



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

ALANA PRISCILA SOUZA AGUIAR

**AÇÃO *IN VITRO* DO EXTRATO GLICÓLICO DE GENGIBRE
E MEDICAMENTOS SOBRE *Candida albicans*,
Enterococcus faecalis, *Escherichia coli* E SUA
ENDOTOXINA EM CANAIS RADICULARES**



2009

ALANA PRISCILA SOUZA AGUIAR

**AÇÃO *IN VITRO* DO EXTRATO GLICÓLICO DE GENGIBRE
E MEDICAMENTOS SOBRE *Candida albicans*,
Enterococcus faecalis, *Escherichia coli* E SUA
ENDOTOXINA EM CANAIS RADICULARES**

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

Orientadora Prof^ª. Adj. Marcia Carneiro Valera

São José dos Campos

2009

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.

Aguiar, Alana Priscila Souza.

Ação *in vitro* do extrato glicólico de gengibre e medicamentos
sobre *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*
e sua endotoxina em canais radiculares / Alana Priscila Souza
Aguiar. ____ São José dos Campos : [s.n.]; 2009.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) –
Faculdade de Odontologia de São Jose dos
Campos, Universidade Estadual Paulista, 2009.

Orientador: Prof. Dra Marcia Carneiro Valera.

1. *Enterococcus faecalis* 2. *Candida albicans* 3. *Escherichia coli* 4. Endotoxina 5. Gengibre

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, 03 de junho de 2009.

Assinatura :

E-mail: alanasalustiano@hotmail.com

BANCA EXAMINADORA

Professora Adjunta Marcia Carneiro Valera (Orientadora)
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Professor Claudio Antonio Talge Carvalho
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Professora Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes
Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Universidade Estadual de Campinas -FOP- UNICAMP

São José dos Campos, 3 de junho de 2009.

DEDICATÓRIA

À Deus que abençoou-me com a dádiva da vida, guiando meus passos em todos os momentos.

À Nossa Senhora que me cobriu com seu manto protetor nos momentos difíceis em que eu precisava de refúgio.

Aos meus pais, Maria do Socorro Souza da Silva e Edvaldo Salustiano da Silva, pelo amor incondicional, pelos sacrifícios e por sempre estarem ao meu lado iluminando meu caminho.

Ao meu esposo, José Aguiar, por todo amor, carinho, apoio e compreensão, sem o qual seria impossível realizar este sonho. És meu mundo, minha vida, meu tudo.

Ao meu irmão, Alan David Souza Salustiano da Silva, companheiro fiel e adorável que só trouxe alegrias ao conviver comigo em São José dos Campos durante meu Curso de Mestrado.

Aos meus tios e primos que confiaram em mim e incentivaram a seguir a carreira acadêmica.

Aos meus sogros, Maria Aparecida e José Antonio, por cuidarem de mim como uma filha.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. José Roberto Rodrigues.

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

*Aos **Docentes** do Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora e Biopatologia.*

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa e do Auxílio à Pesquisa que possibilitou a aquisição dos materiais necessários para a realização deste trabalho.

*À Professora **Marcia Carneiro Valera** por possibilitar o meu ingresso nesta equipe altamente qualificada, por demonstrar a importância da ética e competência profissional e por todos os ensinamentos aplicáveis à vida.*

*À Professora **Ana Paula Martins Gomes** pela amizade, estímulo e contribuição no crescimento de meu espírito.*

Ao Professor Claudio A. Talge Carvalho por ser meu espelho de professor.

Ao Professor Ivan Balducci por ajudar-me na análise estatística de maneira descontraída e por torná-la interessante.

Aos meus grandes amigos, Lorraine Pizzo da Cruz, Marcos Uyeda Aivazoglou e Aletéia Massula Fernandes, por compartilharem comigo as dificuldades e alegrias do dia-a-dia.

Ao amigo, Sérgio Alves por fazer parte desta etapa acadêmica.

Às funcionárias do Departamento de Odontologia Restauradora, Clélia Aparecida De P. Martins, Fernanda Maria De Brito Cunha, Josiana Maria Alves Carneiro e Rosângela da Silva de Melo e Dona Marinete por serem tão prestativas.

Às Funcionárias da Pós-graduação, Rose Meire da Costa Santos, Maria Aparecida Consiglio de Souza, Erena Michie Hasegawa, Lílian Faria de Oliveira Braga por serem gentis e pacientes.

Às pessoas que acreditaram em mim e contribuíram para realização deste sonho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	
2.1 Microbiota dos canais radiculares: <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Candida albicans</i> e bactérias Gram-negativas	13
2.2 Hipoclorito de sódio e Gengibre como irrigantes do canal radicular.....	16
2.3 Medicação intracanal: Hidróxido de cálcio e Clorexidina.....	21
2.4 Endotoxinas.....	23
3 PROPOSIÇÃO	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	
4.1 Preparo dos canais radiculares.....	26
4.2 Contaminação dos espécimes.....	29
4.3 Coleta de Confirmação	31
4.4 Grupos experimentais.....	31
4.5 Coleta do conteúdo do canal radicular.....	33
4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	34
4.7 Verificação da neutralização de endotoxinas no canal radicular.....	35
4.7.1 Lisado de amebócitos de <i>Limulus</i> (LAL) – teste cinético cromogênico (QCL)	35
5 RESULTADOS	
5.1 Análise microbiológica.....	38
5.2 Quantificação de endotoxinas.....	54

6	DISCUSSÃO	
6.1	Da metodologia.....	67
6.2	Dos resultados.....	69
7	CONCLUSÃO	74
8	REFERÊNCIAS	75
9	ABSTRACT	88

Aguiar APS. Ação *in vitro* do extrato glicólico de gengibre e medicamentos sobre *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e sua endotoxina em canais radiculares. [Dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”; 2009.

RESUMO

A proposta desta pesquisa foi avaliar se o preparo biomecânico (PBM) com extrato glicólico de gengibre 20% e hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl), seguido da medicação intracanal com clorexidina gel 2%, hidróxido de cálcio, hidróxido de cálcio associado à clorexidina gel 2% são efetivos sobre *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e sua endotoxina em canais radiculares. Foram utilizados 72 dentes humanos unirradiculados, divididos em 6 grupos experimentais (n= 12) de acordo com a solução irrigadora (gengibre 20% ou NaOCl 2,5%) utilizada no preparo biomecânico e medicação intracanal (hidróxido de cálcio + soro fisiológico; hidróxido de cálcio + clorexidina gel 2%; clorexidina gel 2%). Foram realizadas coletas do conteúdo do canal radicular para confirmação de contaminação (coleta de confirmação), imediatamente após a instrumentação (1ª coleta), após 7 dias do preparo biomecânico (2ª coleta), imediatamente após 14 dias da ação da medicação intracanal (3ª coleta) e 7 dias após remoção da medicação (4ª coleta). Para todas as coletas foram realizados os seguintes testes: a) avaliação da atividade antimicrobiana pela semeadura e contagem UFC/mL de cada microrganismo; b) análise do conteúdo de endotoxina verificada pelo teste lisado de amebócitos de *Limulus*. Todos os resultados foram submetidos à análise de variância ANOVA, com nível de significância de 5%, e pelo teste de Dunn. Verifica-se que o NaOCl foi capaz de eliminar os microrganismos após PBM; O gengibre reduziu significativamente o número de bactérias e eliminou *Candida albicans*. As duas soluções irrigadoras (NaOCl e gengibre) reduziram significativamente endotoxinas mas não foram capazes de eliminá-las. As medicações intracanaís foram eficazes na redução de microrganismos, os eliminando nos grupos de NaOCl. O hidróxido de cálcio associado ou não a clorexidina diminuiu significativamente endotoxinas, mas não as eliminou. Concluiu-se que o gengibre eliminou *Candida albicans* e diminuiu significativamente *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* e endotoxinas do canal radicular.

PALAVRAS-CHAVES: *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, Endotoxina, Gengibre.

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos são os principais agentes etiológicos das alterações pulpares e periapicais, sendo fundamental seu controle e eliminação, assim como, a neutralização de seus produtos durante o tratamento endodôntico (Dahlén et al., 1980; Menezes et al., 2004; Schimeister et al. 2007). Numerosos estudos analisaram a microbiota de canais infectados (Paquette et al., 2007; Sassone et al., 2008; Zerella et al., 2005) verificando que os fungos oscilam entre 7% e 21%, (Waltimo et al., 1997; Baumgartner et al., 2000) enquanto bactérias Gram-positivas são comumente isoladas após instrumentação e medicação intracanal (Siqueira et al., 2007).

A presença de fungos está relacionada com os casos de infecções secundárias e periodontites apicais crônicas e, embora em quantidade muito menor em relação às bactérias, participam da manutenção da lesão periapical (Egan et al., 2002; Nair et al., 2006). Dentre as espécies relatadas, *Candida albicans* é uma das mais comuns e resistentes às muitas substâncias químicas durante a terapia endodôntica. Normalmente, *Candida albicans* é encontrada associada a bactérias anaeróbias facultativas. Desta associação, 50% acontecem com *Enterococcus faecalis*, nas periodontites apicais crônicas (Peculien et al. 2001; Menezes et al. 2004).

Enterococcus faecalis tem sido isolado de canais radiculares nos casos de insucessos após tratamentos endodôntico. Consequentemente, soluções irrigadoras e medicações intracanaís são alvos de pesquisas com finalidade de eliminar este microrganismo durante a terapia endodôntica (Sién et al., 2004; Vivacqua- Gomes et al., 2005; Paquette et al., 2007). Sedgley et al., em 2005, verificaram que

Enterococcus faecalis sobreviveu por doze meses, após ser inoculado em canais radiculares sem a adição de nutrientes.

As bactérias Gram-negativas anaeróbicas, também presentes nas infecções do sistema de canais radiculares, apresentam em sua membrana externa da parede celular um fator de virulência, representado pelos lipopolissacarídeos (LPS), também conhecidos como endotoxina. Estes lipopolissacarídeos, liberados durante sua duplicação ou morte celular, são responsáveis por desenvolver um infiltrado inflamatório intenso com aumento do espaço do ligamento periodontal e reabsorções cementária e óssea (Haight-Ponce et al., 1999; Matsushita et al, 1999; Tanamoru et al., 2003).

O preparo biomecânico com o auxílio de soluções irrigadoras objetiva eliminar os microrganismos e inativar seus subprodutos. Entretanto, o complexo sistema de canais radiculares com suas ramificações, bem como os túbulos dentinários dificultam este procedimento sendo recomendada a utilização da medicação intracanal para complementação da ação anti-séptica (Vianna et al., 2006; Nair et al., 2006; Schimeister et al., 2007).

Soluções irrigadoras em diferentes concentrações com atividade antimicrobiana têm sido utilizadas, particularmente o hipoclorito de sódio (NaOCl) (Vianna et al., 2004; Ruff et al. 2006; Mercade et al., 2009). Este potente desinfetante, mais utilizado nas concentrações 0,5% a 5%, elimina microrganismos em períodos de tempo clinicamente relevantes. Contudo, o hipoclorito de sódio pode ser cáustico para os tecidos periapicais, se inadvertidamente for introduzido a eles, desencadeando uma reação inflamatória proporcional ao volume e a concentração destes produtos (Tanamoru et a., 2003; Radcliffe et al., 2004; Ercan et al., 2004).

Recentemente, a busca por fitoterápicos efetivos contra microrganismos tem chamado atenção nas diferentes áreas médicas. Os produtos de origem vegetal são utilizados na odontologia com a vantagem

de oferta natural e preço acessível para subsistência às unidades públicas. Dentre estes produtos, o gengibre tem sido alvo de estudos científicos na sua forma de extrato bruto, extrato etanólico e cetônico; a forma e a composição final destes extratos influenciam na eficiência terapêutica (Levy et al., 2006; Ojewole et al., 2006).

O gengibre já referido como medicinal no ano 200 d.C., citado também na medicina tradicional chinesa, é usado internamente contra náusea, indigestão, cólicas, contra gripes, tosses e para problemas circulatórios (Stasi et al., 2002; Chen et al. 2008). As propriedades do gengibre apontam para seu uso promissor na odontologia. Para isto, fazem-se necessários estudos que avaliem primeiramente suas ações antimicrobianas e antiinflamatórias que constituem propriedades fundamentais às soluções irrigadoras e medicações intracanaís na endodontia.

O hidróxido de cálcio é uma das medicações intracanaís mais difundida na endodontia. Dentre suas atividades, a ação antimicrobiana merece destaque. Propriedades físico-químicas desta substância estão correlacionadas à efetividade e controle de infecção no sistema de canais radiculares. Entretanto, o hidróxido de cálcio não é efetivo sobre todas as espécies bacterianas e algumas leveduras encontradas nas infecções de canais radiculares, entre elas *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, respectivamente (Waltimo et al., 1999; Sirén et al., 2004; Neelakantan et al., 2007).

A clorexidina é uma substância amplamente utilizada na Endodontia como substância química auxiliar e medicação intracanal devido às satisfatórias propriedades antimicrobiana, substantividade ⁴³ e biocompatibilidade. Porém, a clorexidina não dissolve matéria orgânica, não inativa os efeitos do LPS e, na concentração de 0,12% é ineficaz contra *Enterococcus faecalis* (Tanamoru et al., 2003; Okino et al., 2004; Sassone et al., 2008).

A importância da solução irrigadora e medicação intracanal na eliminação dos microrganismos, especialmente os mais

resistentes como *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, bem como bactérias gram-negativas e conseqüente inativação de sua endotoxina, mostram a necessidade de estudos que avaliem a ação de substâncias químicas sobre estes microrganismos.

Soluções irrigadoras alternativas que conjuguem concomitantemente a ação antimicrobiana às propriedades de biocompatibilidade e solvente de matéria orgânica estão sendo pesquisadas, com o destaque da fitoterapia.

Assim, evidencia a necessidade de realizar estudos que avaliem os efeitos de uma solução irrigadora fitoterápica associada às medicações intracanaais já preconizadas a fim de debelar os microrganismos que estão relacionados ao insucesso tratamento endodôntico, ampliando a eficácia da terapia endodôntica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microbiota dos canais radiculares: *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e bactérias Gram-negativas.

Os microrganismos desempenham papel único na Endodontia. Visto que são considerados, por toda comunidade científica, os principais agentes etiológicos das alterações pulpares e periapicais. Inúmeros estudos são realizados para avaliar a propagação, proliferação e perpetuação destes microrganismos no interior do sistema de canais radiculares e tecidos periapicais. O desenvolvimento de inúmeras técnicas, protocolos, materiais, instrumentos visam conhecê-los e eliminá-los durante o tratamento endodôntico.

Mais de 700 espécies habitam a cavidade oral e mais da metade não pode ser cultivado (Socransky et al., 2005). Entretanto, é menor o número de espécies que colonizam o sistema de canais radiculares; geralmente são encontradas 7-13 espécies diferentes de bactérias em cada canal radicular infectado. A microbiota das infecções endodônticas é polimicrobiana e dominada por bactérias anaeróbias (Gomes et al., 2006; Jacinto et al., 2007). Cerca de 100 espécies têm sido detectadas pós-instrumentação e/ou pós-medicação intracanal, e nestes casos prevalecem às bactérias Gram-positivas (Siqueira et al., 2008).

Gomes et al., em 2004, investigaram a microbiota de infecções primárias e secundárias de 60 canais radiculares utilizando técnicas anaeróbias estritas, diluição serial, galvanização, incubação e identificação. As bactérias Gram-negativas ocorreram em 32% do total de

60 canais radiculares, sendo 34% das infecções primárias e 25% das infecções secundárias. Enquanto, as bactérias Gram-positivas ocorreram em 67,4% do total dos isolados, sendo 66% da infecção primária e 75% da infecção secundária. O estudo ainda sugere uma conexão entre bactérias Gram-negativas anaeróbias, especialmente *Prevotella*, *Porphyromonas* SSP, com achados clínicos como: presença ou histórico de presença de dor, sensibilidade a percussão e inchaço.

As infecções secundárias dos canais radiculares ocorrem quando a terapia endodôntica realizada previamente não foi eficaz em debelar a infecção microbiana, podendo causar dor, inchaço e sensibilidade a percussão; necessitando novamente de intervenção endodôntica. Portanto, a maior causa do insucesso endodôntico é a infecção intra-radicular e, em alguns casos, infecção extra-radicular (Siqueria et al., 2001). A persistência de biofilme microbiano pode favorecer a reinfecção em alguns canais radiculares. *Bacillus subtilis* é uma bactéria Gram-positiva aeróbia em formato de endósporo, que está relacionada à formação de biofilme bacteriano, devido à ampla produção de exopolissacarídeos em torno das células e do biofilme, ajudando na resistência e sobrevivência dos microrganismos no hospedeiro ¹⁰³.

A colonização bacteriana é pré-requisito para o desenvolvimento e persistência da inflamação periradicular. Em estudo com cachorros, por 1 ano, Lin et al. (2006) demonstraram, que polpas desvitalizadas mas não infectadas não causam, mesmo após 1 ano, persistência inflamação periradicular, embora inicialmente induzam uma reação inflamatória através dos mediadores químicos e citocinas, esta é modulada pelo próprio organismo por meio dos macrófagos. O mesmo não ocorre com as polpas infectadas. Entretanto, Lin et al., em 2006, defendem a remoção da polpa desvitalizada e não infectada por esta ser facilmente colonizada e infectada por bactérias que possam ter acesso ao sistema de canais radiculares.

São vários fatores que determinam a seleção de microrganismos no interior do sistema de canais radiculares. Entre eles

estão nutrição, baixo potencial óxido redução, pH, temperatura, interações positivas e negativas entre os microrganismos, mecanismo de defesa do hospedeiro e presença de agentes antimicrobianos (Gomes et al. 1999; Siqueira et al., 2001; Khademi et al., 2006; Brändle et al. 2008; Mercade et al., 2009).

Enteroccus faecalis são bactérias Gram-positivas e anaeróbias facultativas comumente encontradas em periodontites apicais crônicas de dentes com lesões radiográficas; geralmente estão associadas às outras espécies como *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella oralis* (Johnson et al., 2006).

O ácido lipoproteico é o maior fator de virulência encontrado na parede celular das bactérias Gram-positivas, responsável por estimular macrófagos. Devido a este fator de virulência o *Enteroccus faecalis* induz alta produção de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e óxido nítrico, provocando uma resposta imunológica do hospedeiro (Baik et al., 2008).

Por várias razões, *Enteroccus faecalis* consegue sobreviver ao preparo biomecânico e à ação de algumas substâncias usadas como medicação intracanal. Este microrganismo é resistente por sobreviver em condições extremas, incluído elevada alcalinidade e concentração de salinidade (Brändle et al. 2008) e ausência de nutrientes (Sedley et al., 2005). Possui habilidade de invadir túbulos dentinários em profundidade e sua adesão ocorre mais em dentina menos mineralizada quando comparada com àquela que tem mais composto inorgânico, pois seus receptores se aderem ao colágeno. Entretanto, a colonização inicial nos túbulos dentinários depende de outros fatores, como condições ambientais (presença de colágeno tipo 1) que induzem os receptores de superfície celular da bactéria estando estes relacionados com expressão gênica (Love et al. 2001; Chivatxaranukul et al. 2008)^{50, 15}.

Vivaqua-Gomes et al.⁹⁹ (2005) verificaram, em 45 pré-molares, que não existiu diferença na contagem de UFC/mL de

Enterococcus faecalis após tratamento endodôntico realizado em sessões única ou múltipla, permanecendo viáveis no interior dos túbulos dentinários após 60 dias de selamento do canal radicular.

Outro microrganismo importante na infecção endodôntica é *Candida albicans*, fungo eucariótico que se adapta facilmente às variáveis condições ambientais. É normalmente encontrado em infecções primárias, mas pode também ser encontrado em canais radiculares obturados que fracassaram. É considerado dentinofílico devido à invasão e afinidade pela dentina (Waltimo et al., 1999; Baumgartner et al. 2000; Peculien et al. 2001).

Egan et al., em 2002, constataram que a presença de fungos na saliva humana é 32,7% enquanto a presença nos canais radiculares associado com periodontites apicais crônicas é 10%. Demonstrando uma correlação da presença de fungos no tratamento endodôntico e infiltração de saliva pela restauração.

A virulência e patogenicidade da *Candida albicans* estão ligadas a diversos fatores, sendo a formação de hifas, a estrutura da sua superfície celular que, durante o contacto com células do hospedeiro, se adapta, sendo determinante para uma eficaz adesão e penetração, alterações fenotípicas (transição espontânea entre a forma típica de levedura, branca e circular, e uma forma opaca, em forma de pequenos bastões) e produção de enzimas extracelulares hidrolíticas (Siqueira et al. 2004).

2.2 Hipoclorito de sódio e Gengibre como irrigantes do canal radicular

Dentre os vários irrigantes utilizados na terapêutica endodôntica o hipoclorito de sódio é a substância mais difundida mundialmente. Este fato se deve às suas satisfatórias propriedades químicas, físicas e biológicas (Zenhder et al., 2006).

O hipoclorito de sódio, na presença de microrganismos e de tecido orgânico, promove alterações biosintéticas no metabolismo celular e destruição dos fosfolipídios, através da sua ação oxidativa que inativa de maneira irreversível as enzimas bacterianas e, da saponificação que degrada os lipídios e ácidos graxos resultando na formação de sabão e glicerol, ocorrendo desta forma a dissolução orgânica (Estrela et al., 2002).

Estudos demonstram que o hipoclorito de sódio é efetivo sobre bactérias anaeróbias facultativas e estritas, aeróbias, Gram-positivas e Gram-negativas, além de fungos resistentes, como *Candida albicans* (Waltimo et al. 1999; Ercan et al. 2004; Ruff et al. 2006). Sendo capaz de reduzir 96%- 99,63% da microbiota do canal radicular após o preparo biomecânico, conjugado com o poder de remoção das células (Vianna et al., 2006).

Sena et al. (2006) avaliaram a atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio 2,5%, 5,25% e clorexidina 2% sobre *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* e *Fusobacterium nucleatum* em períodos variáveis de exposição (30 segundos–60 minutos) com e sem agitação mecânica. Verificaram que a agitação mecânica torna mais eficaz os agentes antimicrobianos necessitando de menor tempo para eliminar alguns microrganismos. Os microrganismos anaeróbios estritos foram eliminados em 30 segundos pela clorexidina 2%; diferentemente dos facultativos e aeróbios. O hipoclorito de sódio 5,25% eliminou todos os microrganismos em 30 segundos mesmo sem agitação mecânica. *Enterococcus faecalis* resistiu ao hipoclorito de sódio 2,5% por 60 min (sem agitação mecânica) e *Candida albicans* por 5 minutos (com agitação mecânica).

O tempo necessário para ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio é concentração-dependente (Vianna et al.2004). Para eliminar o *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* na concentração de 0,5%, é necessário uma exposição de 30 min, comparados a 10 min quando usado uma concentração de 1% e 5 min para 2,5% (Radcliffe et al., 2004).

Além de precisar de um tempo menor para eliminação de alguns microrganismos, a alta concentração do hipoclorito de sódio (5,25%) é capaz de desinfetar os túbulos dentinários independente da técnica de instrumentação utilizada (Berber et al.2006).

Enterococcus faecalis e *Candida albicans* se aderem ao colágeno exposto na dentina. O uso do NaOCl remove as fibras colágenas expostas e como consequência diminui significativamente a aderência e força de adesão à dentina por estes microrganismos (Kishen et al., 2008; Turk et al., 2008). O hipoclorito de sódio é considerado mais efetivo do que a clorexidina contra biofilme de *Enterococcus faecalis*, principalmente quando o pH é 6,5 (Dunavant et al., 2006; Mercade et al.2009). O pH também interfere na dissolução de tecido orgânico, quanto mais alcalino maior o poder de dissolução, tornando ainda mais efetivo se aliado a alta concentração e maior tempo de exposição direta com o tecido (Christensen et al. 2008) .

A combinação do hipoclorito de sódio com a clorexidina foi proposta com a finalidade de aumentar o poder antibacteriano, contudo a união das duas substâncias forma um precipitado de componentes tóxicos, que apesar de ter alguma ação antimicrobiana sobre *Enterococcus faecalis* é desfavorável, além de não aumentar a capacidade antimicrobiana (Vianna et al., 2009) .

Apesar de ser um excelente antimicrobiano e apresentar uma capacidade excepcional de dissolução orgânica a citotoxicidade é bem documentada. Muitas complicações ocorrem quando inadvertidamente o hipoclorito de sódio é injetado no interior dos tecidos periapicais. Este

acidente normalmente provoca uma violenta reação inflamatória, revelada visivelmente pelo inchaço local, hematoma e relatos de dor pelo paciente (Serper et al., 2004; Gernhardt et al., 2004).

Os fitoterápicos têm sido utilizados como soluções irrigantes, apresentando bons resultados em pesquisas pioneiras (Molina et al. 2008). Assim, um novo campo de pesquisa se abre na Endodontia diante de uma vasta microbiota.

O gengibre, cujo nome científico é *Zingiber officinale*, é uma erva anual que cresce em solos arenosos e secos, desenvolve-se em climas tropicais e subtropicais, tem sido largamente empregado na culinária como condimento, em bebidas e na medicina popular. Sua parte mais utilizada é o rizoma seco, onde se concentram seus componentes principais os quais são o óleo volátil e a oleoresina. A raiz é também caracterizada pelo seu sabor um pouco amargo. O gengibre é rico em óleos voláteis, gingerol e shogaol.

Gingerol é um produto da quebra do Shogaol produzido durante a secagem. Estes compostos isolados do gengibre possuem atividades antimicrobianas sobre bactérias e fungos: *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Burkholderia pseudomalle*, *Staphilococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Microsporum gypseum* e *Pseudallescheria boydii* (Ficker et al., 2003; Samy et al. 2005; Indu et al., 2006; Policegoudra et al., 2007).

Os diarilheptanóides, também são compostos encontrados no gengibre, responsáveis pela atividade antioxidante, antiinflamatória, anti-proliferativa, anti-toxicidade hepática e atividade anti-tumor (Amin et al., 2006; Chen et al. 2008).

O 10-gingerol e 12-gingerol inibem o crescimento de bactérias periodontais e endodônticas como: *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, com uma concentração inibitória mínima de 6-14 µg/mL e eliminam com uma concentração bactericida mínima de 4-20 µg/mL (Park et al. 2008).

O 6-gingerol é capaz de inibir a produção de prostaglandinas E2, interleucina- 1 α , cicloxigenase-2 e síntese de óxido nítrico estimulados pelos lipopolissacarídeos (LPS), influenciando na resposta imunológica específica mediata, podendo ser utilizado em doenças auto-imunes e inflamações crônicas (zhou et al., 2006; Lantz et al., 2006; Pan et al., 2008; Jung et al., 2009). O 10-gingerol é ainda capaz de diminuir a resistência do *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* às drogas: polimixina B, bacitracina, vancomicina através do aumento da permeabilidade da membrana celular, facilitando a entrada dos aminoglicosídeos (Nagoshi et al., 2006) .

O óleo de gengibre possui pronunciada atividade fungistática e fungicida sobre o biofilme de *Candida albicans* e de outras espécies de fungos que são resistentes à anfotericina B, podendo ser usado futuramente em estratégias terapêuticas (Fiker et al., 2003; Agarwal et al., 2008).

Caires et al., em 2008, avaliaram *in vitro* a atividade do extrato glicólico do gengibre 10% e do hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl) comercialmente obtidos sobre *Candida albicans*. A efetividade antifúngica deste extrato e do NaOCl foi avaliada em diferentes concentrações obtidas a partir de diluições seriais (50%, 25%, 12,5% e 6,25%) por meio da técnica de microdiluição em caldo de cultura em 24 amostras clínicas de *C. albicans* e 1 amostra-padrão ATCC 18804. A concentração de diluição fungicida mínima (DFM) foi obtida pela metodologia de semeadura em Agar Sabouraud. Os resultados mostraram que o extrato de gengibre apresentou atividade fungicida a partir da concentração de 12,5% (DFM) e apresentou atividade fungistática de 6,25% (DIM). O hipoclorito de sódio apresentou atividade fungicida desde a concentração de 6,25%. Conclui-se que o extrato de gengibre e o hipoclorito de sódio apresentam efeito fungicida sobre *C. albicans*. Entretanto, esta atividade do extrato de gengibre mostrou-se concentração-dependente.

A desinfecção do sistema de canais radiculares produzida pela ação do agente irrigante reduz a microbiota endodôntica

remanescente otimizando a eficácia da medicação intracanal e elevando as possibilidades de sucesso do tratamento endodôntico (Estrela et al. 2008).

2.3 Medicação intracanal: Hidróxido de cálcio e Clorexidina

Várias propriedades biológicas são atribuídas ao hidróxido de cálcio, comumente utilizado como medicação intracanal. Estas propriedades conferem a este medicamento inúmeras indicações clínicas, como em casos de reabsorções radiculares, fraturas radiculares, periodontites apicais crônicas, pulpites irreversíveis e apixificações (Schimeiter et al., 2007; Siqueira et al., 1999 e 2007; Soares et al., 2008).

O hidróxido de cálcio é um forte alcalino, cujo pH não é alterado quando acrescido ácidos fracos ou soluções alcalinas em suspensões aquosas como : clorexidina, hipoclorito de sódio, iodo ou iodeto de potássio (Haenni et al., 2003).

Em solução aquosa, o hidróxido de cálcio se dissocia formando íons de hidroxila e cálcio, alcançando aproximadamente um pH 11,5. Os íons hidroxila são radicais livres com alto poder de reatividade, incita a peroxidação dos lipídios, resultando na destruição dos fosfolipídios, componentes estruturais da membrana celular das bactérias. O alto pH do hidróxido de cálcio contribui para atividade antimicrobiana; sendo capaz de desnaturar proteínas importantes para o metabolismo bacteriano e, conseqüentemente, para diminuição da atividade biológica celular, podendo ser letal para determinados microrganismos (Zmener et al., 2007) . Do mesmo modo que a clorexidina, os íons hidroxila são ainda capazes de inativar o ácido lipoprotéico (LTA) presente nas bactérias

Gram-positivas diminuindo, desta forma, a resposta imunológica do hospedeiro ao entrar em contato com o LTA (Baik et al., 2008; Lee et al., 2009).

Alguns microrganismos sobrevivem ao preparo biomecânico e ficam alojados no interior dos túbulos dentinários. A difusão dos íons hidroxila pelos túbulos dentinários é facilitada pela remoção da *smear layer* com EDTA 17% e uma irrigação final com hipoclorito de sódio (Siqueira et al., 2007; Saif et al., 2008).

Os íons cálcio, também resultado da dissociação do hidróxido de cálcio, alteram os tecidos adjacentes ao local de ação elevando a concentração de íons cálcio extracelular. Esta elevação estimula a síntese de fibronectinas pelas células da polpa dental. O acúmulo de fibronectinas induz as células da polpa a se diferenciarem em células formadoras de tecidos mineralizados, estabelecendo assim, pontes de dentina (Mizuno et al. 2008).

Quando em contato com tecidos, hidróxido de cálcio induz a migração local de neutrófilos mediados por prostaglandinas, citocinas, fator de necrose tumoral alfa e leucotrienos independente da presença de macrófagos ou mastócitos (Costa et al., 2008).

Siqueira Júnior et al., em 2007, constataram que, utilizando um protocolo de preparo biomecânico auxiliado pelo hipoclorito de sódio 2,5% e medicação intracanal com hidróxido de cálcio por 7 dias, houve ausência de bactérias cultiváveis em 81% dos dentes com polpa necrosada e periodontite apical.

Entretanto, estudos demonstram que *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* são resistentes ao hidróxido de cálcio, limitando sua atividade antimicrobiana e estes microrganismos são sensíveis a clorexidina (Ferguson et al., 2002; Siqueira et al., 2003; Menezes et al., 2004; Ercan et al., 2006; Davvis et al., 2007; Kayaoglu et al., 2009)⁷. Deste

modo a associação do hidróxido cálcio com outras substâncias vem sendo preconizada, em especial com a clorexidina.

A associação de clorexidina com hidróxido de cálcio é mais efetiva contra *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* do que o uso somente do hidróxido de cálcio (Gomes et al., 2006; Sirén et al., 2004; Zerella et al., 2005). A associação das duas substâncias não afeta a radiopacidade, pH e o tempo de trabalho do hidróxido cálcio. Entretanto, aumenta a viscosidade o que melhora a introdução e escoamento no canal radicular (Basrani et al., 2004). Todavia, estudos in vitro afirmam que clorexidina gel 2% é mais efetiva contra *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* quando comparada com a associação da mesma com hidróxido de cálcio (Ercan et al., 2006; Ballal et al., 2007; Wang et al., 2007). O mesmo não é registrado quando se avalia a clorexidina 2% na forma líquida; aplicada de 7 a 15 dias como medicação intracanal, que não é capaz de aumentar o número de dentes com culturas negativas ou redução de unidades formadoras de colônias (Paquette et al., 2007).

A clorexidina é uma molécula catiônica que detém uma importante propriedade que a difere das demais, substantividade (Khademi et al., 2006) . A substantividade previne a colonização de microrganismos na superfície e pode perdurar até 12 semanas (Rosenthal et al., 2004) . Mas sua atividade antibacteriana pode ser reduzida ou inibida na presença de colágeno da dentina, microrganismos mortos e de exsudatos inflamatórios (Mohammadi et al., 2009).

Tão importante como eliminar os microrganismos do sistema de canal radicular é neutralizar os seus subprodutos. Assim diversos estudos são direcionados aos lipopolissacarídeos (LPS).

2.4 Endotoxinas

As bactérias Gram-negativas anaeróbias, comumente encontradas em dentes com polpa necrosada, liberam polissacarídeos (LPS), provocando exsudatos inflamatórios. A atividade endotóxica do LPS está condicionada à presença e número destas bactérias no canal radicular (Dahlén et al., 1980). LPS induz a síntese e liberação de mediadores de resposta imune humoral como: citocinas e interleucinas (IL), (IL)-6, (IL)-8, (IL)-1 β e está correlacionado às periodontites apicais múltiplas, constatadas radiograficamente, e à presença de bactérias de pigmento–negro (Matsushita et al., 1999).

A detecção e quantificação destas endotoxinas é frequentemente realizada através do teste Lisado de amebócitos de Limulus (LAL) (Haight- Ponce et al., 1999) . Em 2008, Martinho et al., através do teste Lisado de amebócitos de Limulus (LAL), estudaram clinicamente a quantificação de endotoxinas e de bactérias cultiváveis a partir de dentes com polpa necrosada e periodontites apicais antes e após o preparo biomecânico com hipoclorito de sódio 2,5% correlacionando a sintomatologia do paciente. Verificaram que o preparo biomecânico com hipoclorito de sódio 2,5% foi moderadamente efetivo sobre as bactérias, mas incapaz de remover ou inativar endotoxinas no canal radicular e, aliado a isto, correlacionara a sintomatologia clínica com a quantidade de endotoxina. O mesmo resultado também foi encontrado por Vianna et al. em 2007 e por Tanomaru et al. em 2003, que observaram maior neutralização da endotoxina quando utilizaram medicação intracanal por 7 dias.

O hipoclorito de sódio e clorexidina não são capazes de neutralizar endotoxinas, ao contrário do hidróxido de cálcio (sozinho ou em associação) e polimixina B (Buck et al., 2001; Silva et al., 2002;

Oliveira et al., 2007). Hidróxido de cálcio inibe a habilidade do LPS estimular a diferenciação das células em osteoclastos (Jiang et al., 2003) e inibe a produção de TNF- α estimulado pelo LPS (Barthel et al., 1997).

Outra forma de neutralizar a endotoxina é através de radiação de ionização. A dose de radiação determina a destruição de polissacarídeos e alteração do lipídio A, componente da molécula de endotoxina responsável pela toxidade (Haight- Ponce et al., 1999).

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar se o preparo biomecânico com extrato glicólico de gengibre 20% e hipoclorito de sódio 2,5%, seguido da medicação intracanal com clorexidina gel 2%, hidróxido de cálcio, hidróxido de cálcio associado à clorexidina gel 2% são efetivos sobre *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e sua endotoxina em canais radiculares.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto 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 pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos da Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho” sob o protocolo nº 03/2008-PH/CEP em 25 de março de 2008 (Anexo A).

4.1 Preparo dos espécimes

Foram utilizados 72 dentes humanos unirradiculados recém-extraídos de consultórios particulares que, após a exodontia, foram limpos e imersos em solução salina fisiológica até o momento do uso. A seleção dos dentes foi feita baseada nas dimensões e similaridade morfológica das raízes. As coroas foram seccionadas com disco de carborundum (Carbodont Gysi S.A., Buenos Aires, Argentina), padronizando o comprimento dos espécimes em $16 \pm 0,5$ mm.

Depois de seccionados, os espécimes foram submetidos à instrumentação inicial dos canais radiculares realizada em toda sua extensão, desde seu diâmetro anatômico até a lima tipo Kerr nº 30. Os canais foram irrigados, com 3 ml de solução salina fisiológica a cada troca de instrumento e após, foram preenchidos com ácido etilenodiaminotetracético 17% (EDTA- Iodontec, Porto Alegre, RS), o qual foi agitado com uma lima tipo Kerr nº 15 por 3 min. A irrigação final foi realizada com 10 ml de solução salina fisiológica. Em seguida, os canais radiculares foram secos com cones de papel nº 30, foi realizado vedamento da região apical dos dentes com resina composta fotopolimerizável Z-100 (3M, Dental Products, St Paul, USA) e as raízes impermeabilizadas externamente com duas camadas de adesivo epóxi ARALDITE (Brascola, São Paulo, SP, Brasil), exceto a região da abertura cervical (Molina, 2008).

Os espécimes foram distribuídos aleatoriamente em 6 placas de cultura celular de 24 poços (TPP, Switzerland), com 12 dentes em cada, os quais foram fixados com resina acrílica quimicamente ativada, aproximadamente 5 mm de altura (Figura1).

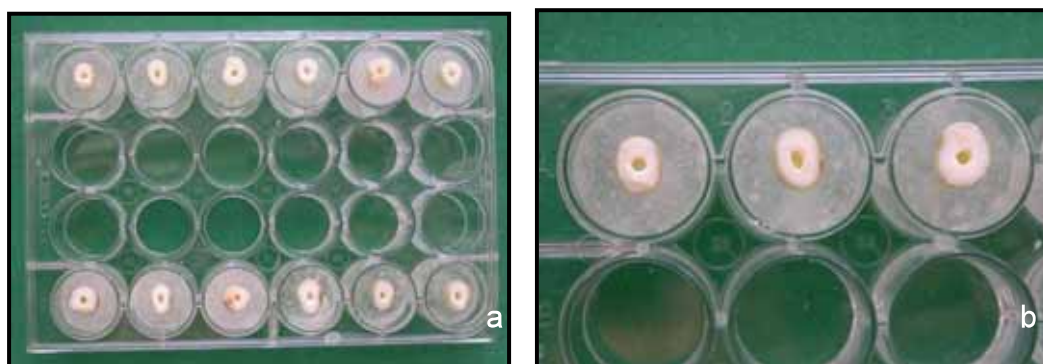


Figura 1 – Raízes incluídas com resina acrílica na placa de contagem de células:
a) distribuição dos 12 espécimes na placa; b) detalhe dos dentes incluídos.

As placas foram tampadas e embaladas. Estas placas e todos os materiais que foram utilizados até o final do experimento foram encaminhados à Empresa Brasileira de Radiação (EMBRARAD) para esterilização por radiação gama com cobalto 60 (20 KGy por 6 h) para neutralizar endotoxinas pré-existentes¹⁸.

4.2 Contaminação dos canais radiculares

Todo procedimento de contaminação intracanal dos espécimes foi realizado no interior da câmara de fluxo laminar. Foram realizadas suspensões padronizadas (1×10^6 células/ml) de culturas recentes de 24 h de incubação dos microrganismos: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433) e *Candida albicans* (ATCC 18804). As suspensões foram padronizadas em espectrofotômetro (Shinadzu modelo UV-1203, Kyoto- Japan), cujos valores de densidade óptica (D.O) e comprimento de onda (λ) para quantidade de 1×10^6 células/ml foram previamente estabelecidos no laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, campus de São José dos Campos.

Os canais radiculares foram primeiramente contaminados com 10 μ l de suspensão contendo *Escherichia coli* (1×10^6 células/ml) em solução fisiológica apirogênica (Aster Produtos Médicos LTDA, Sorocaba, SP) juntamente com 10 μ l de caldo infuso cérebro e coração (BHI- Detroit, USA). 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 10 μ l de suspensão contendo *Enterococcus faecalis* (1×10^6 céls./ml) e 10 μ l de suspensão contendo *Candida albicans* (1×10^6 céls./ml) mais 10 μ l de BHI.

Os canais foram mantidos selados com bolinha de algodão apirrogênica embebida em caldo BHI e permaneceram na estufa a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, em umidade relativa, por mais 21 dias, totalizando 28 dias de contaminação. Durante este período, foram adicionados 20 μl de meio de cultura (caldo BHI) no interior dos canais radiculares a cada 2 dias.

Após o período de 28 dias de contaminação, foi realizada a coleta do interior do canal de todos os espécimes para confirmação da contaminação dos canais; esta coleta serviu como controle (Molina, 2008).

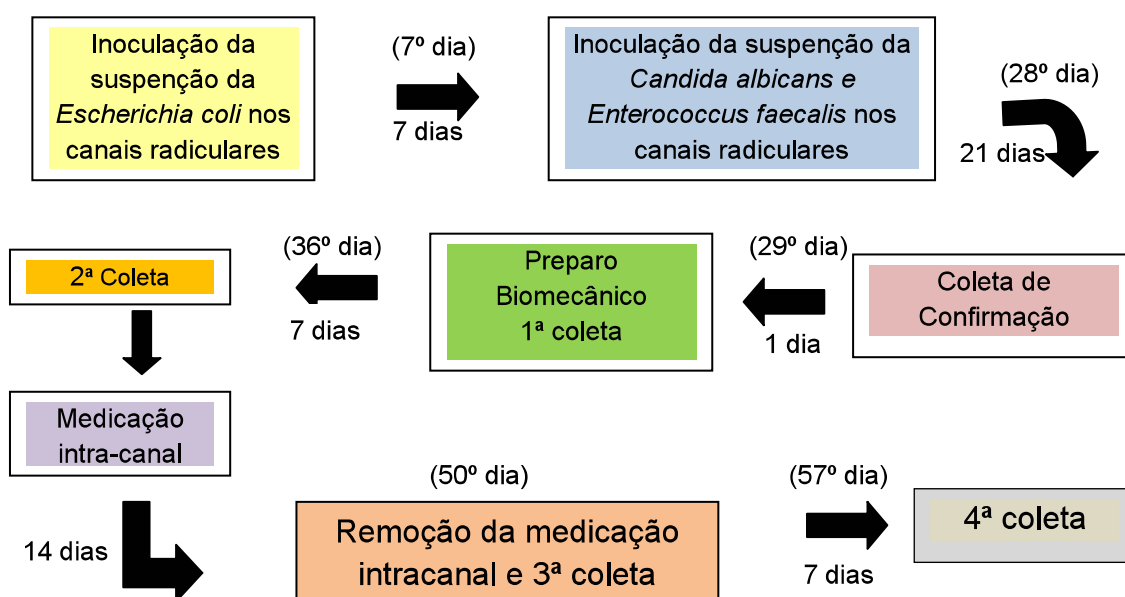


Figura 2- Esquema da sequência da sementeira e tratamento dos espécimes.

4.3 Coleta de Confirmação

Para a coleta, os canais radiculares foram preenchidos com solução salina fisiológica apirogênica e, com seringas de 1 ml foram coletados 100 µl do conteúdo do canal radicular. Este conteúdo foi depositado em *eppendorfs* contendo 900 µl de solução salina fisiológica estéril e apirogênica para posterior realização das análises microbiológica e quantificação de endotoxina.

4.4 Grupos experimentais

Após a coleta de confirmação da contaminação, os espécimes foram divididos em grupos de acordo com a solução irrigadora e medicação intracanal a ser utilizado (Quadro 1).

QUADRO 1: Divisão dos grupos de estudo

Solução Irrigadora	Medicação intracanal	Grupos
Hipoclorito de sódio 2,5% (Byofórmula Farmácia de Manipulação, São José dos Campos, SP)	Clorexidina gel 2%	Grupo 1
	Hidróxido de cálcio + Clorexidina gel 2%	Grupo 2
	Hidróxido de cálcio + Solução salina fisiológica	Grupo 3
Extrato glicólico de gengibre 20% (ApisFlora, Ribeirão Preto, SP)	Clorexidina gel 2%	Grupo 4
	Hidróxido de cálcio + Clorexidina gel 2%	Grupo 5
	Hidróxido de cálcio + Solução salina fisiológica	Grupo 6

Os canais radiculares foram instrumentados á 1mm aquém do ápice até a lima tipo Kerr nº 50 utilizando-se 3 ml de solução irrigadora a cada troca de instrumento. A irrigação e aspiração foi realizada utilizando agulhas 20 x 5,5 mm (Injex, Ourinhos, SP- Brasil) e seringas de 5 ml apirogênicas (Injex, Ourinhos, SP- Brasil) auxiliado por bomba a vácuo.

4.5 Coletas do conteúdo do canal radicular

Todas as coletas do conteúdo do canal radicular seguiram idêntica metodologia da coleta de confirmação da contaminação, ou seja, os canais radiculares foram preenchidos com solução salina fisiológica apirogênica e, com seringas de 1 ml foram coletados 100 µl do conteúdo do canal radicular. Este conteúdo coletado foi depositado em *ependorfs* contendo 900 µl de solução salina fisiológica estéril e apirogênica para posterior realização de diluições seriadas, subsequente a semeadura em função da análise microbiológica e quantificação de endotoxina através do teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus*.

Imediatamente após o preparo biomecânico (PBM) foi realizada a 1ª coleta. Em prosseguimento, os canais foram preenchidos com solução salina fisiológica estéril e apirogênica e vedados com bolinha de algodão apirogênica. As placas contendo os espécimes foram fechadas, seladas duplamente com fita adesiva e mantidas em estufa a temperatura de $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa 100% durante 7 dias.

Sete dias após o PBM, foi realizada a 2ª coleta. Imediatamente, após a 2ª coleta os canais foram preenchidos com EDTA 17% por 3 min, o qual foi agitado com lima tipo Kerr nº 35 e removido com a irrigação de 10 ml de solução fisiológica estéril e apirogênica. Em seguida, os canais foram preenchidos com as medicações intracanaís estudadas. A manipulação das medicações intracanaís foi realizada em placas de petri estéril e apirogênica e introduzidas ao canal radicular com auxílio de uma lima tipo Kerr nº 45. Assim, os Grupos 3 e 6 receberam hidróxido de cálcio (Iodontec, porto Alegre, RS) e solução salina fisiológica com a consistência de pasta densa; os Grupos 1 e 4 receberam clorexidina 2% (Byofórmula Farmácia de Manipulação, São José dos Campos, SP- Brasil) na forma gel; os Grupos 2 e 5 receberam a associação do hidróxido de cálcio (Iodontec, porto Alegre, RS) com a

clorexidina 2% (Byofórmula Farmácia de Manipulação, São José dos Campos, SP- Brasil) na proporção 1:1. Após o preenchimento dos canais radiculares com a medicação intracanal, as aberturas cervicais dos canais radiculares foram vedadas com bolinhas de algodão apirogênicas e as placas contendo os espécimes foram fechadas, seladas duplamente com fita adesiva e mantidas em estufa a temperatura de $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa 100% por 14 dias.

Quatorze dias após a permanência da medicação no interior do canal radicular, a medicação foi removida com uma lima Kerr nº 35 e 10 ml de solução salina fisiológica apirogênica e em seguida foi realizada a 3ª coleta do canal radicular de forma semelhante ao descrito anteriormente. Os canais foram mantidos com solução salina fisiológica apirogênica, e as aberturas cervicais foram seladas com bolinhas de algodão apirogênicas. Após 7 dias da remoção da medicação intracanal, foi realizada a 4ª coleta (Figura 2).

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

4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana

Foram realizadas diluições seriadas das amostras coletadas do canal radicular e a partir destas diluições, alíquotas de 100 µl foram semeadas em duplicata em placas de petri em três diferentes meios de cultura, seletivo para cada microrganismo: Agar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol para *Candida albicans*, Agar Enterococcosel para *Enterococcus faecalis* e Agar McConkey para *Escherichia coli*. As placas foram mantidas em estufa a 37°C por 48 h, para determinação de UFC/mL. Em todas as coletas, a atividade antimicrobiana dos tratamentos

foi avaliada pela contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) de *C. albicans*, *E. faecalis* e *E. coli* remanescentes no canal radicular. Os resultados foram submetidos à análise estatística pelo teste de Anova e de Sinais de Postos de Wilcoxon (amostras pareadas), com significância de 5%.

4.7 Verificação da neutralização de endotoxinas no canal radicular

Foi realizado o teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* para quantificação de endotoxinas. Este teste foi realizado em duplicata para todas as coletas do conteúdo do canal radicular: imediatamente após instrumentação, após 7 dias do preparo biomecânico, imediatamente após o período de ação da medicação intracanal e sete dias após sua remoção.

4.7.1 Lisado de amebócitos de *Limulus* (LAL) – teste cinético cromogênico (QCL)

O *Limulus* é constituído por um lisado dos amebócitos circulantes de caranguejos-ferradura que, quando exposto a quantidades pequenas de endotoxinas, aumenta sua opacidade bem como sua viscosidade, tornando-se um gel duro ⁴⁷. Levin e Bang ⁴⁷, em 1968, demonstraram que a formação do coágulo é resultado de uma reação enzimática entre a endotoxina e uma proteína coagulável na circulação do

amebócito *Limulus*. Assim, pelo método QCL cinético do LAL, a endotoxina da bactéria Gram-negativa catalisa a ativação de uma pré-enzima em enzima. A enzima ativada catalisa a clivagem do substrato sintético Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNa em peptídeo (Ac-Ile-Glu-Ala-Arg) e p-nitroanilina (pNa), de coloração amarela. A pNa transformada durante a reação é medida fotometricamente a 405 nm continuamente durante o período de incubação (37 °C). A concentração de endotoxina da amostra é calculada a partir de seu tempo de reação por comparação ao tempo de reação das soluções-padrão contendo quantidades conhecidas de endotoxina.

Nos dias do teste, as amostras coletadas do canal radicular foram submetidas à análise quantitativa de LPS pelo método cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (cinético QCL - LAL). Inicialmente foram realizadas diluições da endotoxina padrão de *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).

Em uma microplaca apirogênica de 96 poços (Costar Corning, New York, USA), foram adicionados 100 µl de água apirogênica (branco da reação), os padrões de endotoxina, as amostras coletadas do canal radicular e os controles positivos. Os testes foram realizados em duplicata. A placa foi incubada no leitor cinético QCL (Cambrex Bio Science, MD, USA) a 37±1°C por 10 min, o qual estava acoplado a um microcomputador com software Wink QCL específico para gerenciamento, execução e emissão de relatórios. Após, foram adicionados em cada poço da placa 100 µL do reagente cinético cromogênico do LAL, com uma multipipeta de 8 canais e ponteiros apirogênicos. Após o início do ensaio cinético, o software da leitora de microplacas foi monitorado, 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 0,2 unidades de absorbância, que foi

denominado tempo de reação. O software WinkQCL automaticamente calculou uma correlação linear log/log do tempo de reação de cada padrão com a concentração de endotoxina correspondente. Os parâmetros da curva-padrão foram impressos no relatório de impressão.

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

5 RESULTADOS

5.1 Análise microbiológica

O crescimento de *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e *Escherichia coli* foi verificado em todos canais radiculares após a coleta de confirmação. Os valores médios de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml) obtidos em cada espécime dos grupos experimentais, na coleta de confirmação, após preparo biomecânico (1ª coleta), após 7 dias do preparo biomecânico (2ª coleta), após 14 dias de medicação intracanal (3ª coleta) e após 7 dias de remoção da medicação intracanal (4ª coleta) de acordo com o microrganismos estão expostos nas Tabelas de 1 a 6.

Tabela 1 – Valores médios de UFC/ml de *E. coli* dos grupos que utilizaram hipoclorito de sódio como irrigante.

<i>E. coli</i>	Confirmação	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta
Grupo 1		Hipoclorito de sódio		Clorexidina	
1	150000	0	0	0	0
2	410000	0	0	0	0
3	191000	0	0	0	0
4	96000	0	0	0	0
5	61000	0	0	0	0
6	15400	0	0	0	0
7	61	0	0	0	0
8	630000	0	0	0	0
9	32100	0	0	0	0
10	220	0	0	0	0
11	134000	0	0	0	0
12	297	0	0	0	0
Grupo 2		Hipoclorito de sódio		Clorexidina + CaOH	
1	4920000	0	0	0	0
2	9200000	0	0	0	0
3	6080000	0	0	0	0
4	4410000	0	0	0	0
5	4370000	0	1	0	0
6	1350000	0	0	0	0
7	158000	0	0	0	0
8	155000	0	0	0	0
9	1120000	0	0	0	0
10	160000	0	0	0	0
11	94	0	0	0	0
12	191	0	0	0	0
Grupo 3		Hipoclorito de sódio		CaOH	
1	1620000	0	0	0	0
2	2220000	0	0	0	0
3	33000	0	0	0	0
4	870000	0	0	0	0
5	131000	0	0	0	0
6	118000	0	0	0	0
7	2310000	0	0	0	0
8	610000	0	0	0	0
9	1720000	0	0	0	670
10	7360000	0	0	0	0
11	72	0	0	0	0
12	1192	0	0	0	0

Tabela 2 – Valores médios de UFC/ml de *E. faecalis* dos grupos que utilizaram hipoclorito de sódio como irrigante.

<i>E. faecalis</i>	Confirmação	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta
Grupo 1	Hipoclorito de sódio			Clorexidina	
1	440000	0	0	0	0
2	141000	0	0	0	0
3	2440000	0	0	0	0
4	760000	0	0	0	0
5	370000	0	0	0	0
6	71000	0	0	0	0
7	580000	0	0	0	0
8	4870000	0	0	0	0
9	1400000	0	0	0	0
10	240000	0	0	0	0
11	650000	0	0	0	0
12	1070000	0	4	0	0
Grupo 2	Hipoclorito de sódio			Clorexidina + CaOH	
1	810000	0	0	0	0
2	680000	0	0	0	0
3	4500000	0	0	0	0
4	2270000	0	0	0	0
5	1460000	0	0	0	0
6	1330000	0	0	0	1
7	780000	0	0	0	0
8	460000	0	0	0	0
9	840000	0	0	0	0
10	2240000	0	154	0	8
11	760000	0	0	0	200
12	660000	0	0	0	0
Grupo 3	Hipoclorito de sódio			CaOH	
1	290000	0	0	0	0
2	460000	0	0	0	0
3	610000	0	0	0	0
4	770000	0	0	0	0
5	72000	0	0	0	337
6	260000	0	0	0	0
7	510000	0	0	0	0
8	430000	0	0	0	0
9	290000	0	0	0	225
10	570000	0	0	0	8
11	710000	0	0	0	0
12	729000	0	0	0	0

Tabela 3 – Valores médios de UFC/ml de *C. albicans* dos grupos que utilizaram hipoclorito de sódio como irrigante.

<i>C. albicans</i>	Confirmação	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta
Grupo 1	Hipoclorito de sódio			Clorexidina	
1	1900	0	0	0	0
2	370000	0	0	0	0
3	340000	0	0	0	0
4	33000	0	0	0	0
5	160000	0	0	0	0
6	36800	0	0	0	0
7	73	0	0	0	0
8	530000	0	0	0	0
9	240000	0	0	0	0
10	280000	0	0	0	0
11	250000	0	0	0	0
12	82000	0	0	0	0
Grupo 2	Hipoclorito de sódio			Clorexidina + CaOH	
1	167000	0	0	0	0
2	260000	0	0	0	0
3	580000	0	0	0	0
4	230000	0	0	0	0
5	270000	0	0	0	0
6	79000	0	0	0	0
7	111	0	0	0	0
8	65000	0	0	0	0
9	90000	0	0	0	0
10	181000	0	0	0	0
11	16100	0	0	0	0
12	181	0	0	0	0
Grupo 3	Hipoclorito de sódio			CaOH	
1	116000	0	0	0	0
2	44000	0	0	0	0
3	76000	0	0	0	0
4	45	0	0	0	0
5	5700	0	0	0	0
6	20100	0	0	0	0
7	169000	0	0	0	0
8	62000	0	0	0	0
9	6800	0	0	0	0
10	49000	0	0	0	0
11	9300	0	0	0	0
12	30000	0	1	0	0

Tabela 4 – Valores médios de UFC/ml de *E. coli* dos grupos que utilizaram extrato de gengibre como irrigante.

<i>E. coli</i>	Confirmação	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta
Grupo 4	Gengibre			Clorexidina	
1	592000	26	472	0	0
2	721000	0	462	0	0
3	3320000	0	503	0	0
4	2810000	31	426	0	0
5	3100000	62	316	0	0
6	7640000	93	287	0	0
7	3240000	0	225	0	0
8	3160000	0	676	0	63
9	4160000	0	499	0	69
10	520000	1	510	0	0
11	3440000	0	458	0	34
12	840000	0	406	0	0
Grupo 5	Gengibre			Clorexidina + CaOH	
1	3880000	0	196	0	0
2	150000	1	400	0	1
3	1570000	0	250	0	18
4	392000	0	480	0	200
5	940000	54	362	0	0
6	520000	0	462	0	2
7	1510000	0	0	0	0
8	1310000	0	450	0	167
9	2840000	0	432	0	2
10	1320000	0	346	0	1
11	1030000	0	98	0	0
12	244000	0	364	0	0
Grupo 6	Gengibre			CaOH	
1	2200000	370	525	0	0
2	1880000	0	230	0	276
3	152000	168	184	0	292
4	2640000	65	212	42	351
5	1690000	76	257	0	83
6	166000	0	311	0	2
7	1120000	0	0	0	0
8	9600000	0	0	0	117
9	304000	122	408	0	263
10	236000	0	53	0	298
11	168000	0	238	0	300
12	780000	0	4	0	1

Tabela 5 – Valores médios de UFC/ml de *E. faecalis* dos grupos que utilizaram extrato de gengibre como irrigante.

<i>E. faecalis</i>	Confirmação	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta
Grupo 4		Gengibre		Clorexidina	
1	1350000	19	4	0	0
2	2520000	0	60	0	0
3	2350000	0	120	0	0
4	1860000	2	139	0	20
5	4160000	0	454	0	0
6	980000	18	62	0	0
7	580000	0	412	0	0
8	1880000	12	434	21	64
9	1110000	15	272	0	0
10	2100000	4	348	0	0
11	168000	0	304	0	1
12	290000	0	300	0	0
Grupo 5		Gengibre		Clorexidina + CaOH	
1	1440000	6	324	0	20
2	540000	0	260	0	0
3	330000	0	413	0	0
4	720000	1	366	0	8
5	1140000	55	195	1	0
6	1080000	104	296	0	1
7	1290000	0	2	0	193
8	560000	0	255	0	6
9	430000	34	144	0	0
10	390000	0	144	0	39
11	980000	0	346	0	0
12	870000	0	274	0	2
Grupo 6		Gengibre		CaOH	
1	1560000	100	150	0	0
2	520000	8	290	0	48
3	1460000	0	270	1	0
4	1650000	58	330	0	47
5	1430000	40	202	10	276
6	830000	0	188	0	167
7	1200000	15	0	1	51
8	810000	0	19	0	127
9	760000	16	193	0	52
10	480000	0	308	0	316
11	830000	0	110	0	48
12	490000	0	5	0	3

Tabela 6 – Valores médios de UFC/ml de *C. albicans* dos grupos que utilizaram extrato de gengibre como irrigante.

<i>C. albicans</i>	Confirmação	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta
Grupo 4	Gengibre			Clorexidina	
1	680000	0	0	0	0
2	3790000	0	230	0	0
3	850000	0	0	0	0
4	470000	0	0	0	0
5	1510000	0	266	0	0
6	50000	0	2	0	0
7	110000	1	124	0	0
8	1050000	0	419	81	233
9	60000	0	4	0	0
10	1170000	0	50	0	0
11	1720000	0	70	0	0
12	1410000	0	31	0	0
Grupo 5	Gengibre			Clorexidina + CaOH	
1	510000	0	5	0	0
2	5000	0	0	0	0
3	16000	0	0	0	0
4	64000	0	0	0	0
5	16700	0	0	0	0
6	11200	0	23	0	0
7	210000	0	0	0	0
8	28000	0	0	0	0
9	38000	0	0	0	0
10	140000	0	257	0	0
11	11000	0	0	0	0
12	610000	0	0	0	0
Grupo 6	Gengibre			CaOH	
1	1530000	221	286	0	0
2	180000	0	1	3	176
3	500000	0	0	26	0
4	1690000	0	0	0	11
5	154000	0	0	0	78
6	1380000	0	0	0	1
7	225000	0	0	0	1
8	840000	2	0	0	0
9	1030000	2	73	0	4
10	240000	0	0	0	0
11	162000	0	0	0	0
12	370000	2	0	0	0

Analisando a Tabela 1, constata-se ausência de crescimento de UFC/mL de *E. coli* após o preparo biomecânico com hipoclorito de sódio 2,5% como agente irrigante; mesmo após 7 dias após preparo biomecânico, com exceção de 2 espécimes. A Tabela 4 mostra que o extrato de gengibre eliminou *E. coli* em 41,66% dos espécimes imediatamente ao preparo biomecânico e que houve recolonização do canal principal após 7 dias do preparo biomecânico.

Considerando a Tabela 2, observa-se ausência de crescimento de UFC/mL de *E. faecalis* após o preparo biomecânico com hipoclorito de sódio 2,5% como agente irrigante; permanecendo neste quadro por 7 dias após preparo biomecânico, com exceção de 4 espécimes. A Tabela 5 mostra que o extrato de gengibre eliminou *E. faecalis* em 43,75 % dos espécimes, recolonizando o canal principal após 7 dias do preparo biomecânico.

Observando a Tabela 3, verifica-se ausência de crescimento de UFC/mL de *C. albicans* após preparo biomecânico com hipoclorito de sódio 2,5% como agente irrigante; permanecendo neste quadro por 7 dias após preparo biomecânico, com exceção de 1 espécime. Entretanto, a Tabela 6 mostra que o extrato de gengibre eliminou *C. albicans* em 79,17% dos espécimes, sendo que 23 espécimes permaneceram sem crescimento mesmo 7 dias após preparo biomecânico.

As Figuras 3 a 8 ilustram o diagrama de pontos da redução percentual de UFC/MI de *E. coli* e *E. faecalis* após o uso de irrigantes e após a medicação intracanal.

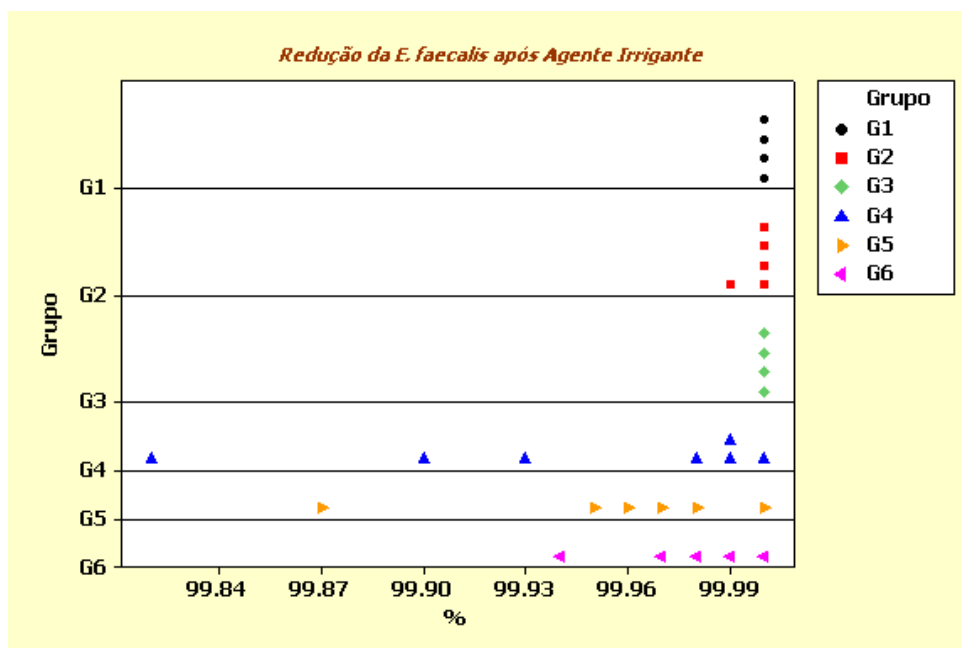


Figura 3- Diagrama de pontos (Dotplot) da redução (em porcentagem) de UFC/mL de *E. faecalis* obtidos após 7 dias do uso do agente irrigante nos grupos experimentais.

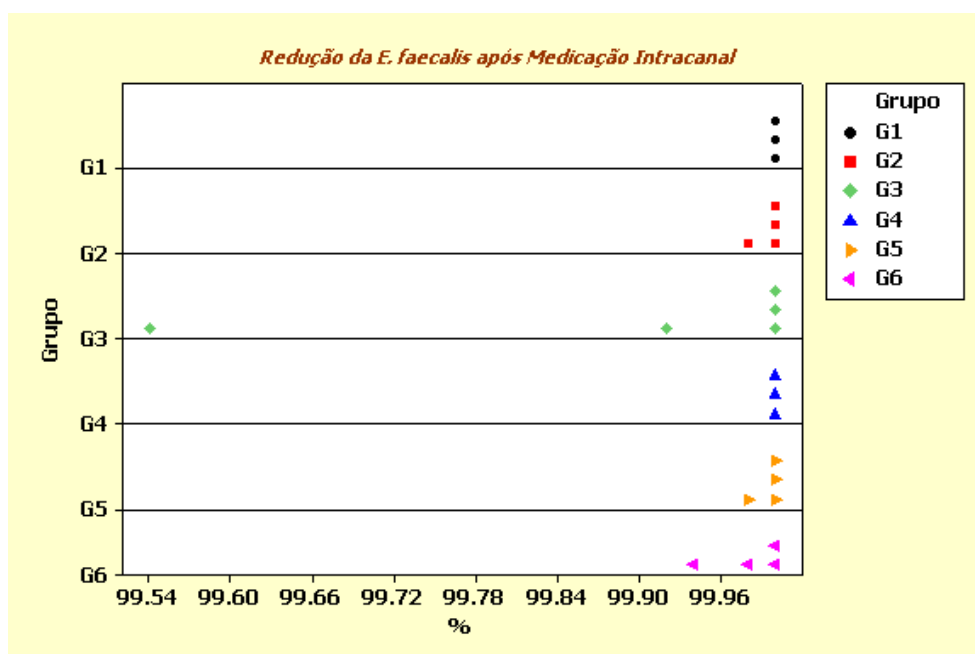


Figura 4- Diagrama de pontos (Dotplot) da redução (em porcentagem) de UFC/mL de *E. faecalis* obtidos após 7 dias do uso da medicação intracanal nos grupos experimentais.

Redução da E.coli após Medicação Intracanal

Grupo

● G1
■ G2
◆ G3
▲ G4
▶ G5
◀ G6

99.81 99.84 99.87 99.90 99.93 99.96 99.99 %

Figura 6- Diagrama de pontos (Dotplot) da redução (em porcentagem) de UFC/mL de *E. coli* obtidos após 7 dias do uso da medicação intracanal nos grupos experimentais.

Conferindo as Figuras 3 e 6, percebe-se a redução dos microrganismos após uso dos agentes irrigantes quando comparado com o número inicial obtido a partir da coleta de confirmação. As medicações intracanaís no período de 14 dias no interior dos canais radiculares foram capazes de eliminar ou reduzir UFC/mL de *E. coli* e *E. faecalis* que sobreviveram ao preparo biomecânico e que recolonizaram o canal principal após 7 dias (Figura 3 e 5). *Candida albicans* mostrou-se resistente ao hidróxido de cálcio apenas em dois espécimes, conseguindo recolonizar os canais radiculares de seis espécimes, em 7 dias. Os resultados da redução de UFC/mL após o uso de irrigantes e a redução de UFC/mL após medicação intracanal foram comparados e submetidos à análise estatística através do Teste de Sinais de Postos de Wilcoxon (amostras pareadas), com significância de 5%. Verificou-se que houve diferença estatística nos Grupos 4 e 5 na redução da *E. coli*. Em relação à redução de *E. faecalis* houve diferença estatística nos Grupos 3, 4 e 5 .

Tabela 7- Estatística descritiva de *Enterococcus faecalis* na coleta de confirmação.

Grupos	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de variação	Mínimo	Máximo
G1	1086000	1360888	125,31	71000	4870000
G2	1399167	1147578	82,02	460000	4500000
G3	475083	216286	45,53	72000	770000
G4	1612333	1122125	69,60	168000	4160000
G5	814167	373691	45,90	330000	1440000
G6	1001667	435365	43,46	480000	1650000

G1: Hipoclorito de sódio 2,5% + clorexidina gel 2%; **G2:** Hipoclorito de sódio 2,5% + hidróxido de cálcio/clorexidina gel 2%; **G3:** Hipoclorito de sódio 2,5% + hidróxido de cálcio; **G4:** Extrato de gengibre 20% + clorexidina gel 2%; **G5:** Extrato de gengibre 20% + hidróxido de cálcio/clorexidina gel 2%; **G6:** Extrato de gengibre 20% + hidróxido de cálcio;

Tabela 8 - Estatística descritiva de *Enterococcus faecalis* na primeira coleta.

Grupos	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de variação	Mínimo	Máximo
G1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G4	5,83	7,78	133,36	0,00	19
G5	16,67	32,61	195,69	0,00	104
G6	19,75	31,37	158,86	0,00	100

G1: Hipoclorito de sódio 2,5% + clorexidina gel 2%; **G2:** Hipoclorito de sódio 2,5% + hidróxido de cálcio/clorexidina gel 2%; **G3:** Hipoclorito de sódio 2,5% + hidróxido de cálcio; **G4:** Extrato de gengibre 20% + clorexidina gel 2%; **G5:** Extrato de gengibre 20% + hidróxido de cálcio/clorexidina gel 2%; **G6:** Extrato de gengibre 20% + hidróxido de cálcio;

Tabela 9 - Estatística descritiva de *Enterococcus faecalis* na segunda coleta.

Grupos	Média	Desvio-padrão	Coefficiente de variação	Mínimo	Máximo
G1	0,33	1,15	346,41	0,00	4
G2	12,80	44,50	346,10	0,00	154
G3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G4	242,40	158,9	65,54	4	454
G5	251,60	114,6	45,56	2	413
G6	172,10	118,2	68,71	0,00	330

G1: Hipoclorito de sódio 2,5% + clorexidina gel 2%; **G2:** Hipoclorito de sódio 2,5% + hidróxido de cálcio/clorexidina gel 2%; **G3:** Hipoclorito de sódio 2,5% + hidróxido de cálcio; **G4:** Extrato de gengibre 20% + clorexidina gel 2%; **G5:** Extrato de gengibre 20% + hidróxido de cálcio/clorexidina gel 2%; **G6:** Extrato de gengibre 20% + hidróxido de cálcio;

Tabela 10 - Estatística descritiva de *Enterococcus faecalis* na terceira coleta.

Grupos	Média	Desvio-padrão	Coefficiente de variação	Mínimo	Máximo
G1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G4	1,75	6,06	346,41	0,00	21
G5	0,08	0,28	346,41	0,00	1
G6	1	2,86	286,04	0,00	10

G1: Hipoclorito de sódio 2,5% + clorexidina gel 2%; **G2:** Hipoclorito de sódio 2,5% + hidróxido de cálcio/clorexidina gel 2%; **G3:** Hipoclorito de sódio 2,5% + hidróxido de cálcio; **G4:** Extrato de gengibre 20% + clorexidina gel 2%; **G5:** Extrato de gengibre 20% + hidróxido de cálcio/clorexidina gel 2%; **G6:** Extrato de gengibre 20% + hidróxido de cálcio;

Tabela 11 - Estatística descritiva de *Enterococcus faecalis* na quarta coleta.

Grupos	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de variação	Mínimo	Máximo
G1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G2	17,40	57,5	330,40	0,00	200
G3	47,50	111,7	235,10	0,00	337
G4	7,08	18,82	265,65	0,00	64
G5	22,40	55	245,24	0,00	193
G6	94,6	106,5	112,63	0,00	316

G1: Hipoclorito de sódio 2,5% + clorexidina gel 2%; **G2:** Hipoclorito de sódio 2,5% + hidróxido de cálcio/clorexidina gel 2%; **G3:** Hipoclorito de sódio 2,5% + hidróxido de cálcio; **G4:** Extrato de gengibre 20% + clorexidina gel 2%; **G5:** Extrato de gengibre 20% + hidróxido de cálcio/clorexidina gel 2%; **G6:** Extrato de gengibre 20% + hidróxido de cálcio;

Tabela 12 - Estatística descritiva de *Escherichia coli* na coleta de confirmação.

Grupos	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de variação	Mínimo	Máximo
G1	1433340	192964	55,70	61	630000
G2	2660274	3053829	88,15	94	9200000
G3	1416105	2069559	59,74	72	7360000
G4	2795250	2013720	58,13	520000	7640000
G5	1308833	1096174	31,64	150000	3880000
G6	1744667	2627193	75,84	152000	9600000

G1: Hipoclorito de sódio 2,5% + clorexidina gel 2%; **G2:** Hipoclorito de sódio 2,5% + hidróxido de cálcio/clorexidina gel 2%; **G3:** Hipoclorito de sódio 2,5% + hidróxido de cálcio; **G4:** Extrato de gengibre 20% + clorexidina gel 2%; **G5:** Extrato de gengibre 20% + hidróxido de cálcio/clorexidina gel 2%; **G6:** Extrato de gengibre 20% + hidróxido de cálcio;

Tabela 13- Estatística descritiva de *Escherichia coli* na primeira coleta.

Grupos	Média	Desvio-padrão	Coefficiente de variação	Mínimo	Máximo
G1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G4	17,75	30,67	8,85	0,00	93,00
G5	4,58	15,56	4,49	0,00	54,00
G6	66,8	111,40	32,2	0,00	370,00

G1: Hipoclorito de sódio 2,5% + clorexidina gel 2%; **G2:** Hipoclorito de sódio 2,5% + hidróxido de cálcio/clorexidina gel 2%; **G3:** Hipoclorito de sódio 2,5% + hidróxido de cálcio; **G4:** Extrato de gengibre 20% + clorexidina gel 2%; **G5:** Extrato de gengibre 20% + hidróxido de cálcio/clorexidina gel 2%; **G6:** Extrato de gengibre 20% + hidróxido de cálcio;

Tabela 14 - Estatística descritiva de *Escherichia coli* na segunda coleta.

Grupos	Média	Desvio-padrão	Coefficiente de variação	Mínimo	Máximo
G1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G2	0,08	0,28	0,08	0,00	1
G3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G4	436,7	119,1	34,4	225	676
G5	320	153,1	44,2	0,00	480
G6	201,8	167,1	48,2	0,00	525

G1: Hipoclorito de sódio 2,5% + clorexidina gel 2%; **G2:** Hipoclorito de sódio 2,5% + hidróxido de cálcio/clorexidina gel 2%; **G3:** Hipoclorito de sódio 2,5% + hidróxido de cálcio; **G4:** Extrato de gengibre 20% + clorexidina gel 2%; **G5:** Extrato de gengibre 20% + hidróxido de cálcio/clorexidina gel 2%; **G6:** Extrato de gengibre 20% + hidróxido de cálcio;

Tabela 15- Estatística descritiva de *Escherichia coli* na terceira coleta.

Grupos	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de variação	Mínimo	Máximo
G1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G6	3,50	12,12	3,50	0,00	42

G1: Hipoclorito de sódio 2,5% + clorexidina gel 2%; **G2:** Hipoclorito de sódio 2,5% + hidróxido de cálcio/clorexidina gel 2%; **G3:** Hipoclorito de sódio 2,5% + hidróxido de cálcio; **G4:** Extrato de gengibre 20% + clorexidina gel 2%; **G5:** Extrato de gengibre 20% + hidróxido de cálcio/clorexidina gel 2%; **G6:** Extrato de gengibre 20% + hidróxido de cálcio;

Tabela 16- Estatística descritiva de *Escherichia coli* na quarta coleta.

Grupos	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de variação	Mínimo	Máximo
G1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G3	55,80	193,40	55,80	0,00	670
G4	13,83	26,27	7,58	0,00	69
G5	32,60	71	20,5	0,00	200
G6	165,30	143,20	41,3	0,00	351

G1: Hipoclorito de sódio 2,5% + clorexidina gel 2%; **G2:** Hipoclorito de sódio 2,5% + hidróxido de cálcio/clorexidina gel 2%; **G3:** Hipoclorito de sódio 2,5% + hidróxido de cálcio; **G4:** Extrato de gengibre 20% + clorexidina gel 2%; **G5:** Extrato de gengibre 20% + hidróxido de cálcio/clorexidina gel 2%; **G6:** Extrato de gengibre 20% + hidróxido de cálcio;

5.2 Quantificação de endotoxinas

Os valores médios de endotoxinas de *E. coli* (EU/mL) obtidos em cada espécime dos grupos experimentais estão evidenciados nas Tabelas 17 e 18.

Analisando os resultados, pode-se averiguar que nos Grupos 2, 4, 5 e 6 houve aumento de endotoxina na 2ª coleta quando comparada à coleta imediatamente após o preparo biomecânico com sete dias após preparo biomecânico (Figuras 9 e 10; Figuras 13 a 18).

Seguidamente à remoção da medicação intracanal, pode-se verificar significativa redução de endotoxinas nos grupos avaliados (Figuras 7 a 18). E mesmo após 7 dias de remoção da medicação intracanal os valores de endotoxinas nestes grupos permaneceram baixos.

Tabela 17 – Valores médios de Endotoxinas de *E. coli* dos grupos que utilizaram hipoclorito de sódio como irrigante.

	Confirmação	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta
Grupo 1	Hipoclorito de sódio			Clorexidina	
1	6450	78,1	539	132	581
2	21100	96,6	184	55,7	922
3	34600	384	868	22,6	1740
4	9500	370	358	22	150
5	3020	113	139	23,5	44,4
6	5000	245	172	49,8	320
7	574	178	642	10,7	47,9
8	2790	1560	683	43,2	43,5
9	17900	242	770	5	10,1
10	23000	842	645	116	1110
11	10700	653	231	56,5	96,1
12	19600	7450	5230	1870	1690
Grupo 2	Hipoclorito de sódio			Clorexidina + CaOH	
1	42200	298	27,9	5	17,2
2	17300	103	75,7	5	12,4
3	29900	457	278	56,4	32,2
4	19100	995	400	124	191
5	14600	82,4	372	54,2	13,7
6	34300	601	5000	6,33	34
7	10100	425	306	16	5,73
8	3780	776	1220	7,14	11,5
9	6960	178	261	5	5,67
10	8380	1020	1270	14,2	10,1
11	1160	830	143	29,5	25,1
12	10800	74,4	7,36	5,93	5
Grupo 3	Hipoclorito de sódio			CaOH	
1	12200	253	1600	9,51	0
2	14500	274	45,3	9,84	0
3	2360	274	36,4	0	0
4	4310	264	235	0	0
5	8870	335	207	0	0
6	2160	1560	12,5	0	0
7	30200	530	984	0	0
8	28700	1790	75,6	0	0
9	9750	308	452	73,1	5120
10	41700	4160	504	13,5	5,86
11	8740	1570	73,3	0	0
12	5030	1570	33,3	14,5	0

Tabela 18 – Valores médios de Endotoxinas de *E. coli* dos grupos que utilizaram extrato de gengibre como irrigante.

	Confirmação	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta
Grupo 4	Gengibre			Clorexidina	
1	13700	2690	5442	1490	1160
2	36200	8450	15387	115	960
3	50000	1430	1366	297	4240
4	26500	835	12415	1120	5320
5	23600	1230	29650	78,5	1230
6	50000	9300	9999	710	264
7	19600	399	11305	161	122
8	19600	3010	2039	240	50000
9	40300	499	18550	10,3	2580
10	35600	1500	11565	1350	1580
11	21700	1430	37550	5	50000
12	50000	25100	20399	52,6	1090
Grupo 5	Gengibre			Clorexidina + CaOH	
1	50000	659	1130	896	588
2	6590	268	20300	466	128
3	4070	154	50000	425	714
4	14000	1250	19200	77,1	8090
5	1960	504	2130	224	2920
6	50000	3170	50000	1060	608
7	29500	16000	15300	88,4	604
8	70100	882	50000	207	2410
9	68700	114	980	145	543
10	28200	375	2080	153	4,60
11	12200	3480	4190	57,7	64,2
12	32000	14200	28200	267	1280
Grupo 6	Gengibre			CaOH	
1	3520	536	2150	64,5	9,10
2	6700	221	6700	34,6	1350
3	7640	160	50000	106	975
4	3830	1510	3060	75,6	50000
5	7740	1490	50000	153	15,3
6	2770	573	1970	1540	459
7	8740	1490	1160	32,7	4,13
8	6870	763	2340	98	3,88
9	4770	8800	50000	14,5	5
10	3980	2720	2470	13,3	5
11	3620	5510	50000	445	5
12	6320	9050	3590	279	4,59

Os dados foram submetidos ao teste estatístico de Kruskal-Wallis e teste de Dunn (5%). Na 1ª Coleta, imediatamente ao preparo biomecânico, verifica-se que os Grupos 5 e 6 (ambos extrato de gengibre) foram semelhantes entre si. Entretanto, o Grupo 2 (hipoclorito de sódio) difere estatisticamente do Grupo 4 (extrato de gengibre).

Na segunda coleta, após sete dias do preparo biomecânico, o Grupo 5 (extrato de gengibre) difere dos Grupos 1, 2 e 3 (ambos hipoclorito de sódio); sendo semelhante aos Grupos 5 e 6 (ambos extrato de gengibre).

Na terceira coleta, após 14 dias com medicação intracanal, os Grupos 2 (hipoclorito de sódio + hidróxido de cálcio associado clorexidina) e 3 (hipoclorito de sódio + hidróxido de cálcio) foram semelhantes. Mas os Grupos 2 e 3 foram estatisticamente diferente do Grupo 5 (extrato de gengibre + hidróxido de cálcio associado clorexidina).

Na quarta coleta, 7 dias após a remoção da medicação, os Grupos 2 (hipoclorito de sódio + hidróxido de cálcio associado clorexidina), 3 (hipoclorito de sódio + hidróxido de cálcio) e 6 (extrato de gengibre + hidróxido de cálcio) foram semelhantes, diferindo do Grupo 4 (extrato de gengibre + clorexidina).

As Tabelas 19 a 22 mostram a estatística descritiva e a representação dos grupos homogêneos após diferentes tratamentos.

Tabela 19 -Estatística descritiva de endotoxina (EU/mL) e representação dos grupos homogêneos na primeira coleta.

Grupos	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	Grupos homogêneos
G1	1017,6	2069,4	78,100	307,50	7450,0	B C
G2	486,65	353,38	74,400	441,00	1020,0	C
G3	1074,0	1160,1	253,00	432,50	4160,0	A B C
G4	4656,1	7090,4	399,00	1465,0	25100	A B
G5	3421,3	5580,9	114,00	770,50	16000	A B C
G6	2735,3	3237,8	160,00	1490,0	9050,0	A B C

G1: Hipoclorito de sódio 2,5% + clorexidina gel 2%; **G2:** Hipoclorito de sódio 2,5% + hidróxido de cálcio/clorexidina gel 2%; **G3:** Hipoclorito de sódio 2,5% + hidróxido de cálcio; **G4:** Extrato de gengibre 20% + clorexidina gel 2%; **G5:** Extrato de gengibre 20% + hidróxido de cálcio/clorexidina gel 2%; **G6:** Extrato de gengibre 20% + hidróxido de cálcio;

TABELA 20 -Estatística descritiva de endotoxina (EU/mL) e representação dos grupos homogêneos na segunda coleta.

Grupos	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	Grupos homogêneos
G1	871,75	1395,8	139,00	590,50	5230,0	B C
G2	780,08	1393,6	7,4000	292,00	5000,0	C
G3	354,87	485,16	12,500	141,30	1600,0	C
G4	14639	10727	1366,0	11990	37550	A
G5	20293	19994	980,00	17250	50000	A
G6	18620	23215	1160,0	3325,0	50000	A

G1: Hipoclorito de sódio 2,5% + clorexidina gel 2%; **G2:** Hipoclorito de sódio 2,5% + hidróxido de cálcio/clorexidina gel 2%; **G3:** Hipoclorito de sódio 2,5% + hidróxido de cálcio; **G4:** Extrato de gengibre 20% + clorexidina gel 2%; **G5:** Extrato de gengibre 20% + hidróxido de cálcio/clorexidina gel 2%; **G6:** Extrato de gengibre 20% + hidróxido de cálcio;

Tabela 21- Estatística descritiva de endotoxina (EU/mL) e representação dos grupos homogêneos na terceira coleta.

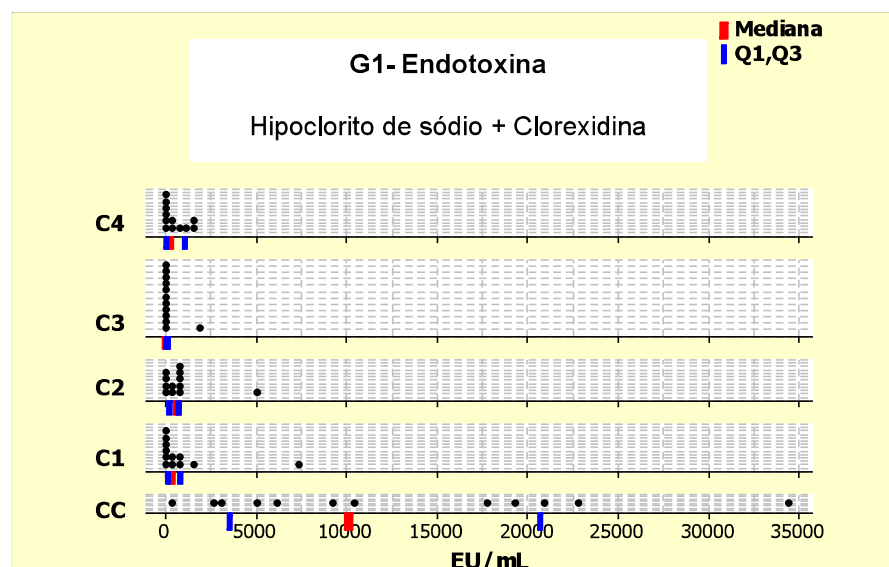
Grupos	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	Grupos homogêneos
G1	200,58	527,20	5,0000	46,500	1870,0	B C D
G2	27,383	35,706	5,0000	10,650	124,00	C D
G3	10,033	20,702	0,0000	0,0000	73,100	D
G4	469,12	552,21	5,0000	200,50	1490,0	B C
G5	338,85	326,44	57,700	215,50	1060,0	A B
G6	238,02	429,00	13,300	86,800	1540,0	B C D

G1: Hipoclorito de sódio 2,5% + clorexidina gel 2%; **G2:** Hipoclorito de sódio 2,5% + hidróxido de cálcio/clorexidina gel 2%; **G3:** Hipoclorito de sódio 2,5% + hidróxido de cálcio; **G4:** Extrato de gengibre 20% + clorexidina gel 2%; **G5:** Extrato de gengibre 20% + hidróxido de cálcio/clorexidina gel 2%; **G6:** Extrato de gengibre 20% + hidróxido de cálcio;

Tabela 22- Estatística descritiva de endotoxina (EU/mL) e representação dos grupos homogêneos na quarta coleta.

Grupos	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	Grupos homogêneos
G1	562,92	649,57	10,100	235,00	1740,0	B C D
G2	30,300	51,565	5,0000	13,050	191,00	C D
G3	427,16	1477,9	0,0000	0,0000	5120,0	D
G4	9878,8	18804	122,00	1405,0	50000	A B
G5	1496,2	2265,6	4,6000	606,00	8090,0	A B C
G6	4403,0	14366	3,9000	7,0500	50000	CD

G1: Hipoclorito de sódio 2,5% + clorexidina gel 2%; **G2:** Hipoclorito de sódio 2,5% + hidróxido de cálcio/clorexidina gel 2%; **G3:** Hipoclorito de sódio 2,5% + hidróxido de cálcio; **G4:** Extrato de gengibre 20% + clorexidina gel 2%; **G5:** Extrato de gengibre 20% + hidróxido de cálcio/clorexidina gel 2%; **G6:** Extrato de gengibre 20% + hidróxido de cálcio;



CC: Coleta de confirmação C1: 1ª Coleta C2: 2ª Coleta C3: 3ª Coleta 4C: 4ª Coleta
Figura 7- Diagrama de pontos (Dotplot) dos valores de endotoxina (EU/mL) de *E. coli* do Grupo 1, em cada coleta.

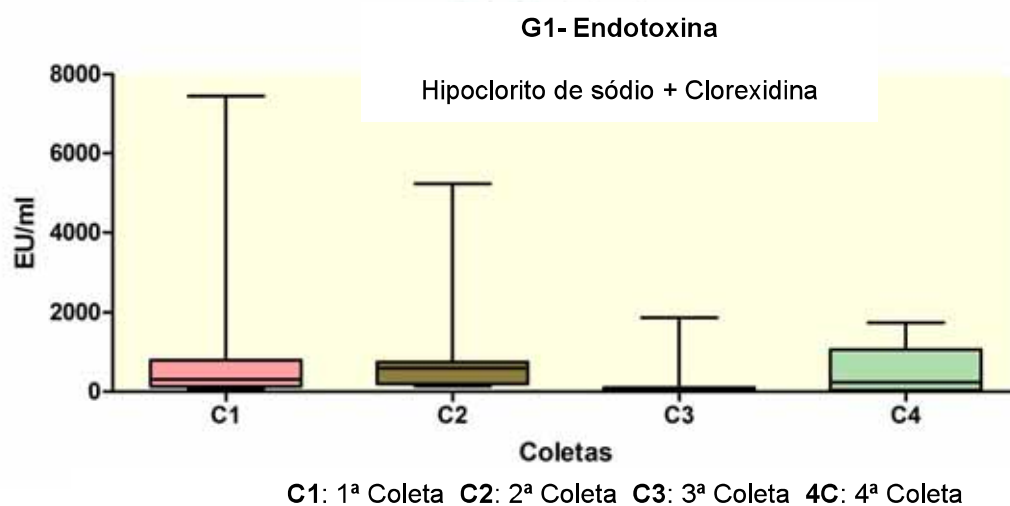
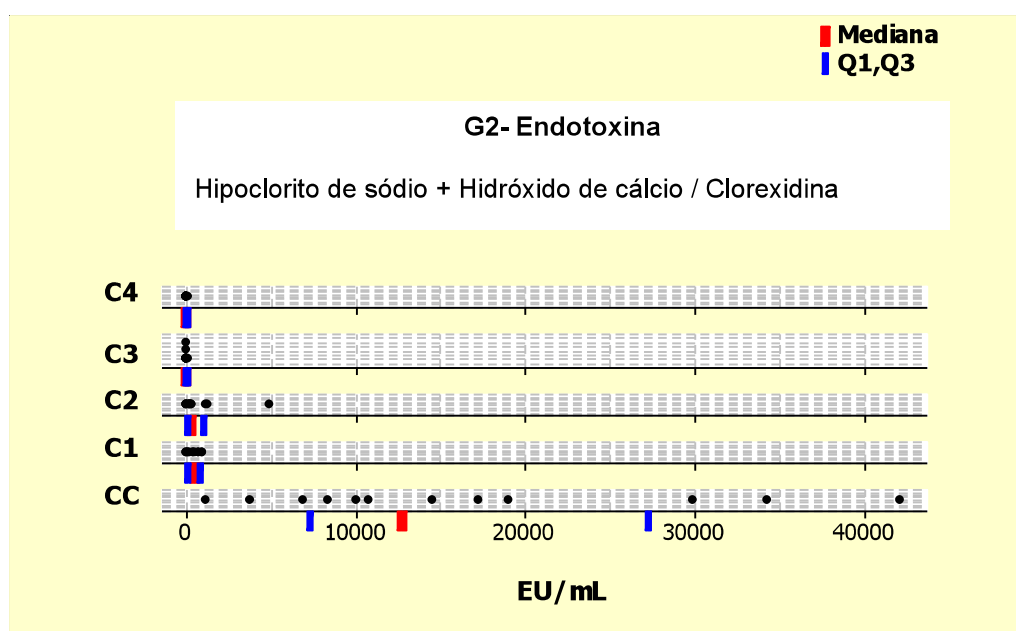


Figura 8- Representação gráfica da redução de endotoxina (EU/mL) de *E. coli* do Grupo 1, nas coletas após início do tratamento.



CC: Coleta de confirmação C1: 1ª Coleta C2: 2ª Coleta C3: 3ª Coleta 4C: 4ª Coleta

Figura 9- Diagrama de pontos (Dotplot) dos valores de endotoxina (EU/mL) de *E. coli* do Grupo 2, em cada coleta.

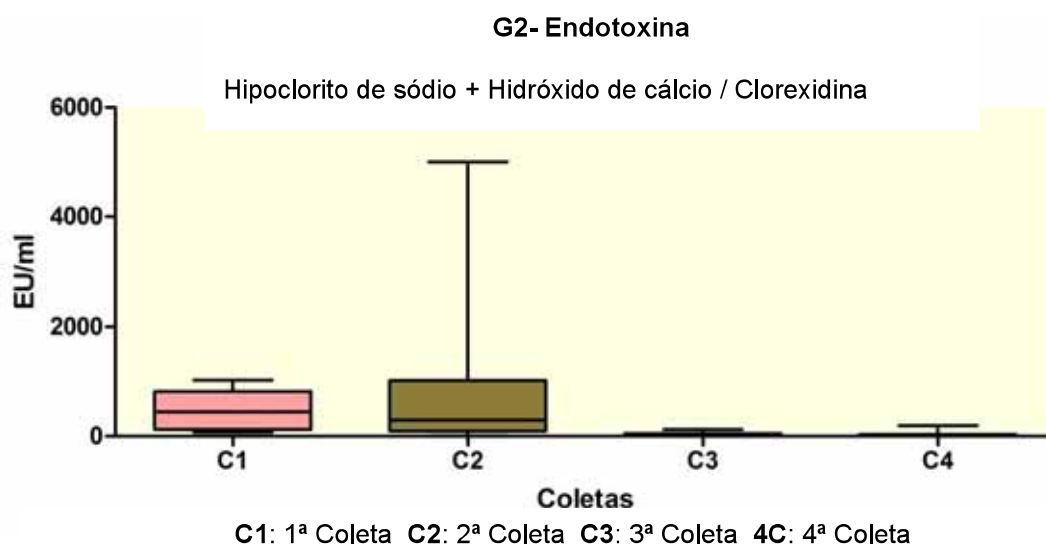


Figura 10- Representação gráfica da redução de endotoxina (EU/mL) de *E. coli* do Grupo 2, nas coletas após início do tratamento.

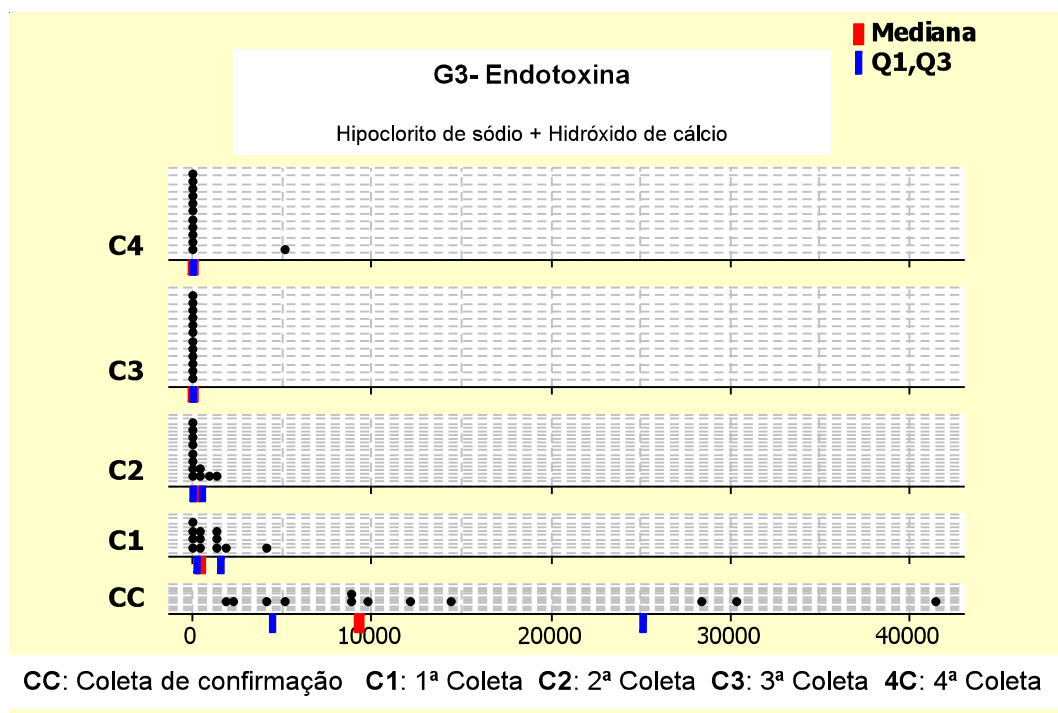


Figura 11- Diagrama de pontos (Dotplot) dos valores de endotoxina (EU/mL) de *E. coli* do Grupo 3, em cada coleta.

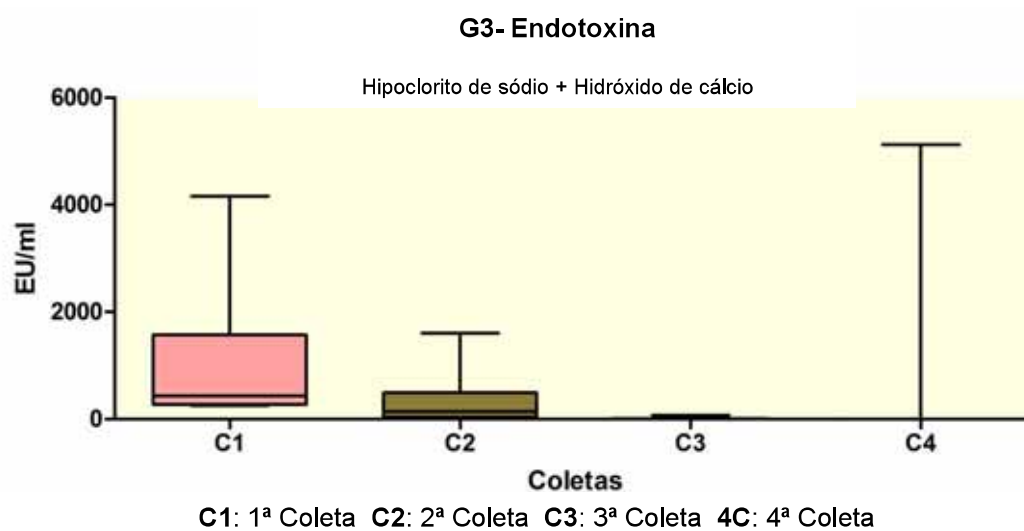
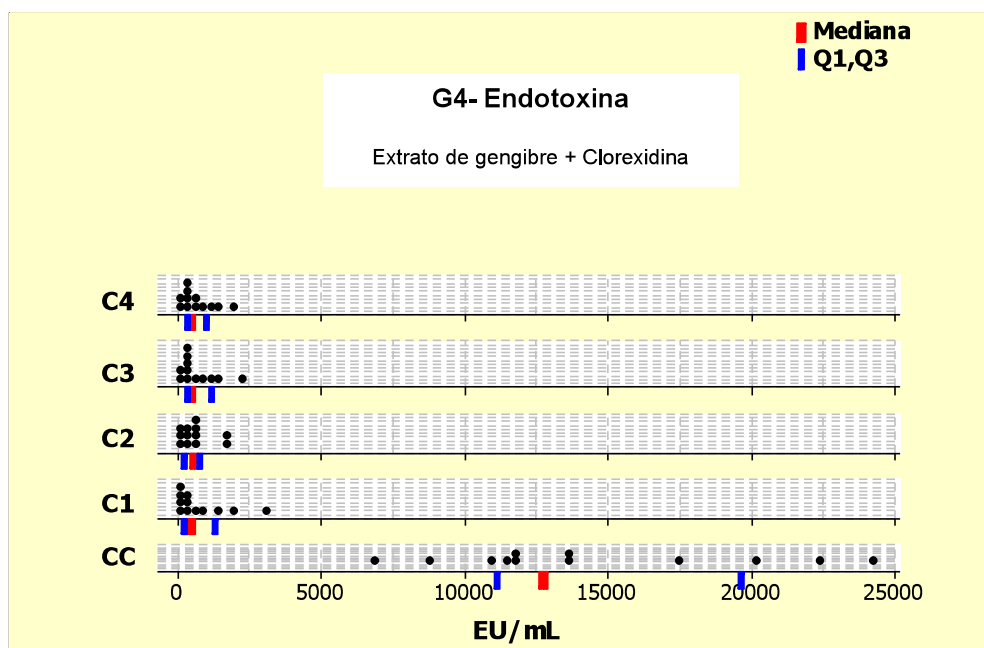
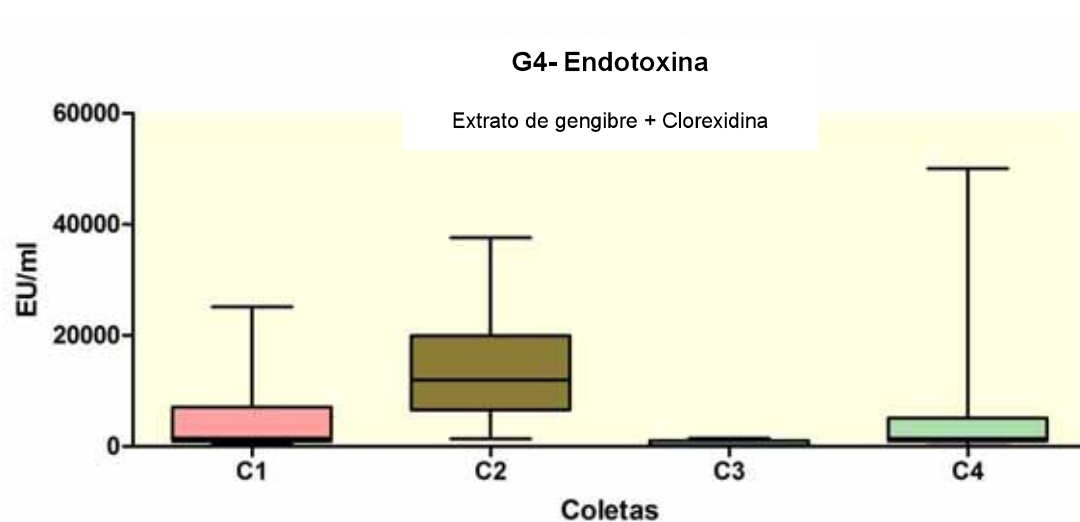


Figura 12- Representação gráfica da redução de endotoxina (EU/mL) do Grupo 3, nas coletas após início do tratamento.



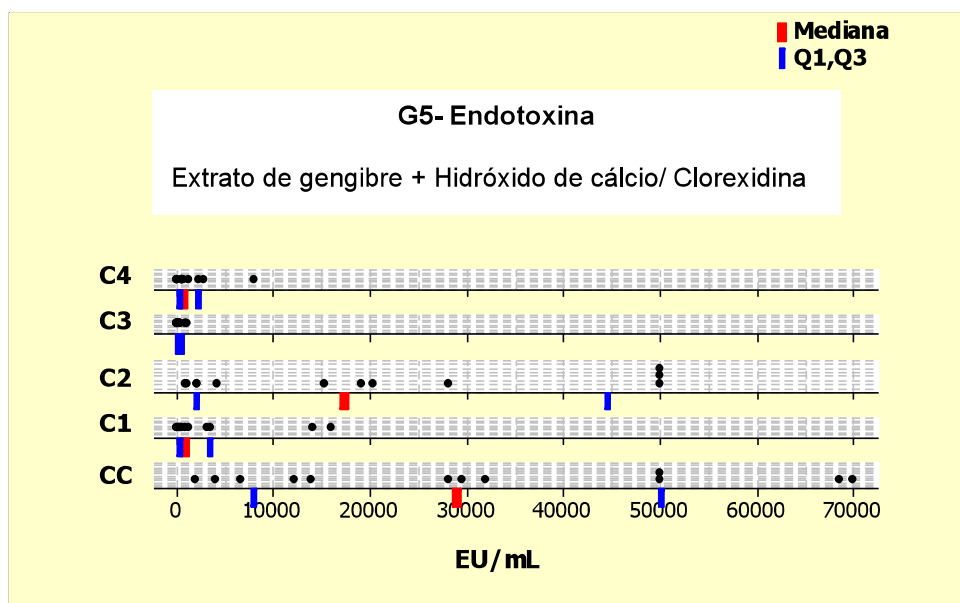
CC: Coleta de confirmação C1: 1ª Coleta C2: 2ª Coleta C3: 3ª Coleta 4C: 4ª Coleta

Figura 13- Diagrama de pontos (Dotplot) dos valores de endotoxina (EU/mL) de *E. coli* do Grupo 4, em cada coleta.



C1: 1ª Coleta C2: 2ª Coleta C3: 3ª Coleta 4C: 4ª Coleta

Figura 14- Representação gráfica da redução de endotoxina (EU/mL) do Grupo 4, nas coletas após início do tratamento.



CC: Coleta de confirmação C1: 1ª Coleta C2: 2ª Coleta C3: 3ª Coleta 4C: 4ª Coleta

Figura 15- Diagrama de pontos (Dotplot) dos valores de endotoxina (EU/mL) de *E. coli* do Grupo 5, em cada coleta.

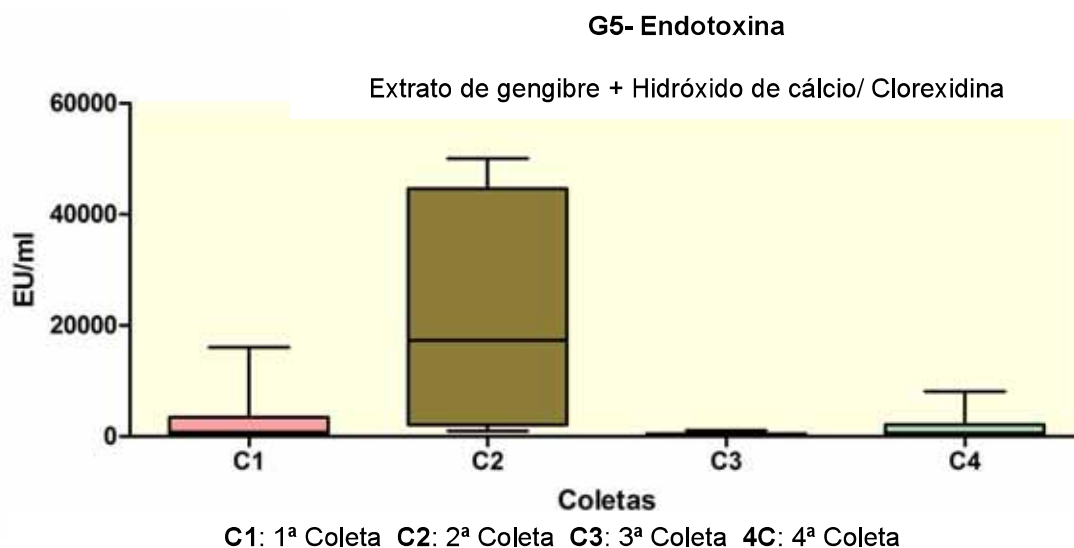
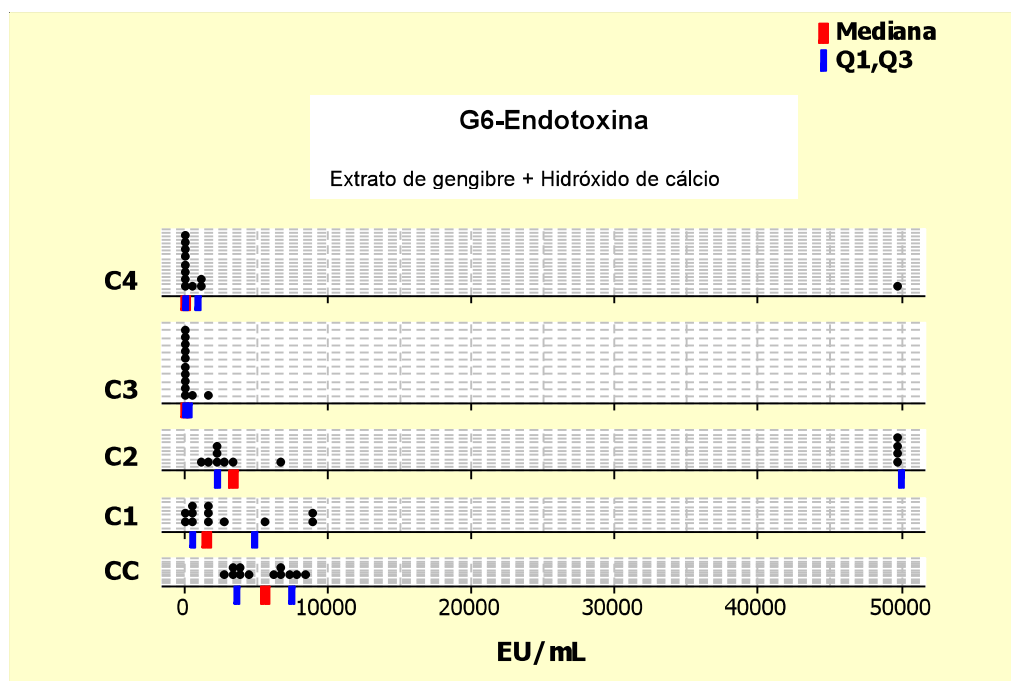
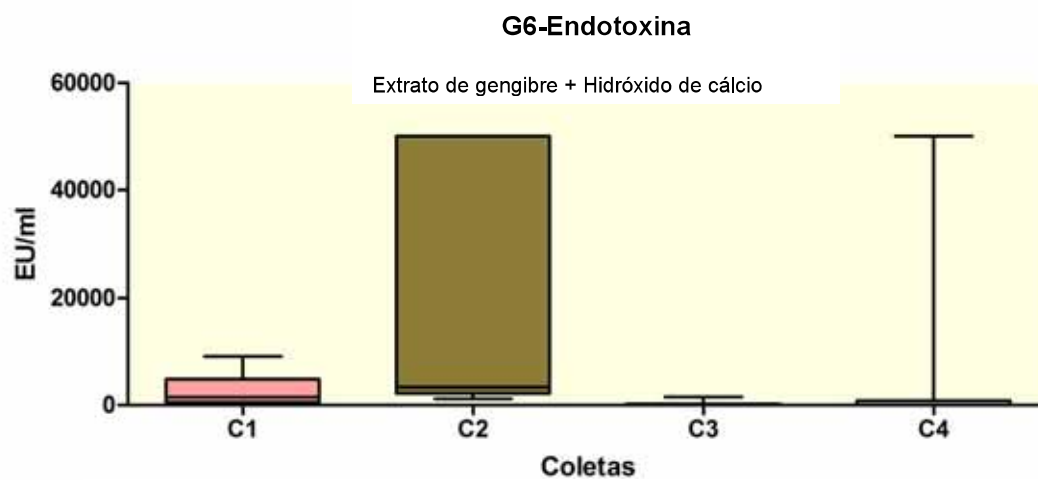


Figura 16- Representação gráfica da redução de endotoxina (EU/mL) do Grupo 5, nas coletas após início do tratamento.



CC: Coleta de confirmação C1: 1ª Coleta C2: 2ª Coleta C3: 3ª Coleta 4C: 4ª Coleta

Figura 17- Diagrama de pontos (Dotplot) dos valores de endotoxina (EU/mL) de *E. coli* do Grupo 6, em cada coleta.



C1: 1ª Coleta C2: 2ª Coleta C3: 3ª Coleta 4C: 4ª Coleta

Figura 18- Representação gráfica da redução de endotoxina (EU/mL) do Grupo 6, nas coletas após início do tratamento.

A comparação da redução de endotoxinas do final do experimento (4ª coleta) com a quantificação do início do experimento (coleta de confirmação) foi realizada através dos testes Kuskal Wallis e de Dunn, com nível de significância de 5%. Foi verificado que os Grupos 2,3 e 6 reduziram semelhantemente. E foram diferentes estatisticamente dos Grupos 1 e 4 (Figura 23).

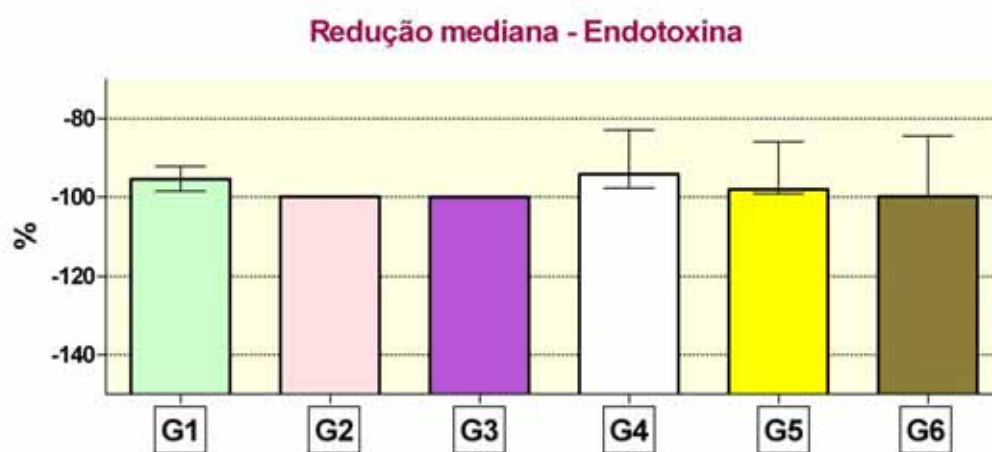


Figura 23- Representação gráfica da comparação (em porcentagem), entre grupos, sobre redução de endotoxina (EU/mL) a partir da coleta de confirmação à 4ª coleta.

6 Discussão

6.1 Da metodologia

A padronização e o número de espécimes utilizados nas pesquisas influenciam diretamente os resultados e consequentemente determinam qual inferência terá na comunidade científica. Portanto os espécimes foram padronizados quanto à anatomia, comprimento radicular (tamanho em $16 \pm 0,5\text{mm}$) e diâmetro radicular (até lima Kerr nº 30), ainda foi realizado o vedamento do ápice das raízes com resina fotopolimerizável seguido de impermeabilização da raiz com resina epóxi para impossibilitar a saída dos microrganismos, substâncias químicas auxiliares e medicações intracanaais durante todo experimento.

A fixação dos espécimes em placas de cultura de células de 24 poços foi realizada com o propósito de diminuir o risco de contaminação durante o preparo biomecânico⁶⁴. Além disto, todos os materiais, previamente ao experimento, estavam isentos de endotoxina para não haver interferência nos resultados. Para isto, todos materiais foram esterilizados com radiação gama cobalto 60, pela Empresa Brasileira de Radiação (EMBRARAD). Segundo Csako, em 1983, esta radiação é capaz de neutralizar as endotoxinas provavelmente devido à destruição da porção polissacarídica e alteração do lipídeo A.

Para este estudo foram escolhidos três importantes microrganismos, que representaram classes diferentes: Bactérias Gram-negativas, Fungos e Bactérias Gram-positivas. O tempo de contaminação dos canais radiculares com os microrganismos: *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* foi estabelecido por Molina em 2008,

após várias tentativas de associação. Inicialmente, os canais radiculares foram contaminados por *Escherichia coli* e após 7 dias, *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* foram inoculados nos canais radiculares. Foi aguardado um período de 21 dias, a contar do dia da inoculação de *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* até a coleta de confirmação para que os microrganismos penetrassem em profundidade nos túbulos dentinários (Matsushita et al., 1999).

Candida albicans e *Enterococcus faecalis* são microrganismos comumente relacionados às infecções endodônticas e que se apresentam resistentes à determinadas substâncias consagradas na terapia endodôntica, como hidróxido de cálcio; e por isto são constantemente estudados (Ferguson et al., 2002; Siqueira et al. 2003; Menezes et al., 2004).

Escherichia coli raramente é associada a infecções endodônticas, embora possa ser encontrado em infecções secundárias dos canais radiculares (Peculien et al., 2001) . A maior contribuição desta bactéria, neste estudo é seu subproduto liberado com a sua morte ou divisão, LPS (Endotoxina). A endotoxina de *Escherichia coli* é considerada uma endotoxina padrão, por apresentar uma estrutura básica do componente lipídico, que é responsável pela toxicidade, sendo utilizada em vários estudos que avaliam a capacidade de irrigantes e medicações intracanaais em neutralizá-la (Maekawa 2007; Oliveira et al., 2007; Molina, 2008).

As substâncias químicas auxiliares utilizadas durante o preparo dos canais radiculares foram: hipoclorito de sódio 2,5% e extrato glicólico de gengibre 20%. Hipoclorito de sódio 2,5% foi selecionado para este estudo por ser o irrigante mais difundido e estudado na Endodontia sobre estes microrganismos (Waltimo et al., 1999; Ercan et al., 2004; Ruff et al., 2006). Em contrapartida, O extrato de glicólico de gengibre tem chamado atenção por apresentar atividade antimicrobiana com a vantagem de ser um fitoterápico, e não ter o inconveniente da

citotoxicidade presente no hipoclorito de sódio (Ficker et al., 2003; Agarwal et al., 2008; Caires et al., 2008; Park et al., 2008).

Em relação à medicação intracanal, optou-se pela utilização do hidróxido de cálcio sozinho ou associado à clorexidina 2% gel, e clorexidina 2% gel sozinha, em virtude de suas propriedades.

O período de 14 dias de ação da medicação intracanal foi devido ao hidróxido de cálcio necessitar desse tempo para difundir-se nos túbulos dentinários e ter a ação satisfatória sobre os microrganismos presente na massa dentinária (Herman et al., 1996).

Teste cromogênico do lisado do amebócito de *Limulus*, foi selecionado por ser mais sensível e confiável para detecção de endotoxinas, permitindo quantificar a endotoxina com maior precisão. Neste teste, o leitor cinético acoplado a um microcomputador com *software* Wink QCL específico realiza o gerenciamento, execução e emissão de relatórios. Este *software* calcula automaticamente os parâmetros da curva-padrão e os valores da quantidade de endotoxina das amostras dos canais radiculares. Este teste também é utilizado por outros autores (Haight- Ponce et al., 1999; Oliveira et al., 2007; Martinho et al. 2008; Molina, 2008).

6.2 Dos resultados

Nos Grupos que utilizaram hipoclorito de sódio 2,5% (Grupos 1, 2, 3, 4) como irrigante, foi verificado ausência de crescimento de *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* imediatamente ao preparo biomecânico (1ª coleta), estando de acordo com Schirrmeister et al., em 2007, que também não detectou a presença de microrganismos imediatamente ao preparo biomecânico com

hipoclorito de sódio 2,5% e EDTA 17% em 20 casos clínicos de retratamento endodôntico.

Após o preparo biomecânico, os canais radiculares foram preenchidos com solução salina fisiológica e permaneceram assim por 7 dias na estufa a temperatura de $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa 100%, condições estas, que são favoráveis à proliferação dos microrganismos sobreviventes ao preparo biomecânico e à sua recolonização no canal principal. Entretanto, passado estes 7 dias, houve crescimento de *Candida albicans* em um espécime; em dois espécimes crescem *Escherichia coli* e em quatro espécimes crescem *Enterococcus faecalis*. Este resultado é devido à ação do hipoclorito de sódio sobre os microrganismos. Este irrigante promove alterações celulares bioquímicas e destrói fosfolípidios pela formação de cloraminas que interferem no metabolismo celular, inibindo de forma irreversível as enzimas essenciais das bactérias, além da degradação de ácidos graxos e lipídios resultando na formação de sabão e glicerol (Estrela et al., 2002). O crescimento de *Enterococcus faecalis* possivelmente deve-se à habilidade deste microrganismo invadir os túbulos dentinários em profundidade⁴. Além disto, tanto *Candida albicans* como *Enterococcus faecalis* se aderem ao colágeno exposto da dentina e desta forma, através da ação solvente, o hipoclorito de sódio remove estas fibras colágenas expostas diminuindo a força de adesão e a aderência destes microrganismos à dentina (Turk et al., 2008; Kishen et al., 2008). Mesmo assim, poucos microrganismos permaneceram viáveis.

Nos Grupos que se utilizou extrato glicólico de gengibre (Grupos 4, 5 e 6) como irrigante, houve redução significativa de *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* e eliminação de *Candida albicans* em 79,16% dos espécimes imediatamente ao preparo biomecânico (1ª coleta). Estes resultados confirmam a ação antifúngica desempenhada pelo extrato glicólico de gengibre sobre *Candida albicans* encontrados em outros estudos in vitro (Fiker et al., 2003; Agarwal et al., 2008; Caires et al. 2008). O fato de não ter eliminado totalmente os microrganismos do

canal principal durante o preparo biomecânico utilizando extrato glicólico de gengibre como irrigante provavelmente beneficiou a rápida proliferação, sendo observado um aumento de UFC/mL dos três microrganismos em 7 dias. Deve-se ressaltar que o extrato utilizado foi na concentração de 20%. Estudos prévios utilizando a concentração de 10% mostraram efetividade sobre *Candida albicans*. Portanto, é provável que em concentrações maiores, o extrato de gengibre apresente maior efetividade.

Observando as medicações intracanaais percebe-se que a clorexidina 2% gel foi satisfatoriamente efetiva contra *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* que sobreviveram ao preparo biomecânico; apresentando poucas UFC/mL apenas nos Grupos do extrato glicólico de gengibre, na terceira e quarta coletas.

Já a clorexidina associada ao hidróxido de cálcio apresentou-se ligeiramente menos efetiva que a clorexidina sozinha. Estes resultados concordam com Ercan et al.(2006), Ballal et al. (2007) e Wang et al. (2007). Provavelmente, esta diminuição na efetividade da associação hidróxido de cálcio/clorexidina seja devido a perda de atividade da clorexidina após 7 dias. Mesmo assim, a clorexidina associada ao hidróxido de cálcio foi mais efetiva quando comparada com o hidróxido de cálcio sozinho, coincidindo com os resultados de Gomes et al. (2006) que verificaram a atividade antimicrobiana da clorexidina 2% gel, do hidróxido de cálcio sozinho e associado à clorexidina sobre patógenos endodônticos.

Apesar do hipoclorito de sódio 2,5% e do extrato glicólico de gengibre 20% utilizados no preparo biomecânico terem apresentado atividade antimicrobiana sobre *E. coli*, os mesmos não foram capazes de eliminar as endotoxinas presentes no canal radicular; ainda que tenham conseguido reduzir consideravelmente a quantidade de endotoxina (na 1ª coleta) quando comparado ao número de endotoxinas na coleta de confirmação. Estes resultados concordam com outros estudos que também verificaram que o preparo

biomecânico com solução de hipoclorito de sódio não é suficiente para inativar a endotoxina (Haight- Ponce et al., 1999; Oliveira et al., 2007; Martinho et al., 2008).

Verificou-se que após 7 dias do preparo biomecânico (2ª coleta) houve alto aumento de endotoxinas em todos os Grupos que utilizaram extrato glicólico de gengibre (Grupos 4, 5 e 6), e no Grupo 2 que utilizou hipoclorito de sódio. Isto indica que um número pequeno de *Escherichia coli* resistente ao preparo biomecânico é suficientemente capaz de produzir elevadas quantidades de endotoxinas no sistema de canais radiculares. No caso do Grupo 2 (hipoclorito de sódio), que *Escherichia coli* foi totalmente eliminada na 1ª coleta, constata-se que a morte destas bactérias também liberam endotoxinas, que permanecem na massa dentinária; este fato justifica o aumento do número de endotoxina na 2ª coleta . Desta forma, é necessário o uso de medicações que atuem, inativando as endotoxinas. Estes resultados estão de acordo com Maekawa, 2007, que avaliou a atividade antimicrobiana e endotóxica do hipoclorito de sódio 2,5%, clorexidina 2% e hidróxido de cálcio sobre *Escherichia coli* e sua endotoxina.

O uso da clorexidina 2% gel, como medicação intracanal, reduziu significativamente as endotoxinas (3ª coleta) em comparação ao número de endotoxinas encontrado na 2ª coleta. Mesmo assim, não foi capaz de eliminá-las em nenhum espécime. Observa-se que os maiores valores de endotoxina foram encontrados no Grupo 4 (Extrato de gengibre 20% + clorexidina 2%), o qual estava presente *Escherichia coli* viável mesmo após 14 dias de medicação intracanal. Este fato está em harmonia com Dahlén & Bergenholtz (1980) que concluiu que a atividade endotóxica está correlacionada ao número de bactérias Gram-negativas presentes no canal radicular.

Em alguns espécimes, o hidróxido de cálcio como medicação intracanal foi capaz de inativar completamente as endotoxinas (Grupo 3). Outras pesquisas utilizando hidróxido de cálcio sobre endotoxinas, também demonstraram que o hidróxido de cálcio é

capaz de neutralizar endotoxinas presentes nos canais radiculares, alterar as propriedades do LPS em estimular a produção anticorpos pelos linfócitos B, além de eliminar a capacidade do LPS em induzir a produção de TNF- α em monócitos periféricos do sangue (Barthel et al., 19997; Okiono et al., 2004).

A associação do hidróxido de cálcio com a clorexidina 2% mostrou resultados muito satisfatórios sobre as endotoxinas (Grupo 2: Hipoclorito de sódio 2,5% + hidróxido de cálcio/ clorexidina 2%), evidenciando que esta associação uniu as propriedades do hidróxido de cálcio em neutralizar as endotoxinas com as propriedades antimicrobianas e substantividade da clorexidina 2% gel sobre *Escherichia coli*. Mas, a efetividade desta associação está limitada ao número de *Escherichia coli* viáveis no canal radicular, como foi verificado no Grupo 5 (extrato glicólico de gengibre + hidróxido de cálcio/ clorexidina 2%).

Quando se compara, a ação sobre endotoxina, do hidróxido de cálcio sozinho com a associação do hidróxido de cálcio/clorexidina 2%, percebe-se que o hidróxido de cálcio sozinho foi mais efetivo. Possivelmente, existe uma relação da atividade endotóxica do hidróxido de cálcio com o veículo utilizado. A clorexidina perde a ação após 7 dias do uso da medicação intracanal. Sendo assim, para que associação atue em toda massa dentinária de forma satisfatória o tempo deveria ser 7 dias. Entretanto, para padronização dos grupos optou-se por um período de 14 dias para todos os grupos experimentais.

Diante da análise dos resultados deste estudo, verifica-se que o preparo biomecânico seguido da medicação intracanal diminui a quantidade de microrganismos e endotoxinas. O uso do gengibre, embora não tenha apresentado resultados tão favoráveis, deve continuar sendo objetivo de pesquisa, alterando a concentração deste extrato que mostra resultados promissores.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- a) O extrato glicólico de gengibre 20% é capaz de eliminar *Candida albicans*. Além de ter ação antimicrobiana sobre *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*.
- b) O hipoclorito de sódio 2,5% foi capaz de eliminar totalmente *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* após o preparo biomecânico.
- c) O extrato glicólico de gengibre 20% e hipoclorito de sódio 2,5% reduziram significativamente as endotoxinas, mas não foram capazes de eliminá-las.
- d) Todas medicações intracanaís avaliadas neste estudo diminuíram significativamente microrganismos e endotoxinas dos canais radiculares.

8 REFERÊNCIAS

Agarwal V, Lal P, Pruthi. Prevention of *Candida albicans* biofilm by plants oils. Micopathol. 2008;165:13-19.

Amin A, Hamza A. Effects of Roselle and Ginger on cisplatin induced reproductive toxicity in rats. Asian J Androl. 2006;8:607-12.

Baik JE, Kum K, Yun C, Lee J, Lee K, Kim K, et al. Calcium hydroxide inactivates lipoteichoic acid from *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2008; 34(11):1355-9.

Baik JE, Ryu H, Han JY, Im J, Kum K, Yun C, et al. Lipoteichoic acid partially contributes to the inflammatory responses to *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2008; 34(8):975-82.

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

Barthel CR, Levin LG, Reinsner HM, Trope M. TNF- α release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. Int Endo J. 1997;30:155-59.

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

Baumgartner JC, Watts CM, Xia T. Occurrence of *Candida albicans* in infections of endontic origin. J Endod. 2000; 26(12):695-8.

Berber VB, Gomes BPFA, Vianna ME, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Efficacy of various concentrations of NaOCl and

instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. Int Endod J. 2006; 39:10-7.

Brändle N, Zebnder M, Weiger R, Waltimo T. Impact of growth conditions on susceptibility of Five microbial species to alkaline stress. J Endod. 2008; 34(5): 579-82.

Buck RA, Cai J, Eleazer PD, Staat RH, Hurst HE. Detoxification of endotoxin by endodontic irrigants and calcium hydroxide. J Endod. 2001; 27(5):325-7.

Caires LP, Aguiar APS, Maekawa LE, Valera MC, Koga-Ito CY. Avaliação in vitro da ação do extrato glicólico de gengibre e do hipoclorito de sódio sobre *Candida albicans* In: 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica. 2008 Águas de Lindóia. Brazilian Oral Research, 2008; 22:99

Chen I-N, Chang C-C, Ng C-C, Wang C-Y, Shyu YT, Chang T-L. Antioxidant and antimicrobial activity of zingiberaceae plants in Taiwan. Plant Foods Hum Nutr. 2008; 63: 15-20.

Chen JC, Huang LJ, Wu SL, Kuo SC, Ho TY, Hsiang CY. Ginger and its bioactive component inhibit enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin-induced diarrhea in Mice. J Agric Food Chem. 2007;55: 8390-7.

Chivatxaranukul P, Dashper SG, Messer HH. Dentinal tubule invasion and adherence by *Enterococcus faecalis* Int Endod J. 2008; 41(10): 873-82.

Christensen CE, McNeal SF, Eleazer P. Effect of lowering the pH of sodium hypochlorite on dissolving tissue in vitro. J Endod. 2008; 34(4): 449-52.

Costa MMTM, Oliveira SHP, Gomes-Filho JE. Mechanism of calcium hydroxide- induced neutrophil migration into air pouch cavity. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008; 105: 814-21.

Cotti E, Lusso D, Dettori. Management of apical inflammatory root resorption: report case. *Int Endod J*. 1998; 31:301-4.

Czako 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.

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

Davis JM, Maki J, Bahcall JK. An in vitro comparison of the antimicrobial effects of various endodontic medicaments on *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2007;33:567-9.

Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod*. 2006; 32(6):527-31.

Egan MW, Spratt DA, Ng YL, Lam JM, Moles DR, Gulabivala K. Prevalence of yeast in saliva and root canals of teeth associated with apical periodontitis. *Int Endod J*. 2002;35:321-9.

Ercan E, Dalli M, Dülgeril T. In vitro assessment of the effectiveness of chlorhexidine gel and calcium hydroxide paste with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;102(2):e27-31.

Ercan E, Özekinci T, Atakul F, Gül K. Antibacterial Activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5,25% sodium hypochlorite in infected root canal: in vivo study. *J Endod*. 2004;30(2):84-7.

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

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

Ferguson JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Effectiveness of intracanal irrigants and medications against the yeast *Candida albicans*. J Endod. 2002;28(2):68-71.

Ficker CE, Arnason JT, Vindas PS, Alvarez LP, Akpagana K, Gbeassor M, Souza C, Smith ML. Inhibition of human pathogenic fungi by ethnobotanically selected plant extracts. Mycoses. 2003; 46:29-37.

Ficker CE, Smith ML, Akpagana K, Gbeassor M, Zhang J, Durts T, et al. Bioassay-guided isolation and identification of antifungal compounds from ginger. Phytother Res. 2003;17:897-902.

Gernhardt CR, Eppendorf K, Kozlowski A, Brandt M. Toxicity of concentrated sodium hypochlorite used as an endodontic irrigant. Int Endod J. 2004;37:272-80.

Gomes BPFA, Drucker DD, Lilley JD. Endodontic microflora of different teeth in the same mouth. Anaerobe. 1999; 5: 241-45.

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

Haenni S, Schmidlin PR, Muller B, Sener B, Zehnder M. Chemical and antimicrobial properties of calcium hydroxide mixed with irrigating solutions. Int Endod J. 2003 feb;36(2):100-105.

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

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

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.

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

Johnson EM, Flannagan SE, Sedgley CM. Coaggregation interactions between oral and endodontic *Enterococcus faecalis* and bacterial species isolated from persistent apical periodontites. *J Endod*. 2006; 32(10): 946-950.

Jung H W, Yoon CH, Park KM, Han HS, Park Y-K. Hexane fraction of zingiberis rhhizoma crudus extract inhibits the production of nitric oxide and proinflammatory cytokines in LPS-stimulated BV2 microglial cells via the NF-KappaB pathway. *Food Chem Toxic*. [serial on the internet]. 2009 Jun [cited 2009 05 20]; 47(6): [about 8p.].

Kayaoglu G, Erten H, Bodrumlu E, Orstavik D. The resistance of collagen-associated, plaktonic cells of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *J Endod*. 2009; 35:46-9.

Khademi A, Mohammadi Z, Havaee A. Evaluation of the antibacterial substantivity of several intra-canal agents. *Aust Endod J*. 2006; 32: 112-5.

Kishen A, Sum C, Mathew S, Lim C. Influence of irrigation regimes on the adherence of *Enterococcus faecalis* to root canal dentin. J Endodo. 2008; 34(7): 850-4.

Lantz RC, Chen GJ, Sarihan M, Sólyom AM, Jolad SD, Timmermann BN. The effect of extracts from ginger rhizome on inflammatory mediator production. Phytomedicine 2006; 14(2-3):123-8.

Lee J-K, Baik JE, Yun C-H, Lee K, Han H, Lee W, et al. Chlorhexidine gluconate attenuates the ability of lipoteichoic acid from *Enterococcus faecalis* to stimulate toll-like receptor 2. J Endod. 2009; 35(2):212-5.

Levin J, Bang FB. Clottable protein in Limulus: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb Diath Haemorrh. 1968;31(1):186-97.

Levy ASA, Simon O, Shelly J, Gardener M. 6-Shogaol reduced chronic inflammatory response in the knees of rats treated with complete freund's adjuvant. BMC Pharmacology, 2006;6(12):1- 8.

Lin LM, DiFiore PM, Lin Jarsben, Rosenberg. Histological study of periradicular tissue responses to uninfected and infected devitalized pulps in dogs. J Endod. 2006;32:34-8.

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

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 (SP): Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"- 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;34:268-272.

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.

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

Mercade M, Duran-Sindreu F, Kuttler S, Roig M, Durany N. Antimicrobial efficacy of 4,2% sodium hypochlorite adjusted to pH 12, 7.5, AND 6.5 in infected human root canals. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009; 107(2):295-8.

Mizuno M & Banzai Y. Calcium ion release from calcium hydroxide stimulated fibronectin gene expression in dental pulp cells and the differentiation of dental pulp cells to mineralized tissue forming cells by fibronectin. Int Endod J. 2008 Nov; 41(11):933-8.

Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. Int Endod J. 2009; 42: 288-302.

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 (SP), Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"- UNESP; 2008.

Nagoshi C, Shiota S, Kuroda T, Hatano T, Yoshida T, Kariyama R, et al. Synergistic effect of [10] gingerol and aminoglycosides against

vancomycin-resistant Enterococci (VRE). Biol Pharm Bull. 2006;29(3):443-7.

Nair PNR. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. Int Endod J. 2006;39:249-81.

Neelakantan P, Sanjeev K, Subbarao CV. Duration-dependent susceptibility of endodontic pathogens to calcium hydroxide and chlorhexidine gel used as intracanal medicament: an in vitro evaluation. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007;104(4):e138-41.

Ojewole JAO. Analgesic, antiinflammatory and hypoglycaemic effects of ethanol extract of *Zingiber officinale* (Roscoe) Rhizomes (*Zingiberaceae*) in mice and rats. Phytother. Res. 2006;20:764–72.

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

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.

Pan MH, Hsieh MC, Hsu PC, Ho SH, Lai CS, Wu H, et al. 6-Shogaol suppressed lipopolysaccharide-induced up-expression of iNOS and COX-2 in murine macrophages. Mol Nutr Res. 2008;52:1-11.

Paquette L, Legner M, Fillery ED, Friedman S. Antibacterial efficacy of chlorhexidine gluconate intracanal medication in vivo. J Endod. 2007;33(7):788-95.

Park M, Bae J, Lee D-S. Antibacterial activity of [10]-gingerol and [12]-gingerol isolated from ginger rhizome against periodontal bacteria. Phytother Rev. 2008 [serial on the internet]. 2009 Jun [cited 2009 05 20]; 47(6): [about 8p.].

Peculiene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of teast and enteric bacteri in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J* 2001;34:429-34.

Policegoudra RS, Abiraj K, Channe Gowda D, Aradhya SM. Isolation and characterization of antioxidant and antibacterial compound from mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.) rhizome. *J Chromat B*. 2007; 10:1-9.

Radcliffe CE, Potouridou, Qureshi R, Habahbeh N, Qualtrough A, Worthington H, Drucker DB. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naesluundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*. 2004;37:438-46.

Rehman H, Saunders WP, Foye RH, Sharkey SW. Calcium ion diffusion from calcium hydroxide- containing materials in endodontically- treated teeth: An in vitro study. *Int Endod J*. 1996; 29:271-9.

Rosa FCS. Eficácia da instrumentação associada à terapia fotodinâmica antimicrobiana e medicação intracanal na eliminação de biofilmes e na neutralização de endotoxinas em canais radiculares [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos(SP), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP; 2008.

Rosenthal S, Spångberg L, Safavi K. Chlorexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004; 98: 488-92.

Ruff ML, McClanaban SB, Babel BS. In vitro antifungal efficacy of four irrigants as a final rinse. *J Endod*. 2006;2:331-3.

Saif S, Carey CM, Tordik PA, McClanaban. Effecct of irrigants and cementum injury on diffusion of hydroxyl ions though the dentinal tubules. *J Endod*. 2008;34(1):50-2.

Samy RP. Antimicrobial activity of some medicinal plants from India. *Fitoterapia*. 2005;76:697-9.

Sassone LM, Fidel RAS, Murad CF, Fidel SR, Hirata Jr. R. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine by two different tests. *Aust Endod J*. 2008;34:19-24.

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

Sedley CM, Lennan SL, Appelbe OK. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. *Int Endod J*. 2005; 38:735-42.

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

Serper A, Özbek M, Çalt S. Accidental sodium hypochlorite-induced skin injury during endodontic treatment. *J Endod*. 2004;30(3):180-1.

Silva LAB, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin in vivo. *J Endod*. 2002;28(2):94-98.

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

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

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

Siqueira JF Jr., Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod*. 2008; 34(11):1291-1301.

Siqueira JF Jr., Rôças IN, Lopes HP, Magalhães FAC, Uzeda M. Elimination of *Candida albicans* infection of the radicular dentin by intracanal medications. J Endod. 2003;29(8):501-4.

Siqueira JF Jr., Rôças IN, Guimarães-Pinto T. Effects of chemomechanical preparation with 2,5% sodium hypochlorite and intracanal medication with calcium hydroxide on cultivable bacteria in infected root canals. J Endod 2007;33(7):800-4.

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

Soares J, Santos S, César C, Silva P, Sá M, Silveira F, Nunes E. Calcium hydroxide induced apexification with apical root development: a clinical case report. Int Endod J. 2008;41:710-9.

Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. Periodontol 2000. 2005;38: 35-87.

Stasi LC & Hiruma-Lima CA. Planta Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. Editora UNESP. 2002; 2 ed. São Paulo.

Tanamoru JMG, Leonardo MR, Tanamoru 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.

Turk BT, Ates M, Sen BH. The effect of treatment of radicular dentin on colonization patterns of *Candida albicans*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008;106:457-62.

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

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

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

Vianna ME, Gomes BPFA. Efficacy of sodium hypochlorite combined with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;107(4):585-9.

Vivacqua-Gomes N, Gurgel-Filho ED, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Zaia AA. Recovery of *Enterococcus faecalis* after single-or multiple- visit root canal treatments carried out in infected teeth ex vivo. *Int Endod J*. 2005;38:697-704.

Walimo TMT, Orstavik D, Sirén EQ, Haapasalo MPP. In vitro susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. *Int Endod J*. 1999;32:421-9.

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

Wang CS, Arnold RR, Trope M, Teixeira FB. Clinical efficiency of 2% chlorhexidine gel in reducing intracanal bacterial. *J Endod*. 2007; 33(11):1283-9.

Yamane K, Ogawa K, Yoshida M, Hayashi H, Nakamura T, Yamanaka T, et al. Identification and characterization of clinically isolated biofilm-forming Gram-positive rods from teeth associated with persistent apical periodontitis. *J Endod*. 2009; 35(3): 347-52.

Zenhder M. Root canal irrigants. *J Endod*. 2006;32(5):389-98.

Zerella JA, Fouad AF, Spangberg LSW. Effectiveness of calcium hydroxide and chlorhexidine digluconate mixture as disinfectant during

retreatment of failed endodontic cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;100:756-61.

Zhou H, Deng Y, Xie Q. The modulatory effects of the volatile oil of ginger on the cellular immune response in vitro and in vivo in mice. *Journal of ethnopharmacology.* 2006;105:301-5.

Zmener O, Pameijer CH, Banegas G. An in vitro study of the pH of three calcium hydroxide dressing materials. *Dent Traumat.* 2007;23:21-5.

Aguiar APS. Action in vitro of glycolic extract of ginger and medications on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and endotoxin in root canals. [Dissertation]. São José dos Campos: School of Dentistry UNESP- São Paulo State University;2009.

ABSTRACT

The purpose of this research was to evaluate the biomechanical preparation (PBM) with glycolic extract of ginger and 20% sodium hypochlorite 2.5% (NaOCl), followed by intracanal medication with 2% chlorhexidine gel, calcium hydroxide, hydroxide calcium associated with chlorhexidine gel 2% is effective on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and endotoxin in root canals. Seventy two single-rooted human teeth was used and divided into 6 experimental groups (n = 12) according to the irrigating solution (ginger 20% or NaOCl 2.5%) used in the biomechanical preparation and intracanal medication (calcium hydroxide + saline, calcium hydroxide + 2% chlorhexidine gel, chlorhexidine gel 2%). Sampling was done of the contents of the root canal to confirm contamination (collect of confirmation), immediately after the instrumentation (1st collect), after 7 days of biomechanical preparation (2nd collect) and after 14 days of the action of intracanal medication (3rd collect) and 7 days after removal of the medication (4th collect). For all collections were performed the following tests: a) evaluation of antimicrobial activity by sowing and counting CFU / mL of each microorganism b) analyzing the content of endotoxin checked the test of amebócitos of *Limulus* lysate. All results were submitted to analysis of variance ANOVA, with significance level of 5%, and the test of Dunn. It appears that the NaOCl was able to eliminate the microorganisms after PBM; The ginger significantly reduced the number of bacteria and *Candida albicans* eliminated. Both irrigating solutions (NaOCl and ginger) significantly reduced endotoxin but were unable to eliminate them. The intracanal medications were effective in the reduction of microorganisms, eliminating in the NaOCl groups. The calcium hydroxide associated with a chlorhexidine significantly decreased endotoxin, but not eliminated. It was concluded that ginger dropped significantly decreased *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli* and endotoxins on root canal.

Key words: *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, Endotoxin, Ginger.