de dentina contaminados com *E. faecalis*, e verificaram que a própolis foi significativamente mais efetiva que o hidróxido de cálcio, eliminando rapidamente o microrganismo.

De acordo com os resultados da presente pesquisa, o extrato glicólico de própolis tem potencial semelhante a clorexidina para ser utilizado como agente antimicrobiano na irrigação dos canais radiculares. A clorexidina é uma substância química auxiliar bastante utilizada na Endodontia e diversos estudos demonstraram efetiva ação antimicrobiana da clorexidina, com importante efeito residual (Basrane et al., 2002; Gomes et al., 2006; Sena et al., 2006; Dametto et al., 2005). De acordo com Vianna et al. (2006), o efeito antimicrobiano da clorexidina é devido sua capacidade de se ligar a regiões eletronegativas da bactéria e de atacar a membrana citoplasmática bacteriana causando prejuízos na bicamada de fosfolipídios, perda do equilíbrio osmótico e liberação do material intracelular. Além disso, a clorexidina tem capacidade de se adsorver aos tecidos duros dentários com graduada e prolongada liberação em níveis terapêuticos, promovendo efeito residual no sistema de canais radiculares (Dametto et al., 2005). Contudo, apesar do extrato glicólico de própolis apresentar resultados semelhantes, os mecanismos de ação antimicrobiana da própolis ainda não estão claramente compreendidos.

O extrato glicólico de barbatimão também apresentou importante atividade antimicrobiana no atual estudo, especialmente sobre *S. aureus* e *E. faecalis*, pois promoveu eliminação total destes microrganismos na 1ª coleta após instrumentação. Com relação *E. coli*, o extrato de barbatimão também mostrou-se efetivo, com redução significativa de UFC/mL em relação ao controle. Estes resultados concordaram com o estudo de Dos Santos et al. (2009), que demonstraram atividade antimicrobiana de extratos aquoso e etanólico de barbatimão sobre *S. mutans*, *S. aureus*, *A. actinomicetemcomitans* e *C. albicans*, sendo que o extrato etanólico foi mais eficiente. Na presente pesquisa, foi utilizado o extrato glicólico de barbatimão, o qual demonstrou maior ação sobre bactérias Gram-positivas. Como existem poucos estudos relatados na literatura que avaliaram ação antimicrobiana

do barbatimão, torna-se difícil a comparação dos resultados. Em 2006, Ishida et al. demonstraram que uma subfração do extrato etanólico de barbatimão apresentou importante atividade antifúngica e baixa citotoxicidade. Os autores sugeriram que as propriedades do barbatimão sobre crescimento de *C. albicans*, fatores de virulência e sua baixa citotoxicidade justificam mais estudos para investigar os mecanismos de ação e o possível desenvolvimento de um novo agente antifúngico.

Segundo Dos Santos et al. (2009), já foi demonstrado que taninos do barbatimão e compostos relacionados possuem efeito bactericida, antiviral, moluscida, antielmíntico e protozoaricida além de outras diversas atividades biológicas e farmacológicas (Santos et al., 2009). Em 2009, Ishida et al. estudaram a ação de taninos, extraídos da casca do tronco do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* Mart.) no crescimento, tamanho da cápsula e pigmentação do fungo *Cryptococcus neoformans*. Estes autores relataram que os taninos influenciaram nestes três importantes fatores de virulência do microrganismo.

Os constituintes ativos do barbatimão ainda não são bem conhecidos, porém, é provável que os taninos sejam as substâncias principais, presentes em grandes quantidades (10% a 37%) de acordo com a espécie, local e época da colheita (Mello et al., 1996; Santos et al., 2009). Três hipóteses podem explicar a atividade antimicrobiana dos taninos: a inibição da atividade enzimática, ação direta no metabolismo celular, através da inibição da fosforilação oxidativa e mecanismos envolvendo a complexação de taninos com íons metabólicos, diminuindo a disponibilidade destes íons para o metabolismo do microrganismo (Santos et al., 2009). Contudo, na presente pesquisa o extrato glicólico de barbatimão não apresentou efeito residual quando utilizado como irrigante do canal radicular, sendo que na 2ª coleta após instrumentação houve significativo aumento no crescimento microbiano de *E. faecalis*, *S. aureus* e *E. coli* nos canais radiculares.

Com relação ao extrato glicólico de romã (*Punica granatum* L.), houve significativa redução de *E. faecalis* e *S. aureus* nos canais radiculares em relação ao controle na 1ª coleta após instrumentação, no entanto, o melhor resultado foi sobre *E. coli*, em que o extrato de romã promoveu ausência de crescimento na 1ª coleta. Estes resultados estão de acordo com alguns estudos (Das et al., 1999; Prashanth et al., 2001; Neig e Jayaprakasha, 2003; Pereira et al., 2006; Choi et al., 2009) que, utilizando diferentes metodologias, também verificaram atividade antimicrobiana do extrato de romã, embora a maioria destes estudos não utilizou extrato glicólico como na presente pesquisa.

Das et al. (1999) verificaram potente atividade antimicrobiana de extrato alcoólico de sementes de frutos frescos, contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (*Bacillus subtilis*, *E. coli*) e *Saccharomices cerevisiae*. Prashanth et al. (2001) demonstraram que todos os extratos (etanólico, clorofórmico, metanólico e aquoso) de *P. granatum* L. apresentaram efetiva ação sobre *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *B. subtilis* e *Salmonella typhy*, sendo que o extrato metanólico apresentou melhor ação. Já em 2003, Negi e Jayaprakasha (2003) demonstraram importante ação antimicrobiana dos extratos cetônico, metanólico e alcoólico da casca de romã (*P. granatum* L.) sobre *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Bacillus coagulens*, *S. aureus*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, sendo que o extrato cetônico foi o mais efetivo. Em 2006, Pereira et al. (2006) verificaram atividade antimicrobiana de extratos alcoólicos (5%) do fruto e da casca do fruto de *P. granatum* L. sobre cepas de *S. aureus*, *E. coli*, e *Enterobacter gergoviae*. Pereira et al. (2006) demonstraram atividade antibacteriana de um gel derivado de *P. granatum*, rico em taninos e polifenólicos, sobre biofilme bacteriano, causando distúrbio na síntese de glicanos e agindo nos mecanismos de aderência de microrganismos à superfície dentária, demonstrando controle do biofilme já formado. Em 2009, Choi et al. verificaram *in vitro* e *in vivo* atividade antimicrobiana do extrato etanólico

de romã (*P. granatum*) sobre diferentes cepas de *Salmonella*. Os autores sugeriram que este extrato apresenta potencial para promover efetivo tratamento contra salmonelose. Al-Zoreky (2009) verificaram que o extrato metanólico da casca de romã (*P. granatum* L.) foi um potente inibidor para *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* e *Yersinia enterocolitica*. Análises fitoquímicas revelaram a presença de inibidores ativos na casca da romã, incluindo fenólicos e flavonóides. Haidari et al. (2009) observaram que polifenóis purificados extraídos da *P. granatum* L. inibiram a replicação e demonstraram efeito sinérgico ao antiviral oseltamivir contra o vírus da Influenza A.

Os principais componentes do extrato do fruto da *P. granatum* L. são taninos e polifenóis, detectados em estudos de prospecção fitoquímica de pós de algumas espécies de plantas, entre elas *P. granatum* L. (Haslam, 1996; Vasconcelos et al., 2006). Machado et al. (2002) descreveram o isolamento e a identificação do tanino responsável pela atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, concluindo que o responsável por esta atividade é o elagitanino punicalagina, e que esta substância química seria a de escolha para o desenvolvimento de um fitofarmacêutico. A ação dos taninos contra bactérias e leveduras pode ser estabelecida por uma relação entre as suas estruturas moleculares, toxicidade e propriedades adstringentes dos taninos. Considera-se que o efeito dos taninos no metabolismo celular seja estabelecido por sua ação na membrana (Vasconcelos et al., 2006). Assim, embora ainda não tenha sido realizada uma análise da composição do extrato glicólico de romã utilizado no presente estudo, acredita-se que esta importante ação antimicrobiana, especialmente sobre *E. coli*, deva-se à presença de taninos e polifenóis no extrato. Com isso, de acordo com os resultados da presente pesquisa e dos estudos apresentados na literatura, o uso do extrato de romã pode ser uma opção viável ao controle de diferentes espécies microbianas, entretanto, para utilização como agente irrigante dos canais radiculares, o extrato de romã

não apresentou efeito residual, de modo que houve significativo aumento no crescimento microbiano na 2ª coleta após instrumentação.

O extrato glicólico de cavalinha (*Equisetum arvense* L.), no presente estudo, promoveu redução significativa de *E. faecalis*, *S. aureus* e *E. coli* na 1ª coleta após instrumentação dos canais radiculares quando usado como agente irrigante, em comparação com o grupo controle. Estes resultados concordaram com o estudo de Radulovic et al. (2006), que verificaram que o óleo essencial das partes aéreas de *E. arvense* L. possui amplo espectro de ação antimicrobiana contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, como *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *Salmonella enteritidis* e fungos como *Aspergillus niger* e *C. albicans*. Estes autores sugeriram que a natureza antimicrobiana de *E. arvense* L. pode ser atribuída a diversas substâncias, principalmente ao timol e linalol. No presente estudo foi utilizado o extrato glicólico de cavalinha e não o óleo essencial, no entanto, mesmo o extrato foi efetivo na redução microbiana no sistema de canais radiculares. Por outro lado, os resultados da presente pesquisa discordaram do estudo de Milovanovic et al. (2007), que verificaram que extrato hidroalcoólico de *E. arvense* L. apresentou discreta atividade antimicrobiana sobre *S. aureus*, *C. albicans* e *A. Niger*. Assim, como são poucos os estudos apresentados na literatura que avaliaram ação antimicrobiana da cavalinha, é necessário ampliar os estudos nesta área, verificando os componentes ativos da cavalinha, visto que este extrato tem potencial antimicrobiano. Contudo, para utilizar como agente irrigante, o extrato glicólico de cavalinha não apresentou efeito residual nos canais radiculares, havendo significativo crescimento microbiano na 2ª coleta após instrumentação.

Com relação ao extrato glicólico de alcaçuz (*Periandra dulcis* Mart. Sin. *Glycyrrhiza mediterranea* Vell.), como agente irrigante dos canais radiculares foi o que apresentou menor ação antimicrobiana em relação aos demais extratos. No entanto, com relação ao controle, o

extrato de alcaçuz promoveu significativa redução microbiana na 1ª coleta após instrumentação. Estes resultados concordaram com alguns estudos que avaliaram ação antimicrobiana de diferentes extratos de alcaçuz. Ates e Erdogrul (2003) verificaram que pelo menos um dos tipos de extratos (alcoólico, clorofórmico, cetônico e em acetato de etila) da raiz de alcaçuz mostrou atividade antimicrobiana contra 12 dos 13 microrganismos testados. Motsei et al. (2003) verificaram que o extrato aquoso do rizoma de *G. glabra* foi altamente efetivo contra 3 cepas de *C. albicans* testadas. Lee et al. (2009) verificaram que o extrato metanólico de alcaçuz (*G. uralensis*) foi efetivo sobre cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina. Contudo, não são verificados relatos na literatura estudos sobre atividade antimicrobiana do extrato glicólico de alcaçuz da espécie *G. mediterranea*, de modo que se torna difícil a comparação dos resultados, havendo a necessidade de ampliar os estudos com estes extratos, a fim de conhecer melhor sua composição e os possíveis mecanismos de ação antimicrobiana.

Sabe-se que o gênero *Glycyrrhiza* apresenta como componentes ativos saponinas, flavonóides, isoflavonas e cumarinas (Asl; Hosseinzadeh, 2008), que apresentam importante atividade antimicrobiana (Asl; Hosseinzadeh, 2008). Segundo Fukai et al. (2002) já foram isolados alcalóides, aminoácidos, cumarinas, óleo essencial, ácidos graxos, flavonóides, polissacarídeos e taninos de extratos de alcaçuz, sendo que a glabridina, uma isoflavona, tem sido descrita como a substância de maior atividade antimicrobiana (Fukai et al., 2002; Gupta et al., 2008). Em 2002, Fukai et al. verificaram a atividade antimicrobiana de glabridina e glabreno (isoflavonas isoladas de *Glycyrrhiza glabra*) contra cepas resistentes e sensíveis de *S. aureus*, sendo que a glabridina foi eficaz contra todas as cepas de *S. aureus*. Na atual pesquisa, o extrato glicólico de alcaçuz (*G. mediterranea*) foi efetivo sobre *S. aureus*, *E. faecalis* e *E. coli*, em comparação com o controle, na 1ª coleta após

instrumentação, entretanto, sem efeito residual, promovendo significativo crescimento microbiano na 2ª coleta.

Contudo, pode-se verificar que os diferentes extratos naturais avaliados (própolis, romã, barbatimão, cavalinha e alcaçuz) apresentaram atividade antimicrobiana sobre *E. faecalis*, *S. aureus* e *E. coli*, entretanto, para ser utilizado como agente irrigante dos canais radiculares apenas o extrato glicólico de própolis apresentou forte ação antimicrobiana e significativo efeito residual, promovendo ausência de crescimento microbiano em todos os espécimes. Assim, sua utilização como irrigante alternativo pode trazer benefícios à terapia endodôntica, sendo importante a realização de estudos *in vivo* para comprovar sua eficácia nos casos de necrose pulpar e/ou de insucesso do tratamento endodôntico convencional.

6.2.2 Neutralização de endotoxinas

No presente estudo, nenhum extrato promoveu neutralização significativa de endotoxinas, sendo que todos os espécimes apresentaram valores superiores a 500 EU/mL na 1ª coleta após instrumentação. Estes resultados concordaram com o estudo de Molina (2008), que verificou que nenhum agente irrigante dos canais radiculares (própolis, clorexidina, sálvia) conseguiu promover baixos valores de endotoxinas durante a instrumentação. Segundo Molina (2008), durante o preparo biomecânico, o processo de instrumentar, irrigar e aspirar remove parte das endotoxinas presentes na luz do canal, concordando com Vianna et al. (2007), que verificaram que a ação do preparo químico-mecânico foi o responsável pela redução, em média, de 44,4% de endotoxinas. Entretanto, endotoxinas presentes no interior dos túbulos

dentinários podem retornar à luz do canal e ser detectada na coleta após sete dias. Assim, embora os grupos da clorexidina, própolis e romã tenham promovido eliminação total de *E. coli* dos canais radiculares, os valores médios de endotoxinas foram relativamente altos. Os resultados desta pesquisa concordaram com os estudos de Vianna et al. (2007), Martinho e Gomes (2008) e Gomes et al. (2009), que verificaram que o preparo químico-mecânico com clorexidina e hipoclorito de sódio promoveu ação efetiva sobre microrganismos em canais radiculares, entretanto, endotoxinas foram detectadas em todas as amostras após instrumentação. Em 2007, Oliveira et al. verificaram que as soluções de hipoclorito de sódio (2,5% e 5,25%) e clorexidina 2% não apresentaram capacidade de neutralizar endotoxinas em canais radiculares.

As bactérias Gram-negativas liberam grande quantidade de endotoxinas após morte celular e também durante a duplicação celular (Petsch & Anspach, 2000), assim, o grupo controle apresentou altos níveis de LPS, pois houve intenso crescimento de *E. coli* na 1ª coleta após instrumentação. Em todos os grupos avaliados, pode-se verificar que na segunda coleta após instrumentação a quantidade de endotoxina foi significativamente maior que na primeira coleta, especialmente nos grupos G1 (controle) e G5 (barbatimão), que apresentaram significativo crescimento de *E. coli*. Os grupos G2 (clorexidina), G3 (própolis) e G6 (romã), embora tenham promovido ausência de crescimento de *E. coli* na 2ª coleta, apresentaram níveis altos de endotoxinas, com valores médios acima de 4.500 EU/mL, concordando com o estudo de Molina (2008). Com isso, pode-se verificar que os extratos naturais utilizados na presente pesquisa como soluções irrigadoras dos canais radiculares não apresentaram potencial para neutralizar endotoxinas. Estes resultados concordaram com os estudos da literatura que avaliaram a ação de agentes irrigantes sobre LPS (Aibel; Stevens, 1999; Tanomaru et al., 2003; Silva et al., 2004; Oliveira et al., 2007; Vianna et al., 2007; Molina, 2008; Martinho; Gomes, 2008; Gomes et al., 2009).

Os efeitos diretos dos extratos naturais sobre endotoxinas não são relatados na literatura, sendo importante ampliar os estudos que avaliem a ação de diferentes extratos sobre endotoxinas liberadas após a morte de bactérias Gram-negativas. Por outro lado, estudos têm demonstrado que extratos naturais podem reduzir inflamação e outros prejuízos teciduais causados por LPS. Koksel et al. (2005) verificaram que um componente ativo de própolis (CAPE) foi eficiente em reduzir inflamação ao pulmão causados por LPS em ratos. Song et al. (2008) demonstraram que CAPE inibiu significativamente a regulação de TNF- α induzida por LPS, de uma maneira dose dependente, e, ainda, inibiu a produção de IL-8 em células epiteliais humanas estimuladas por LPS. Em 2009, Wang et al. também verificaram que CAPE inibiu significativamente a expressão proteica de IL-10 e IL-12 em células dendríticas humanas derivadas de monócitos, estimuladas por LPS. Jung et al. (2006) verificaram que o extrato metanólico de romã (*P. granatum*) inibiu a produção de TNF em células microgliais estimuladas por LPS. Com isso, torna-se importante continuar os estudos sobre extratos naturais na odontologia, a fim de buscar substâncias alternativas que possam contribuir para o sucesso do tratamento.

6.2.3 Produção de citocinas em cultura de macrófagos

Com relação aos resultados obtidos da produção de citocinas, pode-se verificar que o padrão de produção de IL-1 β e TNF- α na linhagem celular (macrófagos RAW 264.7) foi diferente. A produção de IL-1 β foi mais baixa em todos os casos em relação à produção de TNF- α , demonstrando menor sensibilidade da célula em produzir IL-1 β na presença de diferentes concentrações de endotoxinas (LPS). Estes resultados concordaram com o estudo de Hong et al. (2004), que

verificaram que os níveis de IL-1 β sintetizados por macrófagos de camundongos (linhagem J774) estimulados por LPS (concentração 1 EU/mL) foram insignificantes quando comparado com os altos níveis de TNF- α e IL-1 α produzidos. No atual estudo, todos os grupos apresentaram altos valores médios de endotoxinas, com valores superiores a 570 EU/mL, de modo que, mesmo com estes valores altos a produção de IL-1 β foi baixa em vários grupos, especialmente no G2 (clorexidina), G3 (própolis) e G6 (romã). Com isso, pode-se verificar que a produção de IL-1 β não é tão diretamente relacionada com a presença de endotoxinas, ou ainda, é necessária uma quantidade bastante alta de endotoxinas (acima de 39000 UI/mL), como observado na 2ª coleta dos grupos G1 (solução fisiológica) e G5 (barbatimão) para ocorrer uma produção expressiva de IL-1 β . Em estudos anteriores, pode-se verificar que quando a quantidade de endotoxinas é inferior a 100 EU/mL, a produção de IL-1 β é praticamente nula. Em 2007, Lee et al., avaliando a influência do eugenol sobre macrófagos humanos estimulados por LPS, também observaram menor produção de IL-1 β e PGE₂, em pg/mL, em relação a TNF- α . No entanto, embora a produção de IL-1 β tenha sido menor que de TNF- α , isso não implica em menor importância desta citocina no processo de reabsorção óssea periapical.

Com relação ao TNF- α , pode-se observar que todos os grupos avaliados induziram alta produção de TNF- α , acima de 2000 pg/mL, ponto máximo de referência da curva-padrão. Assim, pode-se verificar que a produção de TNF- α é mais sensível à presença de endotoxinas que IL-1 β , concordando com Hong et al. (2004), pois no atual estudo, após instrumentação dos canais radiculares, todos os grupos apresentaram valores médios de endotoxinas superiores a 590 EU/mL, de modo que as células foram estimuladas a produzir grandes quantidades de TNF- α , demonstrando importante efeito citotóxico do conteúdo coletado dos canais radiculares após instrumentação.

Contudo, os resultados do atual estudo referente à ação de extratos naturais (própolis, alcaçuz, barbatimão, romã e cavalinha), utilizados como agentes irrigantes dos canais radiculares, sobre microrganismos e endotoxinas são interessantes e contribuem para os avanços das pesquisas sobre substâncias naturais, pois dentro do mesmo gênero, diferentes espécies de plantas apresentam diferentes atividades, assim, como a própolis de diferentes regiões, clima e período (Molina, 2008). Com isso, diante da grande diversidade, os estudos envolvendo substâncias naturais representam importante campo de pesquisa que pode trazer benefícios à terapia odontológica, mais especificamente para endodontia, tanto como soluções irrigadoras como medicações de demora.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que:

- a) Todos os extratos avaliados (própolis, alcaçuz, barbatimão, romã e cavalinha) apresentaram efeito antimicrobiano sobre *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, quando utilizados como agentes irrigantes em canais radiculares, em comparação com o grupo controle (solução fisiológica);
- b) Com relação *E. faecalis*, os extratos de própolis, barbatimão, romã e cavalinha foram os mais efetivos, promovendo ausência de crescimento microbiano em muitos espécimes, no entanto, somente o extrato de própolis apresentou efeito residual;
- c) Com relação *S. aureus*, os extratos de própolis e barbatimão apresentaram maior efetividade, com ausência de crescimento microbiano em todos os espécimes, entretanto, somente o extrato de própolis apresentou efeito residual;
- d) Com relação *E. coli*, os extratos de própolis, romã e cavalinha apresentaram maior ação antimicrobiana, com ausência de crescimento em praticamente todos os espécimes, sendo que

somente o extrato de própolis apresentou efeito residual;

- e) O extrato glicólico de própolis foi o mais efetivo sobre os três microrganismos avaliados, apresentando eliminação total em todas as coletas. O extrato de alcaçuz apresentou a menor ação antimicrobiana em comparação com os demais extratos avaliados;
- f) Nenhum extrato promoveu neutralização significativa de endotoxinas nos canais radiculares, sendo que todos os grupos apresentaram altos valores médios, especialmente após a 2ª coleta da instrumentação;
- g) A produção de IL-1 β foi mais baixa em todos os casos em relação à produção de TNF- α , demonstrando menor sensibilidade da célula em produzir IL-1 β na presença de diferentes concentrações de endotoxinas (LPS);
- h) A produção de TNF- α foi alta em todas as amostras, demonstrando importante efeito citotóxico do conteúdo coletado dos canais radiculares após instrumentação.

REFERÊNCIAS*

Aibel K, Stevens R. Effect of chlorhexidine on IL-6 induction by LPS. [abstract OR1] J Endod. 1999;25(4):282.

Al-Zoreky NS. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. Int J Food Microbiol. 2009 Sep 15;134(3):244-8. Epub 2009 Jul 12.

Amoros M, Lurton E, Boustie J, Guirre L, Sauvager F, Cormier M. Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate. J Nat Prod. 1994;57:644-7.

Asl MN, Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds. Phytother Res. 2008;22:709-24.

Ates DA, Erdogrul OT. Antimicrobial activities of various medicinal and commercial plant extracts. Turk J Biol. 2003;27:157-62.

Audi EA, Peres TPG, Kimura E, Pereira WKV, Mello JCP, Nakamura C et al. Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens*. Phytoter Res. 1999;13:264-6.

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;35:52-8.

*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/bds/uniformrequirements.html>

Bankova V, Christov R, Kujumgiev A, Marcucci MC, Popov S. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. *Z Naturforsch C*. 1995;50(3-4):167-72.

Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res*. 2001;15:561-71.

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

Baumgartner JC, Khemaleelakul S, Xia T. Identification of spirochetes (Treponemes) in endodontic infections. *J Endod*. 2003;29(12):794-7.

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

Borris RP. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *J Ethnopharmacol*. 1996;51:29-38.

Bostanci N, Allaker R, Johansson U, Rangarajan M, Curtis MA, Hughes J, et al. Interleukin-1 α stimulation in monocytes by periodontal bacteria: antagonistic effects of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol*. 2007 Feb;22(1):52-60.

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

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

Cardoso RL, Maboni F, Machado G, Alves SH, Vargas AC. Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus* coagulase positive and *Malassezia pachydermatis* os canine otitis. Vet. Microbiol. 2009 May 19;142(3-4):432-4. Epub 2009 Oct 20.

Castaldo S, Capasso F. Propolis: na old remedy used in modern medicine. Fitoter. 2002;73(Suppl.1):S1-6.

Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microb Rev. 1999;12(4):564-82.

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

Choi JG, Kang OH, Lee YS, Chae HS, Oh YC, Brice OO et al. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of *Punica granatum* peel ethanol extract against *Salmonella*. Evid Based Complement Alternat Med. 2009 Aug 17. [Epub ahead of print]

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

Dahlén G, Hofstad T. Endotoxic activities of lipopolysaccharides of microorganisms isolated from an infected root canal in *Macaca cynomolgus*. Scand J Dent Res. 1977;85(4):272-8.

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

Dametto FR, Ferraz CC, Gomes BPA, 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;99(6):768-72.

Das AK, Mandal SC, Banerjee SK, Sinha S, Das J, Saha BP et al. Studies on antidiarrhoeal activity of *Punica granatum* seed extract in rats. J Ethnopharmacol. 1999;68:205-8.

Dos Santos JG Jr, Blanco MM, Do Monte FH, Russi M, Lanziotti VM, Leal LK, et al. Sedative and anticonvulsant effects of hydroalcoholic extract of *Equisetum arvense*. Fitoterapia. 2005;76(6):508-13.

Do Monte FHM, Santos Jr. JG, Russi M, Lanziotti VMNB, Leal LKAM, Cunha GMA. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of the hydroalcoholic extract of stems from *Equisetum arvense* L. in mice. Pharmacol Res. 2004;49:239-43.

Eder K, Vizler C, Kusz E, Karcagi I, Glavinas H, Balogh GE et al. The role of lipopolysaccharide moieties in macrophage response to *Escherichia coli*. Biochem and Biophys Res Commun. 2009 Nov 6;389(1):46-51. Epub 2009 Aug 20.

Fenner R, Betti AH, Mentz LA, Rates SMK. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. Rev Bras Cienc Farm. 2006;42(3):370-93.

Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Comparative study of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine gel, chlorhexidine solution and sodium hypochlorite as endodontic irrigants. Braz Dent J. 2007;18(4):294-8.

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 Endod. 2007;104:709-16.

Figdor D, Sundqvist G. A big role for the very small - understanding the endodontic microbial flora. Aust Dent J Suppl. 2007;52(1 Suppl.):S38-51.

Fukai T, Marumo A, Kaitou K, Kanda T, Terada S, Nomura T. Antimicrobial activity of licorice flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Fitoter. 2002;73:536-9.

Funch LS, Barroso GM. Revisão taxonômica do gênero *Periandra* Mart. Ex Benth. (Leguminosae, Papilionoideae, Phaseolae). Rev Brasil Bot. 1999;22(3):339-56.

Gao C, Guo H, Mi Z, Grusby MJ, Kuo PC. Osteopontin induces ubiquitin-dependent degradation of STAT1 in RAW 264.7 murine macrophages. J Immunol. 2007;178(3):1870-81.

Ghisalberti, EL. Propolis: a review. Bee World. 1979;60:59-84.

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

Gomes BPFA, Martinho FC, Vianna ME. Comparison of 2,5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. J Endod. 2009;35(10):1350-3.

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

Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Souza ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. Oral Microbiol Immunol. 2004;19:71-6.

Gomes BPFA, Souza ELR, Ferraz CCR, 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;36:267-75.

Gould D, Chamberlaine A. *Staphylococcus aureus*: a review of the literature. J Clin Nurs. 1995;4:5-12.

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

Grossman LI. Origin of microorganisms in traumatized, pulpless, sound teeth. J Dent Res. 1967;46(3):551-3.

Gupta VK, Fatima A, Faridi U, Negi AS, Shanker K, Kumar JK, et al. Antimicrobial potential of *Glycyrrhiza glabra* roots. J Ethnopharmacol. 2008;116:377-80.

Haidari M, Ali M, Ward Casscells S 3rd, Madjid M. Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir. Phytomedicine 2009;16(12):1127-36.

Hashimoto Y, Ishizone H, Suganuma M, Ogura M, Nakatsu K, Yoshioka H. Periandrin I, a sweet triterpene-glycoside from *Periandra dulcis*. Phytochem. 1983;22(1):259-64.

Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. J Nat Prod. 1996;59:205-15.

Havsteen B. Flavonoids, a class of natural products with high pharmacological potency. Biochem Pharmacol. 1983;32:1141-8.

Holetz FB, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Mello JC, Morgado-Díaz JA, Toledo CE, et al. Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpessoai*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005;100(4):397-401.

Hong CY, Lin SK, Kok SH, Cheng SJ, Lee MS, Wong TM, et al. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. J Oral Pathol Med. 2004;33:162-9.

Ikeda Y, Sugiura M, Fukaya C, Yokoyama K, Hashimoto Y, Kawanishi K, et al. Periandradulcins A, B and C: Phosphodiesterase Inhibitors from *Periandra dulcis* Mart. Chem Pharm Bull. 1991;39(3):566-71.

Ishida K, Rozenenthal S, Mello JCP, Nakamura CV. Activity of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on *Cryptococcus neoformans*: effects on growth, capsule size and pigmentation. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2009 Nov 5;8:29.

Islam S, Hassan F, Tumurkhuu G, Dagvadorj J, Koide N, Naiki Y, et al. Bacterial lipopolysaccharide induces osteoclast formation in RAW 264.7 macrophage cells. *Biochem Biophys Res Com*. 2007;360:346-51.

Jacinto RC, Gomes BPFA, Desai M, Rajendram D, Shah HN. Bacterial examination of endodontic infections by clonal analysis in concert with denaturing high-performance liquid chromatography. *Oral Microbiol Immunol*. 2007; 22:403-10.

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

Jafri MA, Aslam M, Javed K, Singh S. Effect of *Punica granatum* Linn. (flowers) on blood glucose level in normal and alloxan-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol*. 2000;70:309-14.

Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. *Microbiologia Médica*. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill; 2009.

Jeanson MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod*. 1994;20(6):276-8.

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

Jorge AOC. *Microbiologia bucal*. 3.ed. São Paulo:Santos; 2007.

Jung KH, Kim MJ, Ha E, Uhm YK, Kim HK, Chung JH, Yim SV. Suppressive effect of *Punica granatum* on the production of tumor necrosis factor (TNF) in BV2 microglial cells. Biol Pharm Bull. 2006;29(6):1258-61.

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

Kobayashi T, Hayashi A, Yoshikawa R, Okuda K, Hara K. The microbial flora from root canals and periodontal pockets of non-vital teeth associated with advanced periodontitis. Int Endod J. 1990;23:100-6.

Koksel O, Ozdulger A, Tamer L, Cinel L, Ercil M, Degirmenci U et al. Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipopolysaccharide-induced lung injury in rats. Pulm Pharmacol Ther. 2006;19(2):90-5.

Koo H, Gomes BPFA, Rosalen PL, Ambrosano GMB, Park YK, Cury JA. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. Arch Oral Biol. 2000;45: 141-8.

Koru O, Toksoy F, Acikel CH, Tunka YM, Baysallar M, Guclu AU, et al. *In vitro* antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. Anaerobe. 2007;13:140-5.

Lee DH, Lim BS, Lee YK, Kim NR, Yang HC. Inhibitory effects of root canal sealers on the expression of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-stimulated murine macrophage cells. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2007;83(1):91-6.

Lee JW, Ji YJ, Yu MH, Bo MH, Seo HJ, Lee SP, et al. Antimicrobial effect and resistant regulation of *Glycyrrhiza uralensis* on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Nat Prod Res. 2009;23(2):101-11.

Lee MK, Ide M, Coward PY, Wilson RF. Effect of ultrasonic debridement using a chlorhexidine irrigant on circulating levels of lipopolysaccharides and interleukin-6. J Clin Periodontol. 2008;35(5):415-9.

Liu J, Wang S, Zhang P, Said-Al-Naief N, Michalek SM, Feng X. Molecular mechanism of the bifunctional role of lipopolysaccharide in osteoclastogenesis. *J Biol Chem*. 2009;284(18):512-23.

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

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

Machado TB, Leal ICR, Amaral ACF, Santos KRN, Silva MG, Kuster RM. Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits. *J Braz Chem Soc*. 2002;13(5):606-10.

Maekawa LE. Avaliação in vitro da ação de substâncias químicas auxiliares e medicações intracanaís sobre *Escherichia coli* e sua endotoxina em canais radiculares [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP; 2007.

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;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;25(12):795-9.

McDermott W. The problem of staphylococcal infection. *Brit Med J*. 1956;2(4997):838-40.

Mello JP, Petereit F, Nahrstedt A. Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochem*. 1996;41(3):807-13.

Miller RL, Webster ME, Melmon KL. Interaction of leucocytes and endotoxin with the plasmin and kinin systems. *Eur J Pharmacol*. 1975;33(1):53-60

Milovanovic V, Radulovic N, Todorovic Z, Stankovic M, Stojanovic G. Antioxidant, antimicrobial and genotoxic screening of hydro-alcoholic extracts of five serbian *Equisetum* species. *Plant Foods Hum Nutr*. 2007;62:113-19.

Mitscher LA, Park HY, Clark D. Antimicrobial agents from higher plants. Isoflavonoids and related substances from *Glycyrrhiza glabra* L. var. *Typica*. *J Nat Prod*. 1980;43(2):259-69.

Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *Int Dent J*. 2008;58:329-41.

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

Monti M, Berti E, Carminati G, Cusini M. Occupational and cosmetic dermatitis from propolis. *Contact Dermatitis*. 1983;9:163.

Morrison DC, Ryans JL. Endotoxins and disease mechanisms. *Ann Ver Med*. 1987;38:417-32.

Morse DR. Endodontic microbiology in the 1970s. *Int Endod J* 1981;14(2):69-79.

Murray PE, Farber RM, Namerow KN, Kuttler S, Garcia-Godoy F. Evaluation of *Morinda citrifolia* as an endodontic irrigant. *J Endod*. 2008;34(1):66-70.

Motsei ML, Lindsey KL, van Staden J, Jäger AK. Screening of traditionally used South African plants for antifungal activity against *Candida albicans*. J Ethnopharmacol. 2003;86:235-41.

Nair PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. Crit Rev Oral Biol Med. 2004;15(6):348-81.

Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. Braz J Microbiol. 2000;31:247-56.

Negi OS, Jayaprakasha GK. Antioxidant and antibacterial activities of *Punica granatum* peel extracts. J Food Sci. 2003;68(4):1473-7.

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;104:135-42.

Oliveira LD, Leão MVP, Carvalho CAT, Camargo CHR, Valera MC, Jorge AOC et al. In vitro effects of calcium hydroxide and polymyxin B on endotoxins in root canal. J Dent. 2005;33:107-14.

Önçaag O, Gogulu D, Uzel A. Efficacy of various intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis* in primary teeth: an *in vivo* study. J Clin Pediatr Dent. 2006;30(3):233-7.

Pappen FG, Qian W, Aleksejunienr J, Leonardo RT, Leonardo MR, Haapsalo M. Inhibition of sodium hypochlorite antimicrobial activity in the presence os bovine serum albumin. J Endod. 2010;36(2):268-71.

Peculiene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapsalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root filled teeth with cronic apical periodontitis. Int Endod J. 2001;34:429-34

Pereira BMR, Silva BP, Pereira NA, Parente JP. Anti-inflammatory and immunologically active polysaccharides of *Periandra mediterranea*. Phytochem. 2000;54:409-13.

Pereira JV, Pereira MSV, Sampaio FC, Sampaio MCC, Alves PM, Araújo CRF, et al.. Efeito antibacteriano e antiaderente in vitro do extrato da *Punica granatum* L. sobre microrganismo do biofilme dental. Rev Bras Farmacognosia. 2006;16(1):88-93.

Pereira MSV, Rodrigues OG, Feijó FMC, Athayde ACR, Lima EQ, Sousa MRQ. Atividade antimicrobiana de extratos de plantas no semi-árido paraibano. ACSA. 2006;2(1):37-43.

Petsch D, Anspach FB. Endotoxin removal from protein solutions. J Biotechnol. 2000 Jan 21;76(2-3):97-119.Review.

Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Souza ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. Int Endod J. 2003;36:1-11.

Prashanth D, Asha MK, Amit A. Antibacterial activity of *Punica granatum*. Fitoter. 2001;72:171-3.

Radulovic N, Stojanovic G, Pálic R. Composition and antimicrobial activity of *Equisetum arvense* L. essential oil. Phytoter Res. 2006;20:85-8.

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

Refai AK, Textor M, Brunette DM, Waterfield JD. Effect of titanium surface topography on macrophage activation and secretion of proinflammatory cytokines and chemokines. J Biomed Mater Res. 2004;70(2):194-205.

Rietschel ET, Cavaillon JM. Richard Pfeiffer and Alexandre Besredka: creators of the concept of endotoxin and anti-endotoxin. Microb Infect. 2003;5:1407-14.

Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. The FASEB J. 1994;8:217-25.

Rôças IN, Siqueira Jr JF, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. J Endod. 2004;30(5):315-9.

Safavi KE, Nichols FC. Effects of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. J Endod 1993;19(2):76-8.

Sakamoto M, Rôças IN, Siqueira JF Jr, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. Oral Microbiol Immunol. 2006;21:112-22.

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

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

Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Benno Y. Diversity of spirochetes in endodontic infections. J Clin Microbiol. 2009;47(5):1352-7.

Saleem M, Nazir M, Ali MS, Hussain H, Lee YS, Riaz N, et al. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. Nat Prod Rep. 2010;27:238-54.

Santos VR, Gomes RT, Oliveira RR, Cortés ME, Brandão MGL. Susceptibility of oral pathogenic microorganisms to aqueous and ethanolic extracts of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão). Int J Dent. 2009;8(1):1-5.

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

Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. J Endod. 2006;32(4):293-5.

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

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

Shoji M, Tanabe N, Mitsui N, Tanaka h, Suzuki N, Takeichi, et al. Lipopolysaccharide stimulates the production of prostaglandin E₂ and the receptor Ep4 in osteoblasts. *Life Sci.* 2006;78:2012-8.

Silva LA, 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):109-14.

Song JJ, Cho JG, Hwang SJ, ChoCG, Park SW, Chae SW. Inhibitory effect of caffeic acid phenetyl ester (CAPE) on LPS-induced inflammation of huma middle ear epithelial cells. *Acta Oto-Laryngologica.* 2008;128:1303-17.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Braz Dent J.* 2007;18(4):267-80.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Alves FRF, Silva MG. Bacteria in the apical root canal of teeth with primary apical periodontitis. 2009;107(5):721-6.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Paiva SSM, Guimarães-Pinto T, Magalhães KM, Lima KC. Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with periapical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;104(1):122-30.

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

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

Stuart CH, Schwartz AS, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.* 2006;32(2):93-8.

Sundqvist G. Ecology of root canal flora. *J Endod.* 1992;18(9):427-30.

Song JJ, Cho JG, Hwang SJ, Cho CG, Park SW, Chae SW. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on LPS-induced inflammation of human middle ear epithelial cells. *Acta Otolaryngol.* 2008;128(12):1303-7.

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

Suttisri R, Chung MS, Kinghorn AD, Sticher O, Hashimoto Y, Periandrin V, a further sweet triterpene glycoside from *Periandra dulcis*. *Phytochem.* 1993;34(2):405-8.

Takai-Sikikuni NB, Schilcher H. Electron microscopy and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Med.* 1994;60(3):222-7.

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;36:733-9.

Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Hotta J, Watanabe E, Ito IY. Antimicrobial activity of endodontic sealers based on calcium hydroxide and MTA. *Acta Odontol Latinoam.* 2008;21(2):147-51.

Tirali RE, Turan Y, Akal N, Karahan ZC. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of NaOCl and Octenisept in elimination of endodontic pathogens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;108(5):117-20.

Thomas CGA. Medical microbiology. London: Balliere Tindall; 1988.

Trouillas P, Calliste CA, Allais DP, Simon A, Marfak A, Delage C, et al. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside herbal teas. *Food Chem.* 2003;80:399-407.

Vahdaty A, Pitt Ford TR, Wilson RF. Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules in vitro. *Endod Dent Traumatol.* 1993;9(6):243-8.

Vasconcelos LCS, Sampaio MCC, Sampaio FC, Higino JS. Use of *Punica granatum* Linn as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. *Mycoses.* 2003;46:192-6.

Vasconcelos LCS, Sampaio FC, Sampaio MCC, Pereira MSV, Higino JS, Peixoto MHP. Minimum inhibitory concentration of adherence of *Punica granatum* Linn (pomegranate) gel against *S. mutans*, *S. mitis* and *C. albicans*. *Bas Dent J.* 2006;17(3):223-7.

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

Vianna ME, Horz H-P, Conrads G, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BPFA. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogenes. *Oral Microbiol Immunol.* 2007;22:411-8.

Waltimo TMT, Sirén EK, Torkko HLK, Olsen L, Haapsalo MPP. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *Int endod J.* 1997;30:96-101.

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

Wang LC, Lin YL, Liang YC, Yang YH, Lee JH, Yu HH, et al. The effect of caffeic acid phenethyl ester on the functions of human monocyte-derived dendritic cells. *BMC Immunol*. 2009 Jul 16;10:39.

Wittscher N, Faller G, Hensel A. Aquous extracts and polysaccharides from Liquorice roots (*Glycyrrhiza glabra* L.) inhibit adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa. *J Ethnopharmacol*. 2009;125:218-23.

Woodford N, Livermore DM. Infection caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. 2009;59(S1):S4-16.

Xu Z, Huang CX, Li Y, Wang PZ, Ren GL, Chen CS. Toll-like receptor 4 siRNA attenuates LPS-induced secretion of inflammatory cytokines and chemokines by macrophages. *J Infect*. 2007 Jul;55(1):e1-9. Epub 2007 Mar 2.

Youn JH, Oh YJ, Kim ES, Choi JE, Shin JS. High mobility group Box 1 protein binding to lipopolysaccharide facilitates transfer of lipopolysaccharide to CD14 and enhances lipopolysaccharide-mediated TNF- α production in human monocytes. *J Immunol*. 2008;180(7):5067-74.

APÊNDICE A - Tabelas dos valores médios de UFC/mL (log 10) de *E. faecalis*, *S. aureus* e *E. coli* obtidos por cada espécime de todos os grupos em todas as coletas.

Tabela 17 - Valores médios de UFC/mL (log 10) de *E. faecalis*, *S. aureus* e *E. coli* obtidos por cada espécime do G1 (solução fisiológica) em todas as coletas.

	Confirmação	1ª Coleta	2ª Coleta
<i>Enterococcus faecalis</i>			
1	6,13	3,54	4,8
2	6,29	4,54	5,73
3	7,15	3,85	5,65
4	6,8	4,71	5,59
5	6,66	4,77	5,63
6	7,17	4,19	5,71
7	7,23	4,12	5,74
8	7,04	5,08	5,68
9	6,98	4,14	5,67
10	7,07	3,46	5,73
11	6,92	4,01	5,73
12	6,71	3,62	5,65
<i>Staphylococcus aureus</i>			
1	7,7	5,02	5,39
2	7,39	5,05	5,51
3	7,65	4,68	5,29
4	7,78	4,8	5,68
5	7,13	4,79	5,3
6	7,82	5,17	5,35
7	8,09	5,85	5,41
8	7,96	5,77	4,94
9	7,81	4,91	5,22
10	8,33	4,28	5,67
11	7,58	5,26	5,47
12	8,22	4,36	5,59
<i>Escherichia coli</i>			
1	6,28	3,54	6,89
2	6,48	4,54	7,11
3	6,38	3,85	6,96
4	7,31	5,19	8,66
5	7	5,82	7,42
6	6,94	4,01	7,27
7	6,96	5,62	7,11
8	6,09	4,77	6,48
9	6,98	4,14	7,53
10	8,66	3,46	8,72
11	6,89	4,19	7,31
12	7,11	5,12	7,72

*1ª coleta: imediatamente após instrumentação; 2ª coleta: após 7 dias da instrumentação.

Tabela 18 - Valores médios de UFC/mL (log 10) de *E. faecalis*, *S. aureus* e *E. coli* obtidos por cada espécime do G2 (clorexidina) em todas as coletas.

	Confirmação	1ª Coleta	2ª Coleta
<i>Enterococcus faecalis</i>			
1	6,27	0	0
2	7,06	0	2,5
3	6,27	0	0
4	6,86	0	0
5	4,88	0	0
6	3,72	0	0
7	6,88	0	0
8	5,32	0	0
9	7,19	0	0
10	5,13	0	0
11	4,62	0	1,69
12	6,61	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>			
1	7,13	0	0
2	7,18	0	0
3	7,03	0	0
4	7,21	0	0
5	6,9	0	0
6	5,8	0	0
7	7,54	0	0
8	7,24	0	0
9	7,45	0	0
10	6,8	0	0
11	7,01	0	0
12	7,58	0	0
<i>Escherichia coli</i>			
1	6,85	0	0
2	7,47	0	3,77
3	6,69	0	0
4	6,74	0	0
5	7,35	0	0
6	6,38	0	0
7	6,61	0	0
8	6,48	0	0
9	7,46	0	0
10	7,02	0	0
11	7,08	0	0
12	6,8	0	0

*1ª coleta: imediatamente após instrumentação; 2ª coleta: após 7 dias da instrumentação.

Tabela 19 - Valores médios de UFC/mL (log 10) de *E. faecalis*, *S. aureus* e *E. coli* obtidos por cada espécime do G3 (própolis) em todas as coletas.

	Confirmação	1ª Coleta	2ª Coleta
<i>Enterococcus faecalis</i>			
1	6,45	0	0
2	7,13	0	0
3	7,07	0	0
4	6,04	0	0
5	6,8	0	0
6	7,13	0	0
7	6,32	0	0
8	5,32	0	0
9	7,19	0	0
10	6,8	0	0
11	7,07	0	0
12	6,32	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>			
1	5,8	0	0
2	7,54	0	0
3	8,09	0	0
4	7,96	0	0
5	7,81	0	4,69
6	7,45	0	4,8
7	6,8	0	0
8	6,71	0	0
9	7,7	0	0
10	7,43	0	0
11	7,65	0	0
12	7,39	0	0
<i>Escherichia coli</i>			
1	6,09	0	0
2	6,98	0	0
3	6,38	0	0
4	7,47	0	0
5	6,48	0	0
6	6,61	0	0
7	6,8	0	0
8	7,08	0	0
9	2,22	0	0
10	7,02	0	0
11	6,28	0	0
12	6,8	0	0

*1ª coleta: imediatamente após instrumentação; 2ª coleta: após 7 dias da instrumentação.

Tabela 20 - Valores médios de UFC/mL (log 10) de *E. faecalis*, *S. aureus* e *E. coli* obtidos por cada espécime do G4 (alcaçuz) em todas as coletas.

	Confirmação	1ª Coleta	2ª Coleta
<i>Enterococcus faecalis</i>			
1	6,39	3,07	5,04
2	7,38	4,93	5,1
3	7,28	0	5,06
4	7,34	4,91	5,27
5	7,72	3,07	5,09
6	7,45	2,3	0
7	7,26	4,74	0
8	7,38	4,2	4,07
9	7,33	2,3	4,6
10	7,57	3,23	5,07
11	5,52	0	0
12	6,93	3,12	0
<i>Staphylococcus aureus</i>			
1	6,9	2	5,74
2	7,54	3,41	6,14
3	7,61	2,47	5,68
4	7,42	2,3	5,84
5	7,69	2	5,63
6	7,92	2	4,98
7	7,74	3,04	4,07
8	7,68	2	5,43
9	8,11	3	5,6
10	7,54	3,27	4,85
11	7,12	0	4,25
12	7,3	4,89	4,04
<i>Escherichia coli</i>			
1	7,35	0	2,6
2	7,58	0	0
3	7,73	3,44	0
4	7,94	3,38	5,1
5	7,44	3,3	5,53
6	6,69	0	3,14
7	5,71	0	0
8	7,52	0	0
9	7,47	0	0
10	6,77	0	0
11	5,58	0	0
12	5,14	3,38	0

*1ª coleta: imediatamente após instrumentação; 2ª coleta: após 7 dias da instrumentação.

Tabela 21 - Valores médios de UFC/mL (log 10) de *E. faecalis*, *S. aureus* e *E. coli* obtidos por cada espécime do G5 (barbatimão) em todas as coletas.

	Confirmação	1ª Coleta	2ª Coleta
<i>Enterococcus faecalis</i>			
1	6,34	0	3
2	7,09	0	0
3	6,8	0	3
4	7,13	0	0
5	6,32	0	0
6	6,14	0	0
7	7,18	0	0
8	6,4	0	4,6
9	7,2	0	4,77
10	7,14	0	0
11	6,57	0	5,27
12	6,76	0	5,06
<i>Staphylococcus aureus</i>			
1	6,98	0	0
2	7,43	0	0
3	7,32	0	4,34
4	7,3	0	0
5	7,3	0	0
6	7,38	0	0
7	7,38	0	0
8	7	0	3,84
9	7,2	0	4,9
10	7,24	0	5,07
11	6,74	0	3,3
12	7,24	0	3,3
<i>Escherichia coli</i>			
1	5,6	2,6	3
2	7,35	0	5,7
3	6,28	3,07	5,64
4	6,92	0	5,34
5	7,04	0	3,71
6	4,38	0	2
7	5,38	2,9	3,9
8	6,68	0	5,73
9	6,23	3,2	5,7
10	7,27	2,6	5,7
11	5,42	2,9	5,37
12	7,06	2,6	5

*1ª coleta: imediatamente após instrumentação; 2ª coleta: após 7 dias da instrumentação.

Tabela 22 - Valores médios de UFC/mL (log 10) de *E. faecalis*, *S. aureus* e *E. coli* obtidos por cada espécime do G6 (romã) em todas as coletas.

	Confirmação	1ª Coleta	2ª Coleta
<i>Enterococcus faecalis</i>			
1	6,71	0	4,4
2	6,8	0	4,43
3	7,1	0	4,29
4	6,21	2,3	4,27
5	6,45	0	3,07
6	7,07	0	4,23
7	6,04	0	4,29
8	6,94	0	0
9	7,46	0	4,41
10	6,7	0	0
11	6,55	0	0
12	7,04	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>			
1	7,51	2	5,01
2	7,55	0	3,94
3	7,72	0	3,98
4	7,17	0	4,86
5	7,59	0	0
6	7,67	0	0
7	7,62	3,39	4,4
8	7,78	0	4,6
9	7,77	2,6	4,85
10	7,19	2,3	4,95
11	6,71	0	5,01
12	7,82	0	0
<i>Escherichia coli</i>			
1	6,83	0	2
2	7,09	0	3,92
3	7,19	0	2
4	7,15	0	0
5	7,24	0	0
6	6,17	0	0
7	4,71	0	0
8	6,71	0	0
9	7,21	0	0
10	6,55	0	0
11	6,3	0	0
12	7,2	0	2,47

*1ª coleta: imediatamente após instrumentação; 2ª coleta: após 7 dias da instrumentação.

Tabela 23 - Valores médios de UFC/mL (log 10) de *E. faecalis*, *S. aureus* e *E. coli* obtidos por cada espécime do G7 (cavalinha) em todas as coletas.

	Confirmação	1ª Coleta	2ª Coleta
<i>Enterococcus faecalis</i>			
1	7,06	0	4,65
2	7,65	0	4,61
3	7,25	0	4,18
4	7,44	0	4,81
5	7,03	3,57	4,91
6	7,64	0	4,64
7	7,21	0	0
8	7,31	0	0
9	7,24	0	4,13
10	7,35	2	4,25
11	6,43	2,3	4,65
12	7,13	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>			
1	7,58	0	4,35
2	7,86	0	4,51
3	7,99	0	3,92
4	7,29	0	4,08
5	7,88	3,361	3,99
6	8,43	0	0
7	7,84	0	0
8	8,11	0	3,14
9	7,15	0	3,69
10	7,54	0	0
11	7,43	0	3,81
12	7,74	2	3,07
<i>Escherichia coli</i>			
1	6,15	0	2,6
2	5,44	0	3,97
3	7,53	0	3,34
4	7,72	3,38	3,94
5	6,79	0	3,7
6	5,76	0	0
7	5,44	0	0
8	5,18	0	0
9	7,56	0	3,68
10	7,56	0	0
11	7,94	0	0
12	7,29	0	0

*1ª coleta: imediatamente após instrumentação; 2ª coleta: após 7 dias da instrumentação.

APÊNDICE B - Tabelas dos valores médios obtidos da quantidade de endotoxinas de *E. coli* (EU/mL) em cada espécime de todos os grupos nas 2 coletas.

Tabela 24 - Valores médios obtidos da quantidade de endotoxinas de *E. coli* (EU/mL) em cada espécime de todos os grupos na 1ª coleta.

Endotoxinas							
1ª coleta							
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
1	758	1910	1100	942	878	147	540
2	3720	1040	2790	330	515	466	1890
3	2060	201	2390	148	139	763	2560
4	1510	1880	3550	716	131	262	1190
5	1380	687	1130	180	517	310	569
6	1690	204	4930	516	706	1550	856
7	3950	1210	8750	292	361	1770	1920
8	1660	541	2580	415	571	734	430
9	753	277	2370	734	887	1570	1250
10	2840	1360	4930	325	145	220	2220
11	3430	351	2490	747	282	802	180
12	2370	438	2420	1490	195	620	1190

G1 (controle): solução fisiológica; G2: clorexidina; G3: própolis; G4: alcaçuz; G5: barbatimão; G6: romã; G7: cavalinha.

Tabela 25 - Valores médios obtidos da quantidade de endotoxinas de *E. coli* (EU/mL) em cada espécime de todos os grupos na 2ª coleta.

Endotoxinas							
2ª coleta							
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
1	50000	2400	6200	3020	50000	692	7160
2	50000	9420	3900	5050	17400	7830	8470
3	50000	7580	7880	1650	50000	3680	11500
4	50000	2170	6020	3990	50000	2950	16200
5	50000	5410	3130	17800	50000	2760	8200
6	50000	1700	4080	2720	19200	3070	5260
7	50000	2120	8870	1780	23800	1270	11200
8	50000	9680	9230	89,8	50000	2330	1780
9	50000	3130	3200	1340	50000	2640	1940
10	50000	1250	3130	1590	50000	8870	1980
11	50000	8410	3600	729	10400	13200	2950
12	50000	1340	4170	1380	50000	8030	1320

G1 (controle): solução fisiológica; G2: clorexidina; G3: própolis; G4: alcaçuz; G5: barbatimão; G6: romã; G7: cavalinha.

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos.

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

 CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Seres Humanos

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **066/2008-PH/CEP**, sobre **“Efeitos in vitro de extratos naturais sobre Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Candida albicans, Escherichia coli e endotoxinas em canais radiculares”**, sob a responsabilidade de **EMANUELE GONÇALVES BRITO** está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 14 de outubro de 2008.



Profa. Adjunto JANETE DIAS ALMEIDA
Coordenadora

Brito, EG. *In vitro* effects of natural extracts on *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and endotoxins on root canal. [dissertation] 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 effects of natural extracts as irrigating solutions on *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. coli*, and endotoxins (LPS) in root canals. The post treatment citotoxic effect of root canal content was also evaluated by TNF- α and IL-1 β production by macrophages cell culture. A total of 84 single root canal teeth were contaminated with *E. faecalis*, *S. aureus* and *E. coli* for 28 days. The groups were assigned into 7 groups (n=12) according to the irrigant solution used: G1) physiologic solution (control); G2) chlorhexidine 2%; G3) propolis glycolic extract 12%; G4) liquorice glycolic extract 20%; G5) barbatiman glycolic extract 20%; G6) pomegranate glycolic extract 20%; G7) horsetail glycolic extract 20%. Samples were twice collected from root canals: immediately after instrumentation and 7 days after instrumentation. All samples were submitted to antimicrobial evaluation by CFU/mL counting on selective culture media. The endotoxin detoxification was evaluated by *Limulus* amebocyte lysate assay (LAL), and the citotoxic effects was evaluated by TNF- α and IL-1 β production by macrophages cell culture. The results were statistically analysed (ANOVA and Tukey, 5%). All the extracts promoted significant microbial reduction compared to the control group on samples collected immediately after instrumentation ($p<0,05$). *E. faecalis* results showed that propolis (G3), barbatiman (G5), pomegranate (G6) and horsetail (G7) extracts promoted no microbial growth in all samples, similar to chlorhexidine solution and different from other groups ($p<0,05$). *S. aureus* results showed that propolis (G3) and barbatiman (G5) promoted absence of microbial growth in all samples, similar to chlorhexidine solution and different from other groups ($p<0,05$). *E. coli* results showed that propolis (G3), pomegranate (G6) and horsetail (G7) promoted no microbial growth in almost all samples, similar to chlorhexidine solution and different from other groups ($p<0,05$). On samples collected 7 days after instrumentation only propolis extract and chlorhexidine solution presented residual effect on *E. faecalis*, *S. aureus* and *E. coli*. Any extract tested promoted significant endotoxin detoxification on root canals, as all groups presented high average values, especially 7 days after

instrumentation. The citotoxic effect results showed high TNF- α values in all samples ($p>0,05$), and lower IL-1 β production compared to TNF- α , that demonstrates lower macrophages sensitivity on IL-1 β production of different endotoxin (LPS) concentrations. In conclusions, natural extracts (propolis, liquorice, barbatiman, pomegranate and horsetail) showed important antimicrobial activity on E. faecalis, S. aureus and E. coli, when used as irrigant solutions in root canals, however, propolis extract was the most effective, demonstrating residual effect. Any extract promoted endotoxin detoxification and all the samples demonstrated citotoxicity.

Key words: Natural extracts. Root canal irrigating solutions. Microorganisms. Endotoxins. Citokines.